



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE
CENTRO REGIONAL UNIVERSITARIO BARILOCHE

Contaminantes microbianos en cerveza artesanal:
incidencia, factores de susceptibilidad y desarrollo
de estrategias de control para el sector productivo

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctora en Biología

Lic. Mailén A. Latorre

Director: Dr. Diego Libkind

2022

El sector productivo de cerveza artesanal de Argentina ha crecido notablemente durante los últimos 20 años. Sin embargo, las microcervecerías raramente establecen criterios microbiológicos y políticas que garanticen la calidad de sus productos. Esta observación motivó la realización de esta tesis doctoral cuyo objetivo general fue estudiar la incidencia de contaminaciones microbianas en cervezas artesanales de los principales polos productivos de Argentina, identificar a los principales microorganismos contaminantes y estudiar su relación con parámetros fisicoquímicos y sensoriales para diseñar estrategias de prevención y control. Para responder a este objetivo, se utilizaron medios de cultivo especializados para detectar las contaminaciones, se midieron sus propiedades fisicoquímicas y se evaluaron sensorialmente a las cervezas en busca de descriptores asociados a la presencia de contaminantes. Se analizó un total de 155 muestras de cerveza artesanal en formato de botella y de tanques de cerveza terminada en fábrica, abarcando 56 fábricas de cerveza de los principales polos productivos del país (Patagonia Andina, Costa Atlántica, Córdoba y Santa fé). Los microorganismos involucrados en las contaminaciones, fueron aislados e identificados utilizando abordajes genéticos y quimiotaxonómicos y se conformó la primera colección de microorganismos contaminantes de cerveza del país. Los resultados pusieron en evidencia que las cervezas argentinas no son ajenas a la problemática que causan las contaminaciones microbianas, ya que se pudo demostrar que la incidencia de contaminación en cervezas artesanales de argentina se encontró cercana al 50 %. Las contaminaciones microbianas resultaron casi 3 veces superiores en muestras embotelladas en comparación con muestras de cerveza terminada previo a su fraccionamiento y se observó que el 80 % de las cervecerías involucradas presentó al menos una cerveza con indicio de contaminación microbiológica. Se comprobó que las bacterias lácticas predominan en las contaminaciones bacterianas y se pudo relacionar su presencia a un bajo pH y la percepción de acidez en la cerveza contaminada. Por su parte, las levaduras salvajes del género *Saccharomyces* predominaron en las contaminaciones causadas por levaduras y su presencia se pudo relacionar con

diferentes *off-flavors*. Estas levaduras fueron estudiadas en profundidad para evaluar la incidencia de *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* (levadura contaminante considerada a nivel internacional como una levadura muy riesgosa para el producto). Las levaduras contaminantes del género *Saccharomyces* aisladas en este trabajo presentaron alta diversidad genética y el 66 % de las levaduras se identificaron como *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, de las cuales se demostró su capacidad diastática en el 52,4 % de las cepas. Por último, se pudo determinar las cepas de *S. cerevisiae* var. *diastaticus* con el conjunto de características más peligrosas para la producción de cerveza y se obtuvieron por primera vez los valores de letalidad térmica (D y Z) para una levadura *S. cerevisiae* var. *diastaticus* de origen argentino. Los parámetros de inactivación térmica generados en este trabajo servirán para optimizar las condiciones de pasteurización en fábrica, y podrían ser útiles para establecer nuevos criterios de pasteurización que garanticen la seguridad alimentaria y alarguen la vida útil de la cerveza, manteniendo la frescura y calidad sensorial de esta bebida.

The craft beer production in Argentina has grown over the last 20 years. However, microbreweries rarely established microbiological criteria and policies that guaranteed the quality of their products. This fact inspired us to carry out this doctoral thesis, whose objective was to study the incidence of beer spoilers in craft beers from the main productive poles of Argentina, to identify the main microorganism and to study their relationship with physicochemical and sensory parameters with the purpose of design prevention and control strategies. Specialized culture media were used to detect contaminations, physicochemical properties were measured and the beers were evaluated sensorially in search of descriptors associated with the presence of spoilers microorganism. A total of 155 craft beer samples were analyzed in bottle format and from beer tanks (in brewery), covering 56 breweries from the main production poles of the country (Andean Patagonia, Atlantic Coast, Córdoba and Santa Fe). The microorganisms involved in the contamination were isolated and identified using genetic and chemo-taxonomic approaches, and the first collection of beer spoilers microorganism was formed. The results showed that Argentine beers are not immune to the problems caused by microbial contamination, given the it was possible to demonstrate that the incidence of contamination in craft beers from Argentina was close to 50%. Spoilage issues were nearly 3 times higher in bottled samples compared to finished beer samples prior to fractionation, and 80% of the breweries involved were found to have at least one beer with evidence of microbiological contamination. Lactic acid bacteria were predominating in bacterial contamination and their presence could be related to low pH and the perception of acidity in spoiled beer. On the other hand, wild yeasts of the *Saccharomyces* genus predominated in contaminations caused by yeasts and their presence could be related to different off-flavors. These yeasts were deeply studied to evaluate the incidence of *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* (wild yeast considered internationally as a very risky for the product). The wild yeasts of the genus *Saccharomyces* isolated in this work presented high genetic diversity and 66 % of the yeasts were identified as *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, which their diastatic

capacity was demonstrated in 52.4 % of the strains. Finally, it was possible to determine the *S. cerevisiae* var. *diastaticus* yeast strains with the most dangerous set of characteristics for brewing production. Thermal lethality values (D and Z) were obtained for the first time for a *S. cerevisiae* var. *diastaticus* of Argentine origin. The thermal inactivation parameters generated in this work will serve to optimize pasteurization processes in breweries, and could be useful to establish new pasteurization criteria that guarantee food safety and extend the shelf life of beer, maintaining the freshness and sensory quality of beer.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad Nacional del Comahue y al instituto IPATEC y al CONICET por otorgarme la beca que me permitió realizar este trabajo de tesis.

A mi director Diego por su guía y acompañamiento en todo el proceso de la Tesis.

A Juli, Juan y Clara, el team cervecero, sin ellos todo esto no hubiera sido posible.

A mis amigos y mi familia que fueron, literalmente, mi columna vertebral en estos años y me demostraron su amor de todas las formas posibles.

A Luciana Cavallini, Andrea Trochine, Viki Santos y Natalia Ranalli que me ayudaron en varios experimentos.

A los Investigadores Dr. Mathias Hutzler y Dr. Martin Zarnkow del Instituto Weihenstephan de Alemania que me ayudaron en el capítulo IV.

