

## Trabajo Fin de Grado

Prevención de la contaminación microbiana  
en cervezas de fermentación espontánea  
producidas en microcervecerías

---

Telmo Mella Martinez

Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Director: Aingeru Remiro Eguskiza

Curso: 2020-2021

## Índice

<b>1. Introducción</b>	<b>3</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>6</b>
<b>3. Desarrollo</b>	<b>7</b>
<b>3.1. Cervezas de fermentación espontánea</b>	<b>7</b>
<b>3.1.1. Microorganismos habituales durante la fermentación espontánea</b>	<b>8</b>
<b>3.2. Control de las etapas de fermentación</b>	<b>13</b>
<b>3.3. Causas de contaminación microbiana en microcervecerías</b>	<b>15</b>
<b>3.4. Prevención de la contaminación microbiana en microcervecerías</b>	<b>17</b>
<b>3.4.1. Mejora de la estabilidad microbiológica de la cerveza</b>	<b>18</b>
<b>3.4.2. Agentes desinfectantes en la industria cervecera</b>	<b>21</b>
<b>4. Conclusiones</b>	<b>24</b>
<b>5. Bibliografía</b>	<b>25</b>

## **Resumen**

La fabricación de cervezas de fermentación espontánea supone un reto para las microcervecías dado que necesitan unas condiciones de fermentación muy concretas para lograr una correcta fermentación. A su vez, se debe prevenir la contaminación por proliferación de cepas no deseadas que puede llegar a afectar a la cerveza elaborada, así como al resto de la planta, lo que acarrea unas importantes pérdidas económicas.

En este TFG se ha realizado una revisión del estado del arte sobre la contaminación asociada a los microorganismos que proliferan en la cerveza de fermentación espontánea y que suponen una amenaza en la producción de cervezas convencionales. A partir de ello, se ha realizado una aportación original sobre los distintos métodos de fermentación, limpieza y desinfección que pueden ser útiles en la industria microcervecera. Es decir, se ha utilizado el conocimiento existente en un sector experimentado (cervecería a gran escala), y a modo de desescalado, se han propuesto selectivamente los métodos más posibilistas en base a su viabilidad tecnológica y económica en la industria microcervecera.

## 1. Introducción

La cerveza es una bebida alcohólica ancestral consumida desde hace más de 7.000 años en China y Mesopotamia, entre los ríos Éufrates y Tigris. Sin embargo, esta bebida ha ido evolucionando a lo largo de la historia debido a los avances tecnológicos y científicos surgidos.

Se obtiene por fermentación alcohólica, mediante levaduras, de un mosto compuesto por agua y cereales. Estos cereales, son tratados previamente a temperaturas y humedades definidas para que se produzca la sacarificación del almidón, convirtiéndose en azúcares simples fermentables como la glucosa y maltosa vulnerables a la acción de los enzimas  $\alpha$ -amilasa y  $\beta$ -amilasa durante la fase de elaboración, proceso que se denomina malteado del cereal. Tras el malteado se realiza la maceración de la malta para la obtención del mosto.

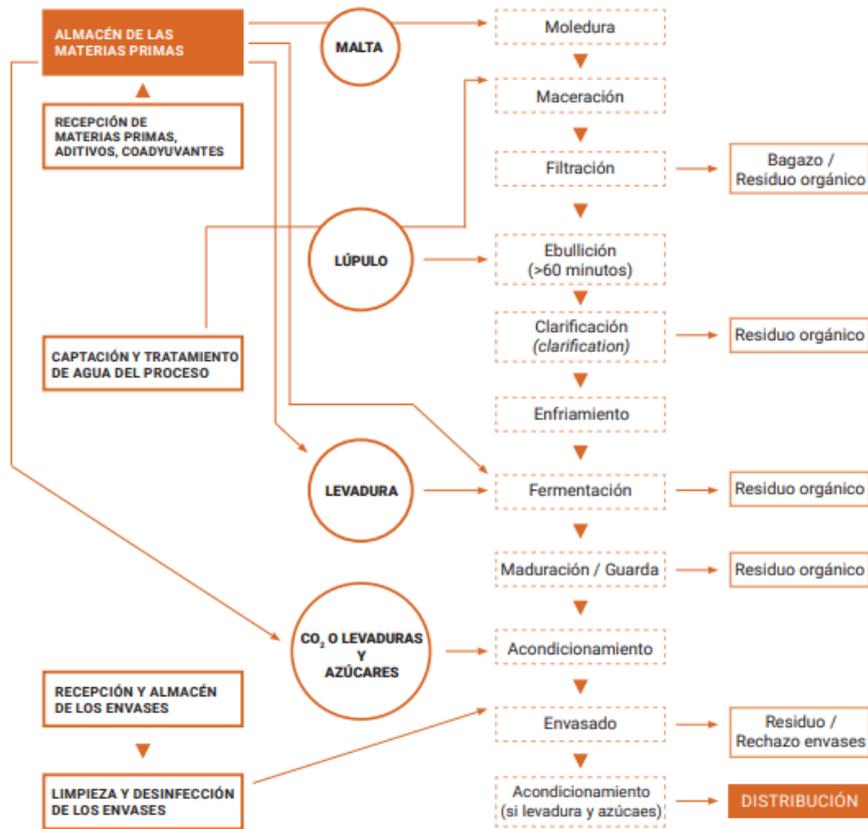
El macerado es un paso importante en el proceso de elaboración, influye en el tipo y la calidad de la cerveza producida. El objetivo de la maceración es producir un mosto que contenga las cantidades necesarias de azúcares fermentables, nutrientes para la levadura y compuestos aromatizantes. La composición final del mosto depende del perfil de temperatura-tiempo adoptado, éste cambia según el tipo y la calidad de la cerveza buscada (Montanari y cols., 2005).

Actualmente, es frecuente la incorporación de lúpulo con el fin de otorgarle aromas, sabor y amargor. El lúpulo se añade en momentos diferentes dependiendo del objetivo buscado. Para otorgarle amargor a la cerveza normalmente se adiciona 60 minutos antes de que termine el proceso. Para dar sabor, se añade el lúpulo entre 15 y 20 minutos antes de finalizar el hervido y para la obtención de aromas se añade al final del hervido, evitando así la pérdida de compuestos volátiles.

Además, el lúpulo otorga estabilidad microbiológica a la cerveza, gracias a las propiedades antisépticas y bacteriostáticas de los  $\alpha$ -ácidos,  $\beta$ -ácidos e iso- $\alpha$ -ácidos (Dysvik, 2020), siendo los más importantes estos últimos debido a que actúan como ionóforos que disipan el gradiente de pH a través de la membrana citoplasmática y reducen la fuerza protón-motriz, por lo que, en consecuencia, la absorción de nutrientes es inhibida, lo que resulta en inanición y muerte celular (Bossaert y cols., 2019).

Tras el lupulado, hay que enfriar el mosto lo más rápido posible hasta la temperatura en que se pueda introducir la levadura. La etapa de enfriado y trasvase del mosto al fermentador es la más vulnerable, la mayor parte de contaminaciones microbianas ocurre en esta etapa. Durante la fermentación, la levadura utiliza los azúcares disponibles, aminoácidos y otros nutrientes en el mosto, y genera etanol, dióxido de carbono, alcoholes superiores, ésteres y

otros metabolitos en la cerveza resultante. La especie de levadura más utilizada para la fermentación de cerveza es *Saccharomyces pastorianus*, utilizado para la fermentación de cerveza lager, seguido de *S. cerevisiae*, utilizado en cervezas ale.



**Figura 1.** Diagrama de flujo del procedimiento de la elaboración de cerveza (Generalitat de Catalunya, 2019).

En el año 1879, Louis Pasteur relacionó el mosto con los posibles problemas e inconvenientes encontrados en la bebida final debido a los microorganismos presentes en él (Pasteur, 1879). Debido a sus avances en la microbiología, así como a la revolución industrial del siglo XIX y la introducción del frío industrial, la cerveza comenzó a elaborarse de forma industrial logrando una estandarización de sus características (Barber, 2014).