A todas las cervecerías que participaron de esta Tesis con la mejor predisposición.

Resumen	2
Abstract.....	4
Agradecimientos	6
Índice de figuras.....	10
Índice de Tablas	11
Capítulo I - Introducción a la microbiología cervecera	12
Introducción.....	13
La cerveza y el proceso de elaboración	13
La cerveza artesanal en Argentina.....	15
Estilos de cerveza.....	16
La calidad de la cerveza	19
Calidad fisicoquímica	21
Calidad microbiológica.....	24
Principales microorganismos contaminantes y fuentes de contaminación	26
Métodos de detección de contaminantes.....	28
Hipótesis	31
Objetivo General.....	31
Objetivos específicos	31
Capítulo II - Incidencia de contaminantes microbianos en cerveza artesanal.....	32
Introducción.....	33
Materiales y métodos	34
Muestras de cerveza.....	34
Medios de cultivo	35
Caracterización fisicoquímica	36
Análisis sensorial.....	37
Resultados.....	39
Análisis microbiológico de cervezas artesanales	39
Análisis fisicoquímico de cervezas embotelladas	44
Análisis sensorial de cervezas embotelladas de la Patagonia Andina	45
Discusión	48

Capítulo III - Identificación molecular de microorganismos contaminantes	53
Introducción.....	54
Principales bacterias contaminantes.....	54
Principales levaduras contaminantes	56
Métodos de identificación de microorganismos contaminantes	58
Materiales y métodos	61
Identificación basada en métodos moleculares de ADN.....	61
Identificación basada en espectrofotometría de masa (MALDI- TOF MS)	62
Resultados.....	63
Identificación de bacterias.....	63
Identificación de levaduras contaminantes.....	66
Discusión	68
Capítulo IV - Levaduras contaminantes del género <i>Saccharomyces</i>	74
Introducción.....	75
Materiales y métodos	79
Aislamientos	79
Caracterización genética de aislamientos de <i>Saccharomyces</i>	80
Caracterización fenotípica de aislamientos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> contaminantes	83
Resultados.....	86
Caracterización genética de los aislamientos de <i>Saccharomyces</i>	86
Caracterización fenotípica de los aislamientos	90
Discusión	94
Capítulo V - Estrategias de prevención y control de contaminantes en fábrica	101
Introducción.....	102
Materiales y métodos	108
Validación de protocolos de limpieza y sanitización: test de mosto forzado.....	108
Crecimiento y resistencia térmica de <i>S. cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i> en IPA.....	109
Parámetros de letalidad D y Z.....	110
Resultados.....	112
Validación de los protocolos de limpieza	113
Crecimiento y resistencia térmica de <i>S. cerevisiae</i> contaminantes.....	115
Parámetros de letalidad D y Z de la cepa <i>S. cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i> LC 42.....	116
Discusión	118
Consideraciones finales.....	123
Implicancias y perspectivas	124
Conclusiones	129

Bibliografía	131
Anexo I.	150
Anexo II.	152
Publicaciones	156

Índice de figuras

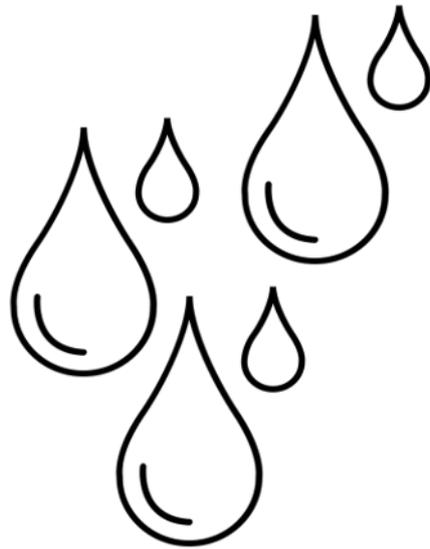
Figura 1.1. Proceso de elaboración de la cerveza.	15
Figura 1.2. Principales estilos de cerveza.	17
Figura 1.3. Cambios sensoriales durante el envejecimiento de la cerveza.....	21
Figura 1.5. Comparación morfológica de bacterias adaptadas y no adaptadas a cerveza.	26
Figura 2. 1. Planilla utilizada por los catadores en el análisis sensorial.	38
Figura 2.2. Incidencia de microorganismos contaminantes en 75 muestras de cerveza embotellada producidas por microcervecerías de la Patagonia Andina.	40
Figura 2.3. Incidencia de microorganismos contaminantes en 45 muestras de cerveza terminada provenientes de BBT/fermentador de la Patagonia Andina.	41
Figura 2.4. Incidencia de microorganismos contaminantes en 25 muestras de cerveza embotellada producidas por microcervecerías del centro y costa del país.....	42
Figura 2.5. Incidencia de microorganismos contaminantes en 10 muestras de productos terminados provenientes de BBT/fermentador del centro y costa del país.....	42
Figura 2.6. Relación entre el pH y la presencia/ausencia de bacterias en cerveza artesanal embotellada.	44
Figura 2.7. Relación entre IBUs y la presencia/ausencia de bacterias ácido lácticas (BAL) en cerveza artesanal embotellada.	45
Figura 2.9 Resultados del análisis sensorial de cervezas artesanales.	47
Figura 2.10. Recuentos de UFC/mL de muestras contaminadas únicamente con bacterias.....	48
Figura 4.1. Relación genética basada en bandas de ADNr IGS2-314 de 32 <i>Saccharomyces</i> aislados de cervezas contaminadas y 2 cepas de levaduras cerveceras (S0-4 y US05)	89
Figura 4.2. Porcentaje de esporulación de cepas contaminantes del género <i>Saccharomyces</i> ... 91	
Figura 4.4. Porcentaje de consumo de almidón de cepas de <i>S. cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i> 92	
Figura 5.1. Test de mosto forzado.....	114
Figura 5.2. Capacidad de crecimiento de los aislamientos de <i>Saccharomyces</i> diastáticas en cerveza IPA.	115
Figura 5.3 Tolerancia térmica de <i>S. cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i> a un tratamiento térmico de 0,5 PU (60°C, 30s).....	116
Figura 5.4. Curvas de inactivación microbiana de la cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i> LC42 en cerveza IPA.	117