En la actualidad, se comercializa una gran variedad de cervezas diferentes a la más ampliamente consumida, la cerveza rubia de tipo Pilsen, como American Pale Ale (APA), Indian Pale Ale (IPA), Imperial Stout, Porter, entre otras. Principalmente, estos estilos tan diversos son elaborados por microcervecías, plantas con capacidades de producción limitada (en Alemania < 5000 hl/año) mediante la utilización de diferentes ingredientes y levaduras, o siguiendo diferentes métodos de fermentación, lupulado y filtrado.

En España, la industria cervecera es un sector que representa el 1,5% del PIB (Cerveceros de España, 2020). Dentro de este sector, encontramos las microcervecías que han

emergido con fuerza en los últimos 10 años, suponiendo cerca del 1 % de la facturación de todo el sector cervecero en la actualidad. Las microcervecerías se caracterizan por su flexibilidad para ofrecer al consumidor una gran variedad de estilos de cerveza. Entre estos estilos se encuentran las cervezas de fermentación espontánea también denominadas de tipo sour o lámbicas que han alcanzado una cierta cuota de mercado en los últimos 5 años. Sin embargo, estas cervezas suponen un reto para las microcervecerías dado que necesitan unas condiciones de fermentación muy concretas para lograr una correcta fermentación, y a su vez, se debe prevenir la contaminación por proliferación de cepas no deseadas que puede llegar a afectar a la cerveza elaborada, así como al resto de la planta.

A pesar de que estos peligros son conocidos, es recurrente que en las diferentes fábricas aparezcan puntualmente estos problemas que acarrear consecuencias graves al perder lotes completos de producto, e incluso paradas temporales para llevar a cabo la completa desinfección de la planta de producción. Para evitar estos contratiempos, hay que establecer rigurosos protocolos para el adecuado control de las etapas de fermentación y de limpieza y desinfección de los equipos.

## 2. Objetivos

Este trabajo tiene como objetivo general buscar una solución al problema de contaminación microbiana derivado de la producción de estilos de cerveza de fermentación espontánea en microcervecerías. Para ello, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- ❖ Identificar los microorganismos más habituales en cervezas de fermentación espontánea.
- ❖ Identificar las variables de operación más sensibles en el control de las etapas de fermentación en cervezas de fermentación espontánea.
- ❖ Determinar las causas de contaminación microbiana en microcervecerías durante la elaboración de cervezas de fermentación espontánea.
- ❖ Plantear métodos o medidas de prevención para evitar la contaminación microbiana en microcervecerías a partir de los métodos utilizados en cerveceras a gran escala.

### 3. Desarrollo

#### 3.1. Cervezas de fermentación espontánea

Las cervezas tipo sour tienen como característica principal que son fermentadas mediante levaduras salvajes (fermentación espontánea). Además, son asociadas generalmente con Bélgica debido a que se comenzaron a producir allí y que es el país de Europa con mayor producción de este tipo de cerveza. Aunque la mayoría de cerveceros producen al estilo tradicional, muchos de ellos experimentan con frutas exóticas, especias y técnicas de maduración en barrica (Tonsmeire, 2014).

Estas cervezas son agrias debido a la acción de bacterias ácido-lácticas que acidifican el medio, favoreciendo la accesibilidad del almidón y previniendo el crecimiento de otros microorganismos alterantes, esto favorece el crecimiento de *Saccharomyces spp.*

Pueden producirse de diversas formas dando lugar a una amplia variedad de estilos de cerveza como las lámbicas, Flanders Red Ale u Old Brown entre las belgas y otras como las American Coolship Ale, Berliner Weisse y Gose. De entre todas ellas, las lámbicas belgas son producidas por fermentación espontánea estricta, ya que el resto de ellas son fermentadas mediante fermentaciones mixtas o réplicas de la fermentación espontánea pero con inóculos. (Bossaert y cols., 2019).

La fermentación tradicional utilizada para producir la cerveza lámbica no aplica cultivos de levadura pura, sino que se basa en la inoculación ambiental espontánea. La fermentación y maduración se realiza en barricas de madera y puede durar hasta tres años. Se caracteriza por diferentes especies microbianas pertenecientes a las familias *Enterobacteriaceae*, *Acetobacteraceae*, bacterias ácido-láctica y levaduras (De Roos y De Vuyst, 2019).

Una de las diferencias más importantes en el proceso de producción de cervezas lámbicas es el hecho de que durante la etapa de maceración, se añade por lo menos un 30% de trigo sin maltear a la cebada malteada (Verachtert y Iserentant, 1995). El trigo sin maltear es bajo en enzimas endógenas, por lo que la concentración de maltodextrinas en el mosto es mayor, provocando fermentaciones y maduraciones más largas (De Roos y De Vuyst, 2019).

Tras el proceso de maceración, siguiendo el método tradicional, el mosto se enfría durante la noche, sin tapar, en recipientes metálicos llamados "coolship", lo que permite la inoculación espontánea de los microorganismos del ambiente (Verachtert y Derdelinckx, 2014). En las cervecerías con capacidad de producción a gran escala, el mosto se pre-enfría mediante el uso de intercambiadores de calor antes de traspasarlo al "coolship"

para la inoculación ambiental. En ambos casos, tras el enfriamiento e inoculación, se introduce el mosto en barricas de madera para la fermentación y posterior maduración (Spitaels y cols., 2015).

Las barricas juegan un papel importante en la producción de cerveza lámbica, además de permitir la entrada de oxígeno, lo que permite la maduración, las barricas de madera se utilizan principalmente para la formación de sabor mediante la extracción de compuestos fenólicos y taninos, típicos de la madera. Sin embargo, estos compuestos se pierden en su mayoría después de un uso extensivo de las barricas. Debido a la porosidad de la madera, las superficies son difíciles de higienizar y, por lo tanto, albergan una microbiota que puede afectar a las propiedades organolépticas de la cerveza.

La extracción de compuestos fenólicos y taninos no es de interés durante la producción de cerveza lámbica, por lo que se compran barricas viejas de vino y son reutilizados en procesos de fermentación espontánea, aprovechando la microbiota presente en la superficie de estos (Spitaels y cols., 2017). La especie de levadura *Brettanomyces* reside y sobrevive en barricas de vino de madera, puede tener un impacto negativo en la calidad del vino debido a la formación de olores específicos como el olor a Brett, producido por los compuestos 4-etil guaiacol y 4-etilfenol, sin embargo, este aroma es fundamental en la producción de cervezas lámbicas (De Roos y De Vuyst, 2019).

### **3.1.1. Microorganismos habituales durante la fermentación espontánea**

En la actualidad, la mayoría de las cervezas disponibles en el mercado han sido fermentadas únicamente con *Saccharomyces spp.* y la presencia de cualquier otro microorganismo sugiere defectos en la cerveza (Bokulich y Bamforth, 2013). Entre los microorganismos importantes que deterioran la cerveza se incluyen bacterias ácido-lácticas (BAL), bacterias Gram-negativas y levaduras del género *Brettanomyces* así como otras levaduras salvajes (Esmaeili y cols., 2015).

Estos microorganismos estropean la cerveza convencional a través de la acidificación y la formación de turbidez, entre otras consecuencias. Sin embargo, estas características son deseables en la elaboración de cerveza tipo sour, siempre que estén correctamente balanceadas. Por tanto, es necesario conocer estos grupos microbianos y sus características más importantes para comprender el proceso de acidificación de la cerveza (Bossaert y cols., 2019).

#### **Bacterias ácido-lácticas (BAL)**

Son la principal fuente de ácido láctico en alimentos fermentados como yogur, chucrut, encurtidos, masa madre y cervezas ácidas. Además del ácido láctico, pueden producir

sustancias antimicrobianas, incluidas las bacteriocinas, que tienen la capacidad de inhibir bacterias patógenas que deterioran los alimentos (Bintsis, 2018).

*Lactobacillus* y *Pediococcus* representan dos géneros de BAL que están fuertemente asociados con la producción de ácido láctico en la cerveza sour, aunque otras BAL como *Oenococcus spp.*, *Leuconostoc spp.* y *Lactococcus spp.* también han sido aisladas (Bokulich y Bamforth, 2013).

*Lactobacillus* es un género de BAL Gram-positivo en forma de bastón, entre los cuales *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus delbrueckii* son las especies más importantes en la producción de cerveza (Admassie, 2018) Las cepas de *Lactobacillus* generalmente, son sensibles a la acción de los compuestos antimicrobianos del lúpulo, por lo que, para evitar estos efectos, se emplean lúpulos envejecidos que han perdido parte de su acción antimicrobiana (Sakamoto y Konings, 2003).

*Lactobacillus brevis* es considerada la especie más tolerante al lúpulo de todos los lactobacilos, una propiedad causada por una proteína transportadora, que permite el transporte de compuestos antimicrobianos del lúpulo fuera del citoplasma (Sakamoto y cols., 2001). Por lo tanto, *L. brevis* es la bacteria deteriorante más común encontrada en las cervecerías convencionales.

En la mayoría de los casos, los lactobacilos se inoculan al mosto antes de hervir para evitar la contaminación cruzada en las etapas frías del proceso de elaboración. No obstante, pueden ser inoculados después de la ebullición para retener los volátiles deseables liberados (Peyer y cols., 2017).

El género *Pediococcus* es Gram-positivo, en forma de bastón, importante en la producción de cervezas sour y puede reducir el pH por debajo de 3,0. La especie principal empleada en este tipo de cervezas es *Pediococcus damnosus* (Garofalo y cols., 2015).

*Pediococcus spp.* también soporta un pH inferior que los lactobacilos. Una de sus principales ventajas en la producción de cerveza tipo sour es que disminuye el pH de forma gradual, de esta forma la levadura primaria tiene el tiempo suficiente para completar la fermentación del mosto (Bossaert y cols., 2019).

### **Bacterias Gram-negativas**

Entre las bacterias Gram-negativas podemos encontrarnos con las acetobacterias. Pueden provocar la acidificación de la cerveza, aunque con un producto final diferente (ácido acético). Mientras que el ácido láctico se considera suave y agridulce, el ácido acético a menudo se describe como una acidez más áspera, que en su mayoría se asemeja al vinagre. Sin embargo, si la cerveza contiene ácido láctico, la adición de ácido acético puede, dependiendo de la concentración, aumentar la complejidad del sabor de la cerveza y

dar como resultado un perfil de sabor más estratificado. Una combinación bien equilibrada de ácido láctico y ácido acético es una de las características esenciales que deben poseer las cervezas Lámbicas.

Las acetobacterias son bacterias estrictamente aerobias y son organismos valiosos para la producción de vinagre, ácido glucónico, celulosa, vitamina C, chocolate, kombucha y, a veces, también cervezas ácidas (De Roos y De Vuyst, 2018). El ácido acético se produce mediante la oxidación de fuentes de carbono en etanol, seguida de la oxidación de etanol en acetaldehído y, finalmente, mediante la oxidación de acetaldehído en ácido acético (Mamlouk y Gullo, 2013). Las especies más importantes que se encuentran en las cervezas ácidas son *Acetobacter lambici* y *Acetobacter pasteurianus*. La producción de ácido acético por *Acetobacter spp.* a menudo no es deseable en las cervezas sour, ya que pueden producir rápidamente altas cantidades de ácido acético y acetato de etilo, lo que provoca que la cerveza sepa a vinagre y disolvente (De Roos y cols., 2018).

Las acetobacterias fueron una seria amenaza para la producción de cerveza, pero actualmente su actividad en la producción de cerveza convencional es insignificante, ya que se puede evitar la exposición al oxígeno en fermentadores estancos.

A medida que las concentraciones de oxígeno disuelto disminuyen en las cervezas con la introducción de técnicas modernas proliferan nuevos contaminantes de naturaleza anaerobia obligatoria como los microorganismos pertenecientes a la familia *Veillonellaceae*, incluidos en ella los géneros *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Selenomonas*, y *Zymophilus*. Los miembros de esta familia pertenecen al filo Firmicutes (Bokulich y Bamforth, 2013). Los defectos provocados por este grupo de bacterias son la formación de turbidez, producción excesiva de ácido propiónico, ácido acético, sulfuro de hidrógeno y mercaptanos, e inhibición del crecimiento de levadura con la consecuente merma en la producción de alcohol (Chowdhury y cols., 1997).

### ***Brettanomyces spp.* y otras especies**

Aunque la proliferación de *Brettanomyces spp.* no es deseada en muchos estilos de cerveza, estas levaduras desempeñan un papel fundamental en fermentaciones específicas de cerveza, como en la producción de cervezas lámbicas belgas y cervezas coolship americanas, particularmente mediante *Brettanomyces bruxellensis* (Steensels y cols., 2015). En estas fermentaciones espontáneas, levaduras del género *Brettanomyces* viven en perfecta armonía con microorganismos como BAL y las acetobacterias. Las levaduras del género *Brettanomyces* son responsables de muchas de las características organolépticas típicas de estas cervezas.

Las levaduras del género *Brettanomyces* pueden utilizar sustratos que *Saccharomyces spp.* no se puede utilizar, como dextrinas, celobiosa y nitrato. Las dextrinas, como la maltotriosa y la maltopentosa, están presentes como azúcares residuales después de la fermentación alcohólica en la cerveza. *Brettanomyces* produce glucosidasas, lo que le permite hidrolizar estos azúcares en glucosa, residiendo en la fermentación durante mucho tiempo. Como consecuencia, *Brettanomyces spp.* se puede utilizar para la producción de cervezas muy atenuadas (Colomer y cols., 2019).

La producción de  $\beta$ -glucosidasas es particularmente ventajosa para sobrevivir en las barricas de madera donde se produce la fermentación y maduración en este tipo de cervezas, especialmente cuando la disponibilidad de nutrientes es baja o las barricas se vacían ya que permite la degradación de la celobiosa presente en la madera. (Steensels y cols., 2015).

En la fermentación por *Brettanomyces* hay que destacar la producción de fenoles volátiles, incluidos 4-etilfenol (4-EP) y 4-etilguayacol (4-EG), estos compuestos contribuyen al perfil de sabor característico de las cervezas lámbicas. El umbral de detección de estos compuestos es muy bajo, con diversos descriptores de sabor y aroma que incluyen el sudor de caballo, especiado, medicinal y ahumado, entre otros (Lentz, 2018). *Brettanomyces spp.*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces custersii*, y *Brettanomyces anomalus*, son contaminantes indeseables para la mayoría de las cervezas y otras bebidas alcohólicas debido a la producción de dichos aromas (Uscanga y cols., 2003).

Además de las levaduras del género *Brettanomyces* Van der Aa Kühle y Jespersen (1998) aislaron e identificaron 126 levaduras salvajes. En la composición de las levaduras aisladas se observó que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* salvajes representaba más del 57% de las contaminaciones. También se identificaron levaduras como *Pichia fermentans*, *P. anomala*, *P. membranaefaciens*, *Candida tropicalis* y *C. boidinii*.

Como las acetobacterias, estas levaduras son comunes en las cervecerías, especialmente en los puertos de muestreo sin lavar y en otras superficies que entran en contacto con la cerveza. Son contaminantes oportunistas que causan deterioro cuando las condiciones son favorables (Bokulich y Bamforth, 2013).

En la Tabla 1 se muestran sintetizadas las características más importantes de los microorganismos habituales en la fermentación espontánea, así como la idoneidad y modo de uso en cervezas de tipo sour.