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Lista de <i>off-flavors</i> encontrados en la cerveza y sus posibles causas.	18
Tabla 1.2. Medios de cultivo empleados para la detección de microorganismos contaminantes de cerveza.	29
Tabla 2.1. Muestras de cervezas artesanales tomadas de botellas o fermentadores/BBT analizadas de dos regiones productivas de Argentina.....	34
Tabla 2.2. Número de muestras contaminadas en Botella y muestras de cerveza terminada antes de ser envasada.....	43
Tabla 3.1. Descripción general de los métodos de identificación y diferenciación de bacterias y/o levaduras relacionadas al entorno cervecero. Tomado de (Hutzler et al., 2015).....	58
Tabla 3.2. Identificación molecular de bacterias contaminantes de cervezas artesanales de la Patagonia Andina, centro y costa atlántica de Argentina	65
Tabla 3.3. Identificación molecular de levaduras contaminantes aisladas de cervezas artesanales de la Patagonia Andina, centro y costa atlántica de Argentina	67
Tabla 4.1. Levaduras del género <i>Saccharomyces</i> aisladas de cervezas artesanales contaminadas de la Patagonia andina durante los años 2016-2019.....	79
Tabla 4.2. Sistemas de PCR en tiempo real para la diferenciación de levaduras de <i>S. cerevisiae</i> (S. c.), <i>S. pastorianus</i> (S. p.) y <i>S. cerevisiae var diastaticus</i> (S.c.d.).	81
Tabla 4.3. Resultados de PCR en tiempo real para diferenciación de <i>Saccharomyces</i> sp.	88
Tabla 4.4. Resumen de resultados de la caracterización genética y fenotípica de levaduras <i>Saccharomyces</i> contaminantes aisladas de la Patagonia Andina.	93
Tabla 5.1. Muestras de mosto tomadas de fermentadores en 13 cervecerías Patagónicas	109
Tabla 5.2. Aislamientos seleccionados según estilo de origen, capacidad de producir fenoles, porcentaje de esporulación y de consumo de almidón.....	109
Tabla 5.3. Resultados de los Test de mosto forzado obtenidos durante los años 2017 y 2019 en cervecerías Patagónicas.	113
Tabla 5.4. Densidad y pH de la cerveza original utilizada como medio de cultivo para el crecimiento de <i>Saccharomyces</i> diastáticas.....	115
Tabla 5.5. Valores D y Z y sus intervalos de confianza, coeficientes de correlación (R) de las regresiones obtenidas a partir de las curvas de supervivencia para LC 42 en cerveza IPA	117
Tabla 6. Posibles aplicaciones científico-tecnológicas de los principales microorganismos aislados de cervezas contaminadas de Argentina	125

Capítulo I

Introducción a la microbiología cervecera



Introducción

La cerveza y el proceso de elaboración

La cerveza es una de las bebidas alcohólicas más populares del mundo. Aunque es difícil definir con precisión el comienzo de su historia, la evidencia arqueológica muestra que el nacimiento de la cerveza data antes del 3000 A. C. Fueron los Sumerios quienes comenzaron a preparar cervezas a partir de granos de cebada y trigo (Li et al., 2017). Los Babilonios (y luego los egipcios) heredaron de ellos las tareas del cultivo de la tierra y la elaboración de cerveza en una tabla de arcilla, la cual explicaba su fórmula de elaboración. Los griegos adoptaron las técnicas de fabricación de cerveza de los elaboradores de Egipto, y a su vez traspasaron este conocimiento a los romanos, que la llamaron "cerevisia", en honor de la diosa Ceres de la agricultura (Hornsey, 2003). Cada pueblo utilizaba los granos de cereales disponibles de cada zona, pero la cerveza de cebada, proviene de Europa, trasladándose desde Armenia, Georgia y el sur de Rusia hasta Bohemia, Alemania, Bélgica e Inglaterra, donde se convertiría en la cerveza que conocemos en la actualidad. Durante el siglo XIX Pasteur descubrió que las levaduras eran las responsables de convertir el azúcar en alcohol en el proceso de fermentación (Pasteur, 1857). Actualmente, se reconoce a la cerveza como el resultado de un proceso biotecnológico, en el cual participan 4 ingredientes: cebada malteada, agua, lúpulo y levadura. La forma de combinar estos ingredientes (y sus variedades) da lugar a una inmensa cantidad de estilos, en los que se resaltan diferentes cualidades. Sin embargo, el proceso de elaboración suele respetarse para todos los estilos. La Figura 1.1 muestra de manera simplificada el proceso de elaboración de cerveza. El mismo consiste en macerar los granos de malta previamente molidos en agua entre 62 y 68°C, para que ocurra la transformación enzimática que convierte el almidón en azúcares fermentables. Los principales carbohidratos fermentables por las levaduras cerveceras, son el trisacárido maltotriosa (15 % p/p), los disacáridos maltosa (45–65 % p/p), la sacarosa (5 % p/p) y los monosacáridos glucosa y fructosa (10 % p/p). Los azúcares no fermentables, principalmente dextrinas, comprenden el 20-30 % p/p de la fracción de carbohidratos,

junto con varios sacáridos que incluyen arabinosa, xilosa, ribosa, isomaltosa, panosa e iso-panosa (Boulton y Quain, 2001).

Al culminar el proceso de maceración, el empaste de malta-agua se enjuaga y se filtra separando los granos (bagazo) del mosto cervecero que contiene los azúcares fermentables, llamado mosto dulce. A diferencia del vino, la sidra y otras bebidas fermentadas, el mosto dulce se somete a un hervor de al menos 60 minutos. Durante el hervor se agrega las flores de lúpulo (*Humulus lupulus*), generalmente en formato de pellet (flores secas y prensadas), para otorgar amargor, sabor y aroma. Además, el objetivo del hervor es eliminar a todos los microorganismos que podrían haber ingresado al mosto con las materias primas. Al culminar el tiempo de hervido, el mosto se centrifuga para que precipiten proteínas y restos de lúpulo, proceso conocido como *Whirlpool*, y se enfría rápidamente hasta la temperatura de fermentación (Briggs et al., 2004; Palmer, 2006;).