**Tabla 1.** Principales características de los microorganismos presentes en la fermentación espontánea.

Grupo	Género	Especies	Características	Uso en cerveza tipo sour
BAL	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Sensible a la acción de los compuestos antimicrobianos del lúpulo	Empleo con lúpulos envejecidos
		<i>Lactobacillus brevis</i>	Tolerante a la acción de los compuestos antimicrobianos del lúpulo	Especie más recomendada.
		<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Sensible a la acción de los compuestos antimicrobianos del lúpulo	Empleo con lúpulos envejecidos
	<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus damnosus</i>	Acidificación rápida del mosto	Recomendada para pre-acidificación del mosto
		<i>Pediococcus spp.</i>	Producción gradual de ácido láctico. Soporta un pH inferior que <i>Lactobacillus</i>	Recomendada para fermentación mixta
Gram-negativas	<i>Acetobacter</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	Dependiendo de la concentración de ácido acético producido, aumento de la complejidad del sabor de la cerveza	Uso recomendado, ya que una combinación balanceada de ácido acético y láctico es fundamental
		<i>Acetobacter lambici</i>		
		<i>Acetobacter spp.</i>	Producción de altas cantidades de ácido acético y acetato de etilo	No recomendada
	<i>Pectinatus, Megasphaera, Selenomonas, y Zymophilus</i>	_____	Turbidez, producción excesiva de ácido propiónico, ácido acético, sulfuro de hidrógeno y mercaptanos, e inhibición del crecimiento de levadura	Bacterias deteriorantes de la cerveza
Levaduras	<i>Brettanomyces</i>	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Producción de fenoles volátiles	Uso recomendado
	Otras levaduras salvajes	<i>S. cerevisiae, P. fermentans, P. anomala, C. tropicalis y C. boidinii.</i>	Producción de sabores extraños producidos por ésteres y compuestos fenólicos, la formación de turbidez y sedimentos	Uso no recomendado, exceptuando <i>S. cerevisiae</i>

### 3.2. Control de las etapas de fermentación

Durante la fermentación espontánea tradicional no se tiene mayor control que la experiencia, ya que la cerveza se deja fermentar y madurar durante 1-3 años a temperatura ambiente en barricas de madera de roble. Pero siguiendo las etapas fermentativas de la cerveza lámbica podemos hacernos una idea de los parámetros a controlar durante la fermentación.

El mosto llega al enfriador “coolship” con aproximadamente un 5% de azúcar por peso de agua y un pH alrededor de 5, que es similar al de otras cervezas, junto con una variedad de proteínas y ácidos grasos y otros compuestos (Erbe y Brückner, 2000). Las bacterias entéricas, son las primeras en afianzarse en este entorno, y se encuentran en números significativos después de tres o cuatro días. Las bacterias entéricas consumen principalmente glucosa, lo que reduce la gravedad específica del mosto de 1050 a 1040 después de las primeras tres semanas. Las enterobacterias son responsables de la producción de ácido acético y el pH del mosto desciende a 4,5 en la primera semana de fermentación. El ácido acético se encuentra en concentraciones de 40 a 120 mg/L, muy cerca de la cantidad que se encuentra en el producto final (Dicaprio y Edwards, 2013).

Un pH bajo (por debajo de 4,5) y una concentración de etanol superior al 2% en volumen es un ambiente hostil para las enterobacterias, y las especies de *Saccharomyces* pueden dominar la flora en el mosto una vez se dan estas condiciones alrededor de los 30 a 60 días de fermentación.

Al igual que en la fermentación controlada, *Saccharomyces* es responsable de la mayor parte de la producción y atenuación de etanol en las cervezas lámbicas. Las levaduras consumen todos los azúcares que se encuentran en el mosto (glucosa, maltosa y algo de maltotriosa). Al final de la fase de *Saccharomyces*, con una duración de 8 meses, el contenido de etanol de la cerveza se estabiliza entre el 5 y el 7% en volumen y se mantiene alrededor de ese valor hasta el final de la fermentación (Guinard, 1990).

Al mismo tiempo, tras 30-60 días, las BAL dominan la flora bacteriana. En este momento, *Lactobacillus* y *Pediococcus* se encuentran en grandes cantidades y ambos géneros son responsables de la mayor parte del ácido láctico en el producto final. Las bacterias ácido-lácticas aumentan en número hasta alrededor del séptimo mes de fermentación, coincidiendo con el inicio del verano y las temperaturas más cálidas, alcanzando concentraciones de  $10^4$  UFC/mL de mosto (Spitaels, 2014).

Al alcanzar el octavo mes, *Brettanomyces* releva a *Saccharomyces* y continúa consumiendo azúcares en el mosto. La atenuación final puede alcanzar más del 80% en las cervezas

lámbricas a través de la acción continua de *Brettanomyces*, que a menudo se denomina sobreatenuación o superatenuación.

Aproximadamente 16 meses después del inicio de la fermentación, durante esta etapa, el pH de la cerveza alcanza un mínimo de aproximadamente 3.0, que luego aumenta ligeramente en los meses siguientes a 3.2-3.4, debido a la esterificación enzimática de ácidos orgánicos por *Brettanomyces* (Guinard, 1990).

Actualmente, gracias a la experimentación se llevan a cabo diferentes métodos de fermentación espontánea, semi-espontánea y de cultivo puro para la producción comercial. Un ejemplo de esto, es el método de acidificación del mosto donde la fermentación mediada por *Lactobacillus* para la producción de ácido láctico se lleva a cabo antes de la fermentación por levaduras (ya sea por *Saccharomyces*, *Brettanomyces* o ambos) en barricas de roble (Tonsmeire, 2014).

Kumara y Verachtert (1991) probaron una estrategia para simplificar y acortar el proceso de producción, así como para lograr un mejor control del proceso. El método consiste en fermentar el mosto de una cerveza lámbica durante un período corto ( $\leq 48$ h) a 28 °C con *S. cerevisiae* para obtener un mosto sin azúcares fermentables. A continuación, se eliminan las células de levadura y el mosto fermentado previamente se pasteuriza antes de inocular con una población mixta obtenida de una cerveza lámbica de 1 año de fermentación espontánea. Los autores concluyeron afirmando que la inoculación de poblaciones mixtas a partir de mostos de cervezas lámbicas fermentadas durante un año y la aplicación de 28 °C como temperatura de fermentación podría ser un primer paso para hacer que la fermentación sea más económica sin afectar la noción de que es una fermentación natural.

Osburn y cols. (2018) también probaron 284 cepas de levaduras aisladas en fermentaciones de cerveza a pequeña escala para determinar su rendimiento de fermentación. A través de pruebas sensoriales de las cervezas resultantes, los autores observaron que muchas de las cepas generaban cervezas similares a las de tipo sour debido a la capacidad de producir ácido láctico.

Tanto en la industria como en la investigación se ha explorado la aplicación de una etapa inicial de acidificación biológica. Esta etapa se puede llevar a cabo en la cuba de maceración, en la caldera de elaboración del mosto o después de que el mosto se haya transferido al fermentador. El concepto es utilizar la capacidad de las BAL para producir grandes cantidades de ácido láctico en el mosto (generalmente sin lúpulo) en un período corto de tiempo (24-48 h), hervir el mosto para detener la fermentación bacteriana (generalmente con la adición de lúpulo) y después realizar una fermentación con una sola cepa de levadura de cerveza convencional.

### **3.3. Causas de contaminación microbiana en microcervecías**

La estabilidad microbiológica del producto final puede verse comprometida desde una etapa muy temprana en su producción, con organismos de descomposición capaces de acceder al proceso de elaboración de la cerveza en cada etapa, incluso durante la recepción de la materia prima (Hill, 2009).

Los contaminantes primarios se originan en las materias primas y los recipientes de la sala de cocción. Los contaminantes secundarios se introducen en la cerveza durante el embotellado, enlatado o barril. Si bien aproximadamente la mitad de los problemas microbiológicos documentados se pueden atribuir a contaminaciones secundarias, las consecuencias de las contaminaciones primarias pueden ser más notorias (Vaughan y cols., 2005).

La mayoría de los contaminantes potenciales de la cerveza se originan en materias primas y/o equipos de elaboración de cerveza que no están limpios. Las materias primas de elaboración de la cerveza, como la malta, el lúpulo y ocasionalmente el agua de elaboración, pueden ser infectadas por microorganismos y estos deben ser eliminados durante el proceso para evitar el deterioro del mosto y la cerveza (Hill, 2009).

El crecimiento de microorganismos puede ocurrir durante el proceso de elaboración de la cerveza debido al ambiente rico en nutrientes del mosto, complementado por factores de crecimiento que son producidos por la levadura cervecera. El carácter de deterioro de un organismo particular dependerá de la etapa en la que se encuentra en el proceso de elaboración de la cerveza.