El mosto se coloca en un fermentador y se inocula con la levadura cervecera elegida para transformar los azúcares fermentables del mosto en etanol (principalmente) a través del proceso de fermentación alcohólica. El tiempo de fermentación en condiciones estándares puede variar entre 4 y 10 días (Briggs et al., 2004) según la temperatura de fermentación, la levadura utilizada, su tasa de inoculación, la viabilidad y vitalidad del inóculo de levadura y el contenido inicial de azúcar en el mosto (densidad). La fermentación finaliza cuando se alcanza la atenuación deseada¹, y no se perciben dicetonas vecinales (compuestos indeseables como el diacetilo que son reabsorbidos por la levadura luego de consumir los azúcares). Una vez completada la fermentación, se obtiene la cerveza, que es separada de la levadura (que puede o no ser reutilizada en subsiguientes fermentaciones) y la cerveza se madura en frío (1-4 °C) para que se integren los aromas y sabores y mejore la estabilidad física del producto (Palmer, 2006). Al finalizar el proceso de maduración la cerveza se carbonata y luego se envasa en barriles, botellas o latas (Figura 1.1). En algunas ocasiones la cerveza se filtra antes de envasar con el fin de dar claridad y brillo además de retirar las levaduras que se encuentren en suspensión en la cerveza terminada para mejorar su estabilidad. Por último, algunas cervecerías optan por pasteurizar la cerveza para alargar la vida útil del

¹ Atenuación: porcentaje de azúcares consumidos por la levadura cervecera. Cada cepa posee un rango de atenuación esperada.

producto. La pasteurización puede realizarse en línea antes del envasado (pasteurización de flujo) o puede llevarse a cabo sobre la cerveza envasada en las latas/botellas (pasteurización por inmersión).

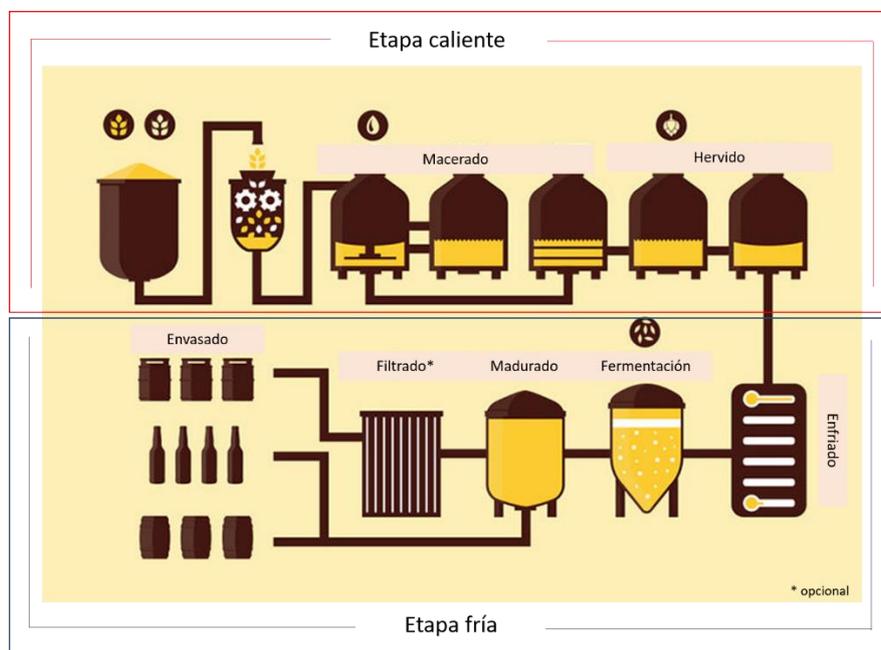


Figura 1.1. Proceso de elaboración de la cerveza tomado con modificaciones de Bernstein, (2017).

La cerveza artesanal en Argentina

La cerveza industrial domina el mercado local, así como el mundial, sin embargo, en los últimos 20 años el segmento denominado artesanal ha ganado posición en el mercado. El Código Alimentario Argentino establece que una cerveza puede comercializarse con la leyenda de “Cerveza Artesanal”, cuando cumpla con las siguientes exigencias: 1) que no utilice en su producción aditivos alimentarios; 2) que se adicione únicamente con ingredientes naturales; 3) que la elaboración sea de manera manual o semiautomática; y 4) que en aquella a la que se agregue jugo o extractos de frutas, éstos deben ser previamente pasteurizados. Por otro lado, en la mayoría de los países que establecen una definición de cerveza artesanal, el común denominador incluye que para ser consideradas artesanales los emprendimientos deben ser independientes (no tener a un gran grupo nacional o extranjero por detrás de sus acciones, o que los mismos no superen el 25 %) (Villacreces et al., 2022). En Argentina la cerveza artesanal surgió como una alternativa laboral luego de la crisis económica sufrida en el año 2001 y desde

entonces, la cerveza artesanal registró un crecimiento continuo hasta la pandemia de COVID-19². Según la Cámara de Cerveceros Artesanales de Argentina (CCAA) el sector artesanal, hasta antes de la pandemia, abarcaba alrededor del 3 % del mercado total de cerveza y luego de la pandemia se cree que pudo caer al 2,5 %. El sector artesanal de producción de cerveza emplea a más de 6500 personas (casi la misma cantidad que emplean las cervecerías multinacionales) y se estima que existen 1900 microproductores en todo el país, (comunicación personal con Federico Villa, Director de Comunicación y Prensa de la CCAA, 2022), frente a 9 grandes cervecerías industriales. En cuanto a producción, los datos registran que pasó de 16 millones de litros en 2015 a 106 millones de litros en 2019 (últimos registros, datos pre-pandemia). Como consecuencia de la pandemia de COVID-19 en la actualidad, ese registro cayó un 30 % y viene recuperándose lentamente³. Por último, se pudo conocer que del total de la producción anual, un 12 % es enlatado/embotellado y el resto es vendido en barriles (comunicación personal con Federico Villa, Director de Comunicación y Prensa de la CCAA, 2022).

Estilos de cerveza

La cerveza se puede clasificar según el tipo de fermentación y, por lo tanto, según el tipo de levadura involucrada. En primera instancia, se reconocen dos grandes familias de cervezas: las cervezas *Ale* que utilizan levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* de fermentación alta o *top fermenting* (fermentan entre 18 y 24 °C), y las cervezas *lager* que involucran levaduras *Saccharomyces pastorianus* de fermentación baja o *bottom fermenting* (fermentan entre 5 y 15 °C) (Stewart, 2017; White & Zainasheff, 2010). A su vez, ambas familias contienen subgrupos de estilos que comparten alguna característica que las diferencian de otro subgrupo (lugar de procedencia, apariencia, aroma, sabor, amargor, cuerpo, color, etc.) dando lugar a una gran variedad de estilos que se puede visualizar en la Figura 1.2. Para facilitar la comprensión y utilizar un lenguaje común que distinga cada estilo, los productores de cerveza de todo el mundo utilizan una guía de

² Elaboración de cerveza artesanal en tiempos de pandemia: <http://enfoco.ffyb.uba.ar/content/elaboraci%C3%B3n-de-cerveza-artesanal-en-tiempos-de-pandemia>

³ <https://elretratodehoy.com.ar/2022/03/16/el-sector-cervecerero-recuperandose-lentamente-de-los-impactos-de-la-pandemia/>

estilos internacional publicada por el Programa de Certificación para Juzgar Cervezas (*Beer Judge Certification Program*) que clasifica en 23 subgrupos y más de 80 estilos (BJCP, 2015). La guía de estilos se pensó inicialmente como una herramienta que reunía un conjunto estandarizado de descripciones de estilos para usar en competiciones de cerveza casera pero luego, esta guía fue adoptada en todo el mundo para describir la cerveza en general, incluso por comerciantes y consumidores.