Por ejemplo, la levadura de cerveza debe considerarse un contaminante si se detecta después de la filtración de la cerveza. Sin embargo, el crecimiento microbiano en la cerveza convencional está restringido por la presencia de inhibidores, como compuestos de lúpulo, alcohol y dióxido de carbono, y condiciones inhibitorias como niveles bajos de nutrientes y oxígeno y pH bajo (Vaughan y cols., 2005).

#### ***Malta y cebada***

Los efectos de la contaminación de la cebada en crecimiento, almacenada o malteada son variados. El efecto más conocido de la microbiota tanto de la cebada como de la malta es el de la reducción de la estabilidad del gas o la expulsión espontánea de cerveza de su recipiente (Sarlin y cols., 2005).

La microbiota esperada de la cebada consiste en mohos que contaminan y colonizan el grano en el campo y mohos que crecen en los granos durante el almacenamiento. La presencia de moho en la cebada puede afectar negativamente la calidad de la malta, el mosto y la cerveza. (Flannigan, 1999). Una segunda consecuencia de la infección por

hongos de la cebada y la malta es el potencial de liberación de micotoxinas. La aflatoxina B1, la ocratoxina A, la zearalona, el deoxinivalenol (DON) y las fumonisinas B1 y B2 son micotoxinas que pueden transmitirse de los cereales contaminados a la cerveza. Además del daño potencial a los humanos, las micotoxinas pueden afectar la fermentación debido a su influencia en la actividad de la levadura (Hill, 2009).

### **Agua**

La calidad del agua generalmente está asegurada. El agua utilizada para la elaboración de cerveza debe ser apta para el consumo humano. Como tal, debe estar libre de organismos contaminantes. Sin embargo, lo que es apto para beber no es necesariamente apto en la elaboración de cerveza.

El agua empleada para la maceración queda libre de microorganismos tras la cocción del mosto, pero desde un punto de vista microbiológico, la principal preocupación es la introducción de microorganismos tras introducción de agua después de la fermentación, por ejemplo, durante la dilución de la cerveza después de la elaboración de alta gravedad (Hill, 2009).

### **Macerado**

El crecimiento de bacterias termófilas puede presentar problemas durante el macerado si la temperatura desciende o el mosto sin lúpulo se mantiene a temperaturas inferiores a 60° C. Si bien la mayoría de BAL son sensibles a los compuestos del lúpulo y no sobreviven en el mosto después de su adición durante la ebullición del mosto, el crecimiento descontrolado de las BAL antes de la adición puede hacer que el mosto tenga sabores desagradables indeseables (Vaughan y cols., 2005).

### **Mosto**

El mosto puede ser contaminado también por bacterias coliformes desde un suministro de agua contaminada o permitiendo la filtración de líquido en el mosto desde las conexiones de tuberías con fugas.

### **Levadura**

La fuente más común de contaminación bacteriana en la cervecería es probablemente la levadura que puede transferir contaminantes de la fermentación al producto acabado. Después del hervido y la adición de lúpulo, el mosto se clarifica, enfría y airea de modo que proporcione un medio ideal para el crecimiento y fermentación de la levadura. Sin embargo, este mosto también es un medio ideal para el crecimiento de ciertos contaminantes, que pueden introducirse con la levadura de cerveza durante la aireación del mosto o como resultado de una limpieza y desinfección inadecuadas del equipo. La contaminación de la

levadura de lanzamiento compromete la calidad y el sabor del producto y puede tener un efecto significativo en la cerveza final (Hill, 2009).

### **Aire**

Además de las fuentes de contaminación anteriormente mencionadas, las corrientes de aire pueden llevar contaminación microbiana al área de llenado desde numerosas fuentes, incluidos pasteurizadores, desagües, personal, montacargas, material de embalaje y el entorno externo.

### **Dispensadores**

Algunas microcervecerías cuentan con servicio hostelero, en ellas otra vía de contaminación son los sistemas dispensadores. Las cervezas en barril, libres de contaminantes, a menudo se degradan después del acoplamiento de este a un sistema de dispensación. El sistema de dispensación está expuesto a los microorganismos presentes en el entorno de salida de la cerveza a través del grifo abierto y durante el cambio de barriles. Los microorganismos encontrados en las cervezas servidas en los locales hosteleros son distintos de los que se encuentran comúnmente en las microcervecerías, lo que indica que la contaminación se origina en el entorno de dispensación. La biopelícula formada por los microorganismos encontrados en dispensadores proporciona protección contra los procedimientos de limpieza de la línea (Vaughan y cols., 2005).

*Lactobacillus brevis* es el microorganismo del que más reportes ha habido por estropear la cerveza debido a que es muy resistente a los compuestos antibacterianos del lúpulo y es termorresistente. En concreto, más de la mitad de las incidencias reportadas por deterioro de la cerveza se deben a esta bacteria (Hollerová y Kubizniaková, 2001).

## **3.4. Prevención de la contaminación microbiana en microcervecerías**

La inocuidad alimentaria puede considerarse como el conjunto de actividades durante las distintas etapas de elaboración cuyo objetivo consiste en la eliminación o reducción del riesgo sobre la salud de las personas. Por ello, es necesario el control de las etapas y las acciones que se realizan en ellas para asegurar que tanto los productos empleados, así como las acciones llevadas a cabo son inocuas para el consumidor. Para garantizar la inocuidad alimentaria, las empresas alimentarias generalmente se someten a distintas certificaciones.

Un mínimo fallo en los procedimientos de desinfección e higiene en las microcervecerías, además de afectar a la inocuidad de la cerveza, puede afectar a sus características organolépticas e incluso puede provocar la retirada de lotes enteros, lo que supone grandes pérdidas económicas.

La prevención de la contaminación microbiana de la cerveza se logra controlando el acceso de contaminantes a los materiales dentro de la cervecería (Hammond, 1999). Sin embargo, el proceso de elaboración de la cerveza no es aséptico y técnicamente no es posible la eliminación completa de los microorganismos de todos los materiales de elaboración de la cerveza. Se pueden adoptar varias estrategias para minimizar el riesgo de contaminación.

El primer paso para controlar la microbiota en la cervecería es obtener materias primas que porten cargas microbianas bajas o inofensivas. Estas materias primas sufren procesos que ayudan a reducir su carga microbiológica, como la filtración de cerveza, el uso de temperaturas elevadas durante la maceración, el hervido del mosto y el almacenamiento de levadura y cerveza a bajas temperaturas.

Las instalaciones de producción y envasado de cerveza deben estar diseñadas higiénicamente para eliminar los problemas de contaminación que puedan surgir en equipos como tanques, tuberías, juntas y accesorios (Storgårds, 2000). Una adecuada elección de equipos y materiales, eliminación o minimización de espacios muertos y superficies rugosas, correcta construcción, diseño del proceso y automatización, son cruciales para minimizar los riesgos de contaminación.

La importancia de los procedimientos de limpieza y desinfección para las pequeñas y grandes cervecerías ha aumentado significativamente debido a la vulnerabilidad microbiológica de ciertos productos como las cervezas no pasteurizadas, mayoritarias en las microcervecerías.

Uno de los aspectos más importantes de la gestión de la producción de cerveza es mantener en óptimas condiciones todos los equipos que entran en contacto con la cerveza o sus precursores mediante una limpieza regular con detergentes aprobados, no solo dentro de la cervecería, sino también en el punto de dispensación en el caso de cerveza de barril.

Hammond y cols. (1999) sugieren que al aprovechar la actividad antimicrobiana de los componentes de la cerveza, como el dióxido de carbono disuelto y los compuestos fenólicos, se podría reducir la susceptibilidad de la cerveza al deterioro y se podrían minimizar los efectos de la contaminación fortuita. Con la tendencia actual de los consumidores hacia la no conservación química de los alimentos y las regulaciones más estrictas con respecto a su uso, el uso de componentes inhibidores de origen natural ofrece un medio alternativo para mejorar la estabilidad microbiológica de la cerveza.