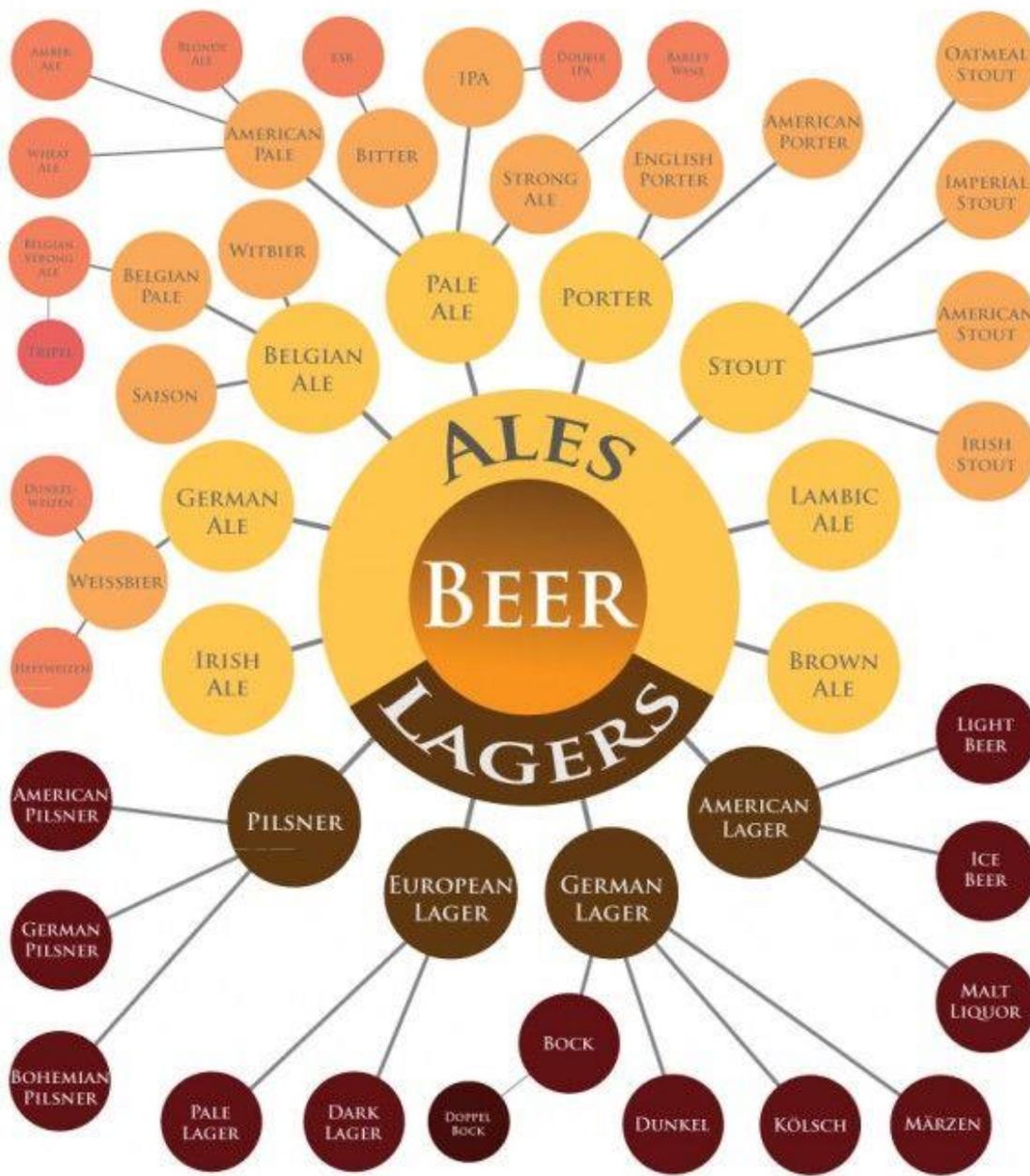


Figura 1.2. Principales estilos de cerveza. Imagen creada por Seidell (2013)

Como ocurre con el vino, la cerveza es evaluada sensorialmente respecto de sus atributos como la apariencia general (color, turbidez y espuma), la percepción de aromas (componentes aportados por la malta, el lúpulo y la levadura), sabores (dulce, ácido, amargo, etc.) y la sensación que la cerveza produce en la boca (cuerpo, cremosidad, calentamiento, carbonatación). En este sentido, conocer las características de un estilo, permite diferenciar aquellas que no forman parte del mismo y también aromas y sabores inapropiados para ese tipo de cerveza. Los aromas y sabores indeseables e inapropiados se los conoce como *off-flavors* y son considerados defectos. El desarrollo de sabores desagradables es uno de los problemas más serios en la industria cervecera porque la mayoría de los consumidores juzgan el producto principalmente por su calidad de sabor (Kamimura & Kaneda, 1992). En la Tabla 1.1 se listan los principales *off-flavors* encontrados en la cerveza junto con las posibles causas según BJCP (BJCP & AHA, 2012).

Tabla 1.1. Lista de *off-flavors* encontrados en la cerveza y sus posibles causas. Tomado de (BJCP & AHA, 2012) con modificaciones.

Descriptor sensorial	Posible causa
<i>Acetaldehído:</i> Manzana verde	Cepa de levadura; remoción temprana de la levadura; baja vitalidad y/o baja tasa de inoculación; baja temperatura de fermentación; baja oxigenación/ sobreoxigenación; falta de nutrientes (Zn); contaminación microbiana.
<i>Ácidos orgánicos:</i> ácido láctico, cítrico, acético	Contaminación microbiana; cepa de levadura; Excesiva acidificación (macerado/agua de lavado).
<i>Alcoholes superiores:</i> Solvente, calentamiento en boca	Cepa de levadura; sub-inoculación; alta temperatura de fermentación; mosto de alta densidad; contaminación microbiana.
<i>Astringencia:</i> persistente aspereza en lengua (Polifenoles)	Molienda de granos muy fina; lavado de granos a temperaturas altas (mayores a 76° C); lavado excesivo de granos; agua de lavado con un PH alto (más del 6); alto contenido de sulfatos en el agua; maltas tostadas y gran contenido de lúpulo (con altos alfa-ácidos) aumentan la astringencia.
<i>Diacetilo:</i> manteca, pochoclos, vainillín (2,3-butanodiona)	Cepa de levadura; remoción temprana levadura; baja vitalidad y/o baja inoculación; baja temperatura de fermentación; baja oxigenación del mosto; deficiencia de nutrientes (Zn); Contaminación microbiana.

<i>Dimetil sulfuro (DMS):</i> Vegetales cocidos, choclo en conserva	Hervor poco vigoroso; baja velocidad de enfriado; maltas “pilsen” contienen mayor cantidad de S-metilmetionina (precursor del DMS); maltas de baja calidad; contaminación microbiana.
<i>Ésteres frutados:</i> pera, banana, manzana roja (hexanoato y octanoato de etilo; Isoamil acetato)	Cepa de levadura; sub-inoculación de levadura; alta temperatura de fermentación; mosto de alta densidad; contaminación microbiana.
<i>Fenoles:</i> Clavo de olor, especiado, ahumado, plástico, medicinal, cuero (4 vinilfenol; 4 vinilguaiacol; 4-etilfenol; 4-etilguaiacol)	Cepa de levadura; presencia clorofenoles en agua; productos sanitizantes a base cloro; contaminación microbiana generalmente causada por levaduras.
<i>Zorrino:</i> (3-Metil-2-butano-1-thiol (MTB))	Deterioro de compuestos del lúpulo; uso de vidrio verde/transparente.
<i>Metálico:</i> hierro, cobre, monedas, a sangre.	Iones metálicos en el agua; deterioro de los equipos de elaboración; oxidación de compuestos de la malta.
<i>Oxidación:</i> cartón, papel mojado (trans-2-nonenal)	Oxidación de compuestos por la presencia de oxígeno post-fermentación.
<i>Pan, levadura</i>	Levadura en suspensión; cepa de levadura; falta de nutrientes (Ca).
<i>Sulfuros:</i> huevos podridos, fósforos quemados	Cepa levadura (Lager > Ale); falta de maduración; levaduras estresadas; autólisis; baja viabilidad y vitalidad de la levadura; contaminación microbiana

La calidad de la cerveza

El concepto de calidad abarca todos los atributos que influyen en el valor de un producto para el consumidor y engloba, por tanto, atributos que tienen relación con las materias primas utilizadas y con el proceso de elaboración (FAO, 2007). En la cerveza, la calidad se mide además conforme a un complejo conjunto de características sensoriales que incluyen apariencia, aroma, sabor y cuerpo. Estos indicadores de la calidad de la cerveza construyen un perfil sensorial específico que los consumidores de cerveza artesanal esperan y disfrutan de una cerveza. Como ocurre con otros productos alimenticios, la cerveza también sufre cambios sensoriales durante el almacenamiento, que definen su vida útil. Comprender la manera en que el perfil sensorial de la cerveza se puede deteriorar con el tiempo es crucial para brindar un producto consistente. Dalglish (1977) describió el “envejecimiento” natural de la cerveza según la evolución sensorial durante el tiempo de almacenamiento (Figura 1.3). Aunque la descripción de Dalglish

proporciona información útil acerca de los principales descriptores sensoriales relacionados con el deterioro natural de la cerveza, los *flavors* asociados al envejecimiento son tan variados como los propios sabores de la cerveza. Sin embargo, independientemente del estilo, la composición química de la cerveza es un sistema dinámico y cambia a lo largo del almacenamiento debido a diversas reacciones oxidativas y no oxidativas (Lehnhardt et al., 2019).

Uno de los primeros cambios generados por el tiempo es la disminución perceptible del amargor, acompañado por un aumento del dulzor. Esto se debe a que los iso-alfa ácidos aportados por el lúpulo son sensibles al oxígeno y se deterioran a medida que la cerveza envejece. La tasa de deterioro depende del tiempo, la temperatura, del contenido inicial de oxígeno en el envase y a la velocidad de incorporación del oxígeno en el envase. Generalmente, la cerveza pierde alrededor del 20 % de los iso-alfa ácidos después de 8 meses a temperatura ambiente (Oliver & Colocchio, 2012). Los productos de oxidación resultantes no se consideran amargos, por lo tanto, a medida que la cerveza envejece, el amargor disminuye (Oliver & Colocchio, 2012). Además de ser sensibles a la temperatura y el oxígeno, los compuestos del lúpulo son sensibles a la luz y cuando se exponen a ella se lleva a cabo una reacción de fotooxidación, creando un compuesto de sabor potente llamado 3-metil-2-buteno-1-tiol (MBT) (Bamforth, 2008; Stewart & Priest, 2006). El MBT es comúnmente conocido como aroma a "zorrino", ya que el compuesto de olor se asemeja al aerosol de defensa desplegado por los zorrinos. Botellas de color verde o transparentes ofrecen poca o ninguna protección contra esta reacción, pero en las botellas color ámbar, el vidrio es altamente efectivo (al menos a corto/mediano plazo o de baja intensidad exposición a la luz). Las latas de aluminio o la cerveza almacenadas en barriles ofrecen la mejor protección contra la exposición a la luz. A pesar de la falta de protección que ofrecen las botellas de vidrio transparente y verde, algunas cervecerías insisten en usarlas, habiéndose convertido el color de la botella en una parte importante de su estrategia de marca (Oliver & Colocchio, 2012).

Otro compuesto determinante en el envejecimiento de la cerveza, es el trans-2-nonenal que aporta aroma a papel/cartón húmedo a la cerveza. Este compuesto es un defecto causado por la oxidación de ácidos grasos insaturados (principalmente ácido linoleico) (Bamforth, 2008). Sin embargo, puede producirse en otras reacciones, en particular la condensación aldólica de acetaldehído y heptanal (Oliver & Colocchio, 2012). El aroma

a pan, caramelo, miel, terroso, paja, heno, madera, vino y jerez son notas que han sido también reportadas en cervezas envejecidas, así como una disminución en las notas afrutadas y florales (Bamforth, 2011; Dalgliesh, 1977).

La estabilidad sensorial de la cerveza, puede verse influenciada por malas prácticas en cualquier punto entre su producción y almacenamiento. Entonces, la estabilidad sensorial de la cerveza estará sujeta a su calidad fisicoquímica y microbiológica. La calidad fisicoquímica incluye aspectos relacionados con la espuma, la turbidez, el color, amargor, la densidad, atenuación y el pH. Por otro lado, la calidad microbiológica se refiere al impacto que generan los microorganismos en la cerveza. Cabe mencionar que a su vez, la calidad microbiológica puede influir directamente sobre muchos de los parámetros fisicoquímicos (Boulton & Quain, 2001; Briggs et al., 2004; Schneiderbanger et al., 2018; Suzuki, 2020).