#### **3.4.1. Mejora de la estabilidad microbiológica de la cerveza**

Existen grandes variaciones en la susceptibilidad de las cervezas al deterioro microbiano. Las cervezas con baja acidez, concentraciones de alcohol y dióxido de carbono bajas y las cervezas con azúcar agregado son las más propensas a estropearse. Los estudios sobre

las funciones de los componentes de la cerveza, como el dióxido de carbono disuelto, los compuestos fenólicos, los compuestos de lúpulo no disociados y el dióxido de azufre no disociado, han demostrado que éstos tienen un impacto positivo en determinadas condiciones sobre la estabilidad biológica de la cerveza (Vaughan y cols., 2005).

Este apartado se centrará en los efectos de compuestos antimicrobianos que son producidos por BAL, componentes del lúpulo y dióxido de carbono sobre la estabilidad microbiológica de la cerveza.

### **BAL**

Las BAL producen una variedad de sustancias antimicrobianas, que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas y alterantes. Dichos compuestos antimicrobianos producidos por BAL son responsables de la acción conservante en la cerveza. Entre ellos se incluyen ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono y compuestos de bajo peso molecular llamados bacteriocinas.

El principal metabolito de la fermentación de BAL es el ácido láctico. Durante su crecimiento, el ácido láctico provoca una reducción del pH en el medio de crecimiento. El ácido láctico alcanza un estado de equilibrio con sus formas no disociadas y disociadas, dependiendo del pH. A un pH bajo, una gran cantidad de ácido láctico está presente en forma no disociada y puede inhibir el crecimiento de muchos microorganismos. Además del efecto del pH, la forma no disociada del ácido láctico puede colapsar el gradiente electroquímico de protones, provocando bacteriostasis y la muerte de las células microbianas susceptibles (Stratford y Eklund, 2003).

La aplicación del ácido láctico producido por BAL para la acidificación biológica del mosto ofrece muchas ventajas y se ha practicado durante siglos en las fábricas de cerveza donde se sigue estrictamente la Ley de Pureza alemana o 'Reinheitsgebot' (Vaughan y cols., 2005).

El pH del macerado o mosto se puede ajustar agregando malta ácida al macerado, obteniendo extracto de malta ácida o usando una porción de mosto para fermentación por una cepa BAL, después de lo cual se devuelve al mosto sin fermentar restante.

La malta ácida está enriquecida en ácido láctico, por lo que cuando se agrega a la molienda, se reduce el pH. Puede producirse usando varios métodos: la cebada en germinación se puede mantener en condiciones anaeróbicas durante 24 horas o más, hasta que se acidifique debido a la acción de BAL presentes de forma natural o, alternativamente, la malta se puede rociar con una suspensión de *L. delbrueckii* y luego incubar a 50 °C durante un período de 24 a 36 h (Lowe y Arendt, 2004).

Generalmente, para la acidificación se utilizan lactobacilos moderadamente termófilos, homofermentativos, que no estropean la cerveza, como *Lactobacillus delbrueckii* o *Lactobacillus amylovorus* a 48 °C. Esta temperatura evita el crecimiento de muchos microorganismos indeseables (Rouse y Van Sinderen, 2008).

Los efectos conservantes producidos por las BAL no se deben solamente a los productos finales de su actividad fermentativa, como el ácido láctico, sino también a la formación de péptidos termoestables de bajo peso molecular llamados bacteriocinas. Son péptidos bioactivos o complejos peptídicos sintetizados ribosómicamente, liberados extracelularmente, que tienen un efecto bactericida o bacteriostático sobre otras especies (Batiha y cols., 2021).

Las bacteriocinas producidas por BAL suelen inhibir especies que están relacionadas filogenéticamente con la cepa productora. Esto es particularmente relevante para la industria cervecera, ya que las BAL causan un gran porcentaje de contaminaciones en los productos cerveceros (Hollerová y Kubizniaková, 2001).

El modo de acción de las bacteriocinas puede diferir, pero la mayoría de las bacteriocinas actúan creando poros en la membrana de las células diana. Esto conduce a la disipación de la fuerza protón-motriz, agotamiento de ATP y/o pérdida de nutrientes y metabolitos en las células afectadas (Ennahar y cols., 2000).

### **Compuestos de lúpulo**

Desde la creación de la “Ley de la pureza de 1516” de Reinheitsgebot, el lúpulo se ha convertido en uno de los ingredientes estándar de la cerveza. Los estudios de las propiedades antibacterianas de los compuestos del lúpulo mostraron que inhiben el crecimiento de bacterias Gram-positivas pero no de bacterias Gram-negativas.

Los ácidos del lúpulo son débiles y las formas no disociadas son responsables de la inhibición del crecimiento bacteriano. Éstos operan como ionóforos portadores móviles y provocan la disipación completa del gradiente de pH transmembrana de las células sensibles. El pH bajo mejora la actividad antibacteriana, mientras que a pH alto los ácidos del lúpulo pierden actividad. Pequeños cambios en el pH de la cerveza provocan grandes cambios en la actividad antibacteriana de ellos (Vaughan y cols., 2005).

El lúpulo por sí solo no protege la cerveza de la contaminación microbiana y debe recordarse que los compuestos de lúpulo sólo inhiben las bacterias Gram-positivas. Al alterar la composición del lúpulo de la cerveza, cambian las propiedades organolépticas y fisicoquímicas del producto final. Sin embargo, la utilización eficiente de los componentes del lúpulo, como por ejemplo, usando extractos de lúpulo para obtener mayor eficiencia, mejora la estabilidad microbiológica de la cerveza.

### ***Dióxido de carbono***

El dióxido de carbono se forma durante la fermentación, su presencia contribuye a que sea microbiológicamente estable. La presencia de CO<sub>2</sub> reduce el pH, que tiene un efecto antimicrobiano. Además, la presencia de CO<sub>2</sub> puede crear un ambiente anaeróbico que inhibe el crecimiento de bacterias aerobias que necesitan oxígeno por su metabolismo (Vriesekoop y cols., 2012).

El CO<sub>2</sub> actúa preservando a través de la reducción del pH y el desplazamiento del oxígeno, pero también debido a un efecto antimicrobiano. La exposición inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Martin y cols., 2003) y niveles más altos de CO<sub>2</sub> en la cerveza se ha asociado con un crecimiento reducido de los agentes alterantes de la cerveza.

### **3.4.2. Agentes desinfectantes en la industria cervecera**

Los agentes desinfectantes utilizados en la industria alimentaria tienen la tarea de hacer que los equipos de producción estén libres de microorganismos después de su uso. Estos desinfectantes están diseñados para funcionar en superficies libres de residuos orgánicos e inorgánicos que proporcionan protección a los microorganismos (Tonsmeire, 2014). Para ello, se emplean agentes de limpieza alcalinos como hidróxido de sodio y fosfato trisódico y agentes de limpieza ácidos, tanto orgánicos como inorgánicos.

#### ***Agentes de limpieza alcalinos***

La composición de los componentes alcalinos de un limpiador determina su alcalinidad. Los residuos de productos ácidos, así como el dióxido de carbono, pueden neutralizar y reducir parcialmente la alcalinidad libre original. El hidróxido de sodio proporciona la mayor alcalinidad, que es uno de los factores clave para eliminar la suciedad orgánica en la limpieza de la cervecería (Loeffler, 2006).

El hidróxido de potasio tiene una capacidad aún mayor para disolver la suciedad que el hidróxido de sodio. Sin embargo, solo se utiliza en aplicaciones limitadas debido a que es más caro (Praeckel, 2009).

#### ***Agentes de limpieza ácidos***

La corrosividad, así como la incompatibilidad de la mayoría de los ácidos inorgánicos con otros componentes activos comúnmente usados en productos de limpieza limita su uso principalmente al ácido fosfórico y al ácido nítrico. El ácido sulfúrico se puede utilizar a temperaturas que no superen los 30 °C, mientras que el ácido clorhídrico debe evitarse.

Los criterios más importantes para los ácidos orgánicos son su olor (ácidos carbónicos de cadena corta), solubilidad y fuerza. Los productos comúnmente utilizados de este grupo son ácido fórmico, ácido oxálico, ácido cítrico y ácido láctico (Loeffer. 2006).

En cuanto a la desinfección, los microorganismos pueden ser eliminados tanto física como químicamente. La eliminación física implica tratamiento térmico, rayos X y UV. La desinfección con productos químicos es posible mediante una serie de agentes desinfectantes expuestos en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Sustancias desinfectantes en la industria cervecera (Praeckel, 2009).