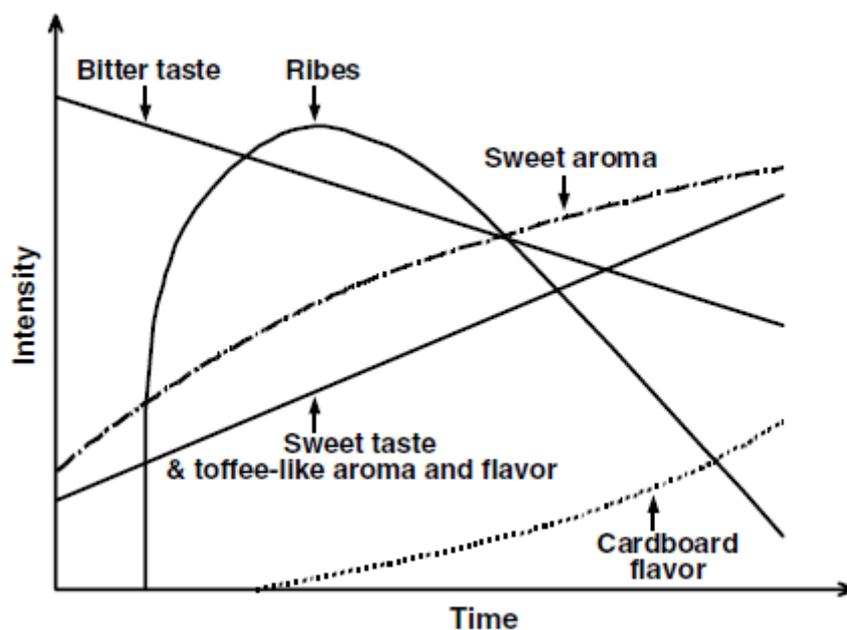


Figura 1.3. Cambios sensoriales durante el envejecimiento de la cerveza según Dalgliesh (1977).

Calidad fisicoquímica

Espuma: es una de las cualidades más atractivas de la cerveza ya que la presentación de la cerveza en el vaso en términos de espuma, claridad / brillo y color, busca atraer al consumidor a través de la apariencia (Bamforth, 2011; Briggs et al., 2004). Sin embargo, la espuma no solo tiene un rol significativo en la presentación de la cerveza, sino que actúa como una superficie de intercambio de gases eficiente para enviar aromas hacia

sensores olfativos de los bebedores (Delvaux et al., 2000). Por lo general, la calidad de la espuma se define como una combinación de su estabilidad en el tiempo, cantidad, adhesión del vidrio del vaso, blancura y cremosidad.

Turbidez: La mayoría de los consumidores esperan que la cerveza sea brillante y clara, y pueden ver a la turbidez de la cerveza como un problema de calidad en los estilos de cerveza tradicionalmente claros. La turbidez puede ser de dos tipos: biológica y no biológica. La turbidez no biológica depende de diversos factores, como el contenido y tipo de proteínas, taninos (polifenoles), del pH, temperatura, oxidación, presencia de sales, agitación y también de condiciones de exposición a la luz (Garcia Garcia, 2012). La cerveza puede ganar turbidez a lo largo del tiempo, gracias a precipitados ligeros o turbidez coloidal, conforme a las proteínas y otros compuestos que se coagulan. Sin embargo, las cervezas con trigo o cervezas con un alto contenido de lúpulo (como las New England IPAs, más conocidas como NEIPAS) son naturalmente turbias, y se han ganado la aceptación de los consumidores. Por otro lado, la presencia de levadura y otros microorganismos pueden producir turbidez biológica como resultado de su crecimiento causando además, defectos sensoriales inaceptables (Briggs et al., 2004).

Color: El color de la cerveza es el factor con mayor influencia en la elección del consumidor. Esto se debe a que las expectativas de sabor de los consumidores pueden depender del color del producto que están consumiendo (Culver & Wrolstad, 2008). El color de la cerveza se debe principalmente a melanoidinas, productos de caramelización y pirólisis, polifenoles oxidados, riboflavina, carotenoides, antocianinas, clorofilas y sus productos de oxidación, así como también catalizadores de la oxidación como son los iones metálicos (Bamforth, 2011; Briggs et al., 2004). De ellos, la fuente primaria de color son las melanoidinas generadas por reacciones de *Maillard* durante el tratamiento térmico del malteado, la cocción, etc. El color de las cervezas se evalúa de acuerdo a dos escalas: la *SRM (Standard Reference Method)* utilizada principalmente en Estados Unidos y la *EBC (European Brewing Convention)* en Europa.

Amargor: el amargor es uno de los sabores que más predomina en la cerveza y su intensidad varía según el estilo. El amargor en la cerveza nace como resultado de la isomerización de los α -ácidos del lúpulo en el mosto durante la cocción. Además de los

iso- α -ácidos, varios productos de oxidación de los β -ácidos (lupulonas) también influyen en el amargor (Briggs et al., 2004). Estas lupulonas se encuentran junto con los α -ácidos en las glándulas lupulínicas de las flores de lúpulo e influyen en el sabor de la cerveza, particularmente cuando se degradan. Los productos de degradación de las lupulonas tienden a aumentar el amargor, mientras que la degradación de los iso- α -ácidos actúa en la dirección opuesta, dando lugar a una pérdida del amargor.

Densidad y atenuación: La densidad del mosto indica la cantidad de azúcares en solución (g/L) y depende directamente de las maltas utilizadas, de la eficiencia del macerador y de las temperaturas de maceración utilizadas. La densidad específica del agua pura es de 1,000 y el mosto tiene una densidad más alta en relación con el agua debido a los azúcares presentes. Cuantos más azúcares se disuelvan en el mosto, mayor será la densidad de la solución. A medida que la levadura consume los azúcares del mosto, la densidad de la solución disminuye, entonces, la diferencia entre la densidad inicial (DI) y final (DF) determina el grado de atenuación según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Atenuación aparente} = [(DI-DF) / (DI-1)] \times 100$$

Cada levadura posee un rango de atenuación esperada ya que las levaduras cerveceras tienen diferentes capacidades para consumir los azúcares del mosto. La densidad final de la cerveza también depende de que la fermentación con la levadura cervecera haya ocurrido correctamente, es decir, que la cantidad, la viabilidad y la vitalidad de las levaduras sean las adecuadas para la fermentación (White & Zainasheff, 2010). En condiciones normales, la diferencia entre DI y DF también determina el contenido de alcohol de la cerveza (White & Zainasheff, 2010).

pH: el pH afecta directamente en todos los bio-procesos que ocurren durante la elaboración de cerveza; por ejemplo, el pH influye en la acción de las enzimas durante la maceración, la extracción y la percepción sensorial de compuestos de amargo, sabor y aroma del lúpulo, la precipitación de proteínas y taninos en el hervor y el crecimiento y el metabolismo de las levaduras en la fermentación (Palmer & Kaminski, 2013).

Calidad microbiológica

La cerveza es considerada una bebida de bajo riesgo microbiológico ya que presenta condiciones desfavorables para la mayoría de los microorganismos: contiene entre 0,5 a 10 % v/v de etanol, sustancias antibacterianas (17 a 55 ppm de iso- α -ácidos), alto contenido de dióxido de carbono (0,5 % p/v), bajo pH (3,8 y 4,7), bajo contenido de oxígeno (menos de 0,3 ppm) y es pobre en nutrientes (Ramírez Muñoz, 2004; Suzuki, 2011; 2015; Back, 1994; Jespersen & Jakobsen, 1996; Suzuki, 2015). Además de estos factores intrínsecos, muchas etapas del proceso de elaboración reducen la carga microbiana del producto, reduciendo el riesgo de potenciales contaminaciones. Estos procesos incluyen maceración, ebullición del mosto, filtración, pasteurización y almacenamiento en frío (Menz et al., 2010a). Sin embargo, se ha estudiado que la cerveza es más susceptible a los microorganismos cuando uno o más de los factores intrínsecos mencionados anteriormente están ausentes o en un nivel reducido (Vriesekoop et al., 2012). Los microorganismos que logran atravesar las barreras intrínsecas de la cerveza, son considerados contaminantes, ya que pueden modificar las propiedades sensoriales y fisicoquímicas de la cerveza, produciendo *off-flavors*, sedimentos, turbidez, exceso de gas, disminución del pH y de la densidad, afectando de manera negativa su calidad. La contaminación microbiana ha demostrado ser uno de los factores limitantes más importantes que afecta a la calidad de la cerveza, cobrando mayor relevancia en las microcervecías artesanales (Back, 2005; Giovenzana et al., 2014; Manzano et al., 2011) ya que la pasteurización y la filtración no son prácticas del todo habituales (Menz et al., 2010b) y los controles de calidad son menos rigurosos e incluso, inexistentes en comparación con las cervecías industriales.

La presión selectiva ejercida por los factores de estrés presentes en la cerveza modeló la adaptación de los microorganismos contaminantes para poder desarrollarse en este medio hostil. Por ejemplo, a pesar de las propiedades antimicrobianas del lúpulo, algunas bacterias Gram positivas han desarrollado la capacidad de adaptarse al contenido de iso- α -ácidos mediante mecanismos de defensa activos y pasivos (Behr, 2008; Sakamoto & Konings, 2003; Suzuki et al., 2006). El mecanismo de resistencia más frecuente se debe a plásmidos que contienen los genes de resistencia homólogos *horA* y *horC* que codifican la producción de proteínas transmembranales que expulsan los iso-

α -ácidos hacia afuera de la célula (Suzuki et al., 2006). También se ha observado que una alteración en la cantidad de ácidos teicoicos de la pared celular y en la composición lipídica de la membrana citoplasmática pueden contribuir a la resistencia a los iso- α -ácidos (Sakamoto & Konings, 2003).

La presencia de etanol en la cerveza, es otro de los factores de estrés que deben enfrentar los microorganismos contaminantes. Se ha encontrado que la exposición al etanol en los microorganismos puede cambiar la composición, estructura y función del citoplasma y la membrana celular, así como también alterar la morfología celular, inhibir la división celular, disminuir la viabilidad celular y reducir la actividad metabólica (Vamvakas et al., 2020; Liu & Qureshi, 2009; D'Amore & Stewart, 1987; Ingram & Buttke, 1984). En levaduras, la composición y estructura de las membranas celulares, los sistemas de transporte de azúcares y organelas como las mitocondrias y las vacuolas parecen desempeñar papeles importantes para contrarrestar los efectos del alcohol (Vamvakas et al., 2020). En bacterias, se han observado cambios tales como la biosíntesis de ácidos grasos, lípidos, peptidoglicano, y proteínas de la membrana externa bacteriana influyen en la tolerancia al alcohol (Liu & Qureshi, 2009; Ingram, 1990). Las bacterias Gram negativas suelen mostrar un fenotipo sensible al etanol mientras que las bacterias Gram positivas, especialmente las BAL, son más tolerantes al etanol (Liu & Qureshi, 2009). Aunque las BAL pueden ser tolerantes a concentraciones mucho más altas de etanol, los mecanismos de tolerancia subyacentes de las bacterias Gram positivas aún no ha sido del todo dilucidado. Se cree que la incorporación de fosfolípidos monoinsaturados de cadena larga (C20–30), como se observó en *Lactobacillus heterohiochii* (aislado de vino de arroz), puede desempeñar un papel importante en la tolerancia al etanol de este tipo de bacterias (Uchida, 1974). Pittet et al. (2011) realizaron un análisis de la tolerancia al etanol de 61 bacterias lácticas para predecir su capacidad de crecer en la cerveza, incluyendo tanto cepas contaminantes de cerveza como no contaminantes de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Pediococcus*. Los investigadores encontraron que los niveles de tolerancia al etanol de las BAL se conservan dentro de los aislamientos de la misma especie, a diferencia de la capacidad de crecer en la cerveza. Además, no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de tolerancia al etanol de los organismos que deterioran la cerveza y las cepas que no crecen en la cerveza. Por lo tanto, según Pittet et al. (2011), el uso de

niveles de tolerancia al etanol para predecir la capacidad alterar la cerveza no es conveniente.

Por otro lado, se ha observado que algunas bacterias sufren cambios morfológicos en el tamaño de las células cuando son cultivadas en cerveza. Asano et al. (2007), ha demostrado una considerable disminución del tamaño de las células de bacterias lácticas, hacia bacilos más cortos en bacterias pre-cultivadas en cerveza (Figura 1.4). Esta disminución de tamaño puede causar que los bacilos penetren en las membranas de filtración utilizadas en las cervecerías y por esta razón los autores señalan a las BAL adaptadas a la cerveza