Agente activo	Observaciones	Uso
Ácido peracético	Agente desinfectante ácido con efecto oxidante (destruye la membrana celular); los materiales de sellado pueden dañarse con el contacto prolongado; amplio rango de efectividad	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Limpieza de botellas.</li> <li>❖ Limpieza CIP.</li> </ul>
Peróxido de hidrógeno	Agente desinfectante neutro con efecto oxidante; muy respetuoso con el medio ambiente y las aguas residuales ya que se descompone con materia orgánica en el agua y el oxígeno; rango de efectividad muy amplio	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Limpieza CIP</li> <li>❖ Spray</li> <li>❖ Desinfectante</li> </ul>
Hipoclorito de sodio	Desinfectante alcalino con efectos oxidantes; peligro de formación de clorofenol (afecta negativamente el sabor del producto); rango de efectividad muy amplio; al mezclar con soluciones ácidas, se libera cloro gaseoso.	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Limpieza de botellas</li> <li>❖ Limpieza CIP</li> <li>❖ Agua potable</li> <li>❖ Desinfectante</li> </ul>
Dióxido de cloro	Efecto oxidante; sistema de dos componentes que se mezcla in situ cuando se utiliza; costos operativos económicos, pero altos costos de inversión; rango de efectividad muy amplio	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Limpieza de botellas</li> <li>❖ Limpieza CIP</li> <li>❖ Agua potable</li> <li>❖ Desinfectante</li> </ul>
Amonios cuaternarios	Agente desinfectante neutro (tensioactivos); destruye la membrana celular; muy espumoso (no apto para CIP); relativamente difícil de aclarar debido a la actividad de la superficie (se adhiere bien a la superficie)	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Desinfección estática</li> <li>❖ Spray</li> <li>❖ Desinfectante</li> </ul>

En la Tabla 3 se recogen las diferentes estrategias de prevención aplicables en microcervecerías. Cabe destacar que en cervezas tipo sour el empleo de BAL y del lúpulo es un paso necesario, pero con la adición de extractos la prevención es más eficiente. En cuanto al uso de agentes de limpieza, así como desinfectantes, se deberían integrar en un sistema automático "CIP" (Clean In Place) el hidróxido de sodio por su bajo coste con un agente ácido inorgánico de limpieza y ácido peracético como desinfectante.

Las formulaciones a base de ácido peracético se utilizan con frecuencia para la desinfección posterior a la limpieza. El ácido peracético (PAA) penetra en la célula y oxida las enzimas y otras proteínas de forma irreversible. Se ha demostrado que el PAA es eficaz contra las biopelículas. Los agentes pierden rápidamente su actividad en un ambiente básico, por lo que un enjuague cuidadoso después de la limpieza alcalina es esencial (Storgårds y cols., 2006).

**Tabla 3.** Estrategias preventivas de la contaminación microbiana clasificadas por su dificultad de implantación tecnológica como económica.

Método	Características	Dificultad de implantación tecnológica	Dificultad de implantación económica
<b>Extractos del lúpulo</b>	Inhibición de bacterias Gram-positivas	★☆☆	★☆☆
<b>Uso de BAL</b>	Inhibición de crecimiento de bacterias patógenas por acidificación del medio.	★★☆	★☆☆
<b>Carbonatación</b>	Inhibición de microorganismos aerobios.	★☆☆	★☆☆
<b>Hidróxido de sodio</b>	Eliminación de suciedad orgánica.	★☆☆	★☆☆
<b>Hidróxido de potasio</b>	Eliminación eficiente pero con aplicaciones limitadas.	★☆☆	★★★
<b>Agentes ácidos</b>	Alta incompatibilidad con otros productos de limpieza. Limitaciones de temperatura.	★★☆	★☆☆
<b>Ácido peracético</b>	Agente desinfectante por destrucción de membrana celular.	★★☆	★☆☆
<b>Dióxido de cloro</b>	Agente desinfectante por oxidación. Sistema de dos componentes con costes de operación bajos, pero altos de inversión	★★☆	★★★
<b>“CIP”</b>	Sistema automatizado de limpieza. Gasto inicial moderadamente elevado pero amortizable.	★★☆	★★★

#### 4. Conclusiones

A medida que aumenta la producción de cervezas tipo sour y cada vez son más las microcervecías que las producen, surgen muchas formas diferentes de producir este tipo de cervezas, ofreciendo a las microcervecías la oportunidad de explorar nuevas bebidas y diversificar su oferta. Sin embargo, estas cervezas necesitan unos tiempos de producción mayores y son más difíciles de preparar en comparación con la cerveza convencional.

Los desafíos específicos para este sector incluyen la dificultad para reproducir las cervezas, así como un mayor riesgo de contaminar otras cervezas que se elaboran en el mismo entorno, ya que los principales microorganismos que podemos encontrarnos en las fermentaciones de estos estilos de cerveza generalmente se clasifican como contaminantes de la cerveza convencional.

Un mayor conocimiento sobre la microbiología y el desarrollo del sabor en las cervezas tipo sour tradicionales puede ayudar a desarrollar la próxima generación de cervezas ácidas.

Los obstáculos del proceso como el lupulado y la formación y adición de dióxido de carbono son importantes en la prevención del crecimiento de bacterias patógenas en la cerveza estándar, pero que tienen poco efecto sobre la prevalencia y el crecimiento de las bacterias ácido-lácticas. Este hecho es parcialmente beneficioso en la producción de cervezas tipo sour ya que interesa el crecimiento de algunas cepas.

Por tanto, al no ser posible la atenuación completa del desarrollo de microorganismos alterantes exclusivamente con los obstáculos propios del proceso, el objetivo debe ser la implementación de sistemas efectivos de higiene y desinfección complementarios.

Actualmente, la mayoría de las microcervecías podrían implementar el control microbiológico invirtiendo en una estación de limpieza y desinfección "CIP" (Clean In Place). Este control, además de realizarse mediante higiene y desinfección, puede mejorarse con la elección de un método de fermentación con cultivos puros.

Realizando una pre-acidificación del mosto sin lúpulo con cepas de BAL como *P. damnosus* o *L. brevis* con posterior hervido para lograr la muerte celular y adición de extractos de lúpulo podemos evitar la contaminación del mosto y su consecuente sobreacidificación.

Tras el hervido, para aumentar la complejidad del sabor se fermenta la cerveza en un fermentador convencional con el uso de levaduras *Brettanomyces* o una mezcla de *S. cerevisiae* y *Brettanomyces*. Al inocular secuencialmente los diferentes microorganismos (en una primera etapa BAL y posteriormente la levaduras), las condiciones pueden controlarse para cada cultivo individualmente (temperatura, oxigenación, etc.), conduciendo a una calidad final constante.

## 5. Bibliografía

- Admassie, M. (2018). A review on food fermentation and the biotechnology of lactic acid bacteria. *World Journal of Food Science and Technology*, 2(1), 19-24.
- Batiha, G. E. S., Hussein, D. E., Algammal, A. M., George, T. T., Jeandet, P., Al-Snafi, A. E. y Cruz-Martins, N. (2021). Application of natural antimicrobials in food preservation: Recent views. *Food Control*, 126, 108066.
- Barber, X. (2014). *La cerveza en España* (1.<sup>a</sup> ed.). LID Editorial Empresarial.
- Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria: their applications in foods. *Journal of Bacteriology and Mycology*, 6(2), 89-94.
- Bokulich, N. A. y Bamforth, C. W. (2013). The microbiology of malting and brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(2), 157.
- Bossaert, S., Crauwels, S., De Rouck, G., y Lievens, B. (2019). The power of sour-a review: old traditions, new opportunities. *BrewingScience*, 72(3-4), 78-88.
- Cerveceros de España. (2020). *Informe socioeconómico del sector de la cerveza en España 2019* (p. 24). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Chowdhury, I., Watier, D., Leguerinel, I. y Hornez, J. P. (1997). Effect of *Pectinatus cerevisiae philus* on *Saccharomyces cerevisiae* concerning its growth and alcohol production in wort medium. *Food microbiology*, 14(3), 265-272.
- Colomer, M. S., Funch, B. y Forster, J. (2019). The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 30-35.
- De Roos, J. y De Vuyst, L. (2018). Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 115-119.
- De Roos, J. y De Vuyst, L. (2019). Microbial acidification, alcoholization, and aroma production during spontaneous lambic beer production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1), 25-38.
- De Roos, J., Verce, M., Aerts, M., Vandamme, P. y De Vuyst, L. (2018). Temporal and spatial distribution of the acetic acid bacterium communities throughout the wooden casks used for the fermentation and maturation of lambic beer underlines their functional role. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(7).
- Dicaprio, A. y Edwards, J. (2013). *When Beer Goes Sour: An NMR Investigation*.
- Dysvik, A., La Rosa, S. L., De Rouck, G., Rukke, E. O., Westereng, B. y Wicklund, T. (2020). Microbial dynamics in traditional and modern sour beer production. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(14).
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. y Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 85-106.
- Erbe, T., y Brückner, H. (2000). Chromatographic determination of amino acid enantiomers in beers and raw materials used for their manufacture. *Journal of Chromatography A*, 881(1-2), 81-91.
- Esmaili, S., Mogharrabi, M., Safi, F., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A. M. y Bagheripoor-Fallah, N. (2015). The common spoilage microorganisms of beer: occurrence, defects and determination- a review. *Carpathian Journal of Food Science & Technology*, 7(4).
- Flannigan, B. (1999). The microflora of barley and malt. En *Brewing microbiology* (pp. 83-125). Springer.

- Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., Taccari, M., Aquilanti, L. y Clementi, F. (2015). The occurrence of beer spoilage lactic acid bacteria in craft beer production. *Journal of Food Science*, 80(12), 2845-2852.
- Generalitat de Catalunya. (2019). *Guía de prácticas correctas de higiene para pequeños productores de cerveza* (pp. 11-34). Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria.
- Guinard, J. (1990). *Lambic* (Vol. 3). Brewers Publications.
- Hammond, J., Brennan, M. y Price, A. (1999). The control of microbial spoilage of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 105(2), 113-120.
- Hill, A. E. (2009). Microbiological stability of beer. En *Beer: A Quality Perspective* (pp. 163-184). Academic Press.
- Hollerová, I. y Kubizniaková, P. (2001). Monitoring Gram positive bacterial contamination in Czech breweries. *Journal of the Institute of Brewing*, 107(6), 355-358.
- Kumara, H. S. y Verachtert, H. (1991). Identification of lambic superattenuating micro-organisms by the use of selective antibiotics. *Journal of the Institute of Brewing*, 97(3), 181-185.
- Lentz, M. (2018). The impact of simple phenolic compounds on beer aroma and flavor. *Fermentation*, 4(1), 20.
- Loeffler, D. (2006). Modern brewery sanitation. En *Brewing* (pp. 308-334). Woodhead Publishing.
- Lowe, D. P. y Arendt, E. K. (2004). The use and effects of lactic acid bacteria in malting and brewing with their relationships to antifungal activity, mycotoxins and gushing: a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 110(3), 163-180.
- Mamlouk, D y Gullo, M. (2013). Acetic acid bacteria: physiology and carbon sources oxidation. *Indian Journal of Microbiology*, 53(4), 377-384.
- Martin, J. D., Werner, B. G. y Hotchkiss, J. H. (2003). Effects of carbon dioxide on bacterial growth parameters in milk as measured by conductivity. *Journal of Dairy Science*, 86(6), 1932-1940.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2005). *Guía de Mejores Técnicas Disponibles en España en el Sector Cervecerero*. 46-47.
- Montanari, L., Floridi, S., Marconi, O., Tironzelli, M. y Fantozzi, P. (2005). Effect of mashing procedures on brewing. *European Food Research and Technology*, 221(1), 175-179.
- Osburn, K., Amaral, J., Metcalf, S. R., Nickens, D. M., Rogers, C. M., Sausen, C. y Bochman, M. L. (2018). Primary souring: a novel bacteria-free method for sour beer production. *Food Microbiology*, 70, 76-84.
- Pasteur, L. (1879). *Studies on fermentation: the diseases of beer, their causes, and the means of preventing them*. Macmillan & Company. Londres, Reino Unido.
- Peyer, L. C., Zarnkow, M., Jacob, F., De Schutter, D. P., y Arendt, E. K. (2017). Sour brewing: impact of *Lactobacillus Amylovorus* FST2.11 on technological and quality attributes of acid beers. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 75(3), 207-216.
- Praeckel, U. (2009). Cleaning and disinfecting. En *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*, 595-620. John Wiley & Sons.
- 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.
- Sarlin, T., Nakari-Setälä, T., Linder, M., Penttilä, M. y Haikara, A. (2005). Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt. *Journal of the Institute of Brewing*, 111(2), 105-111.

- Sakamoto, K. y Konings, W. N. (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*, 89(2-3), 105-124.
- Sakamoto, K., Margolles, A., Van Veen, H. W. y Konings, W. N. (2001). Hop resistance in the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* is mediated by the ATP-binding cassette multidrug transporter *HorA*. *Journal of Bacteriology*, 183(18), 5371.
- Schurr, B. C., Hahne, H., Kuster, B., Behr, J. y Vogel, R. F. (2015). Molecular mechanisms behind the antimicrobial activity of hop iso- $\alpha$ -acids in *Lactobacillus brevis*. *Food Microbiology*, 46, 553-563.
- Spitaels, F., Wieme, A. D., Janssens, M., Aerts, M., Daniel, H. M., Van Landschoot, A. y Vandamme, P. (2014). The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. *PLOS ONE*, 9(4), e95384.
- Spitaels, F., Wieme, A. D., Janssens, M., Aerts, M., Van Landschoot, A., De Vuyst, L. y Vandamme, P. (2015). The microbial diversity of an industrially produced lambic beer shares members of a traditionally produced one and reveals a core microbiota for lambic beer fermentation. *Food Microbiology*, 49, 23-32.
- Spitaels, F., Wieme, A. D., Snauwaert, I., De Vuyst, L. y Vandamme, P. (2017). Microbial ecology of traditional beer fermentations. *Brewing microbiology: current research, omics and microbial ecology*, 179-196.
- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H. y Verstrepen, K. J. (2015). *Brettanomyces* yeasts - From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 24-38.
- Storgårds, E. (2000). *Process hygiene control in beer production and dispensing*. Technical Research Centre of Finland. Espoo, Finlandia.
- Storgårds, E., Haikara, A. y Juvonen, R. (2006). Brewing control systems: microbiological analysis. In *Brewing* (pp. 391-426). Woodhead Publishing.
- Stratford, M. y Eklund, T. (2003). Organic acids and esters. En *Food preservatives* (pp. 48-84). Springer. Boston, Estados Unidos.
- Tamime, A. Y. (Ed.). (2009). *Cleaning-in-place: dairy, food and beverage operations* (Vol. 13). John Wiley & Sons. Ayr, Reino Unido.
- Tonsmeire, M. (2014). *American sour beer: innovative techniques for mixed fermentations*. Brewer Publications.
- Uscanga, M. A., Délia, M. L. y Strehaiano, P. (2003). *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(2), 157-162
- Van der Aa Kühle, A. y Jespersen, L. (1998). Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. *International Journal of Food Microbiology*, 43(3), 205-213
- Vaughan, A., O'Sullivan, T. y Van Sinderen, D. (2005). Enhancing the microbiological stability of malt and beer - a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 111(4), 355-371.
- Verachtert, H. y Derdelinckx, G. (2014). Belgian acidic beers: Daily reminiscences of the past. *Cerevisia Belgian Journal of Brewing and Biotechnology*, 38(4), 121-128
- Verachtert, H. y Iserentant, D. (1995). Properties of Belgian acid beers and their microflora. The production of Gueuze and related refreshing acid beers. *Cerevisia. Belgian Journal of Brewing and Biotechnology*, 20(1), 37-41
- Vriesekoop, F., Krahl, M., Hucker, B y Menz, G. (2012). 125th Anniversary Review: Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly. *Journal of the Institute of Brewing*, 118(4), 335-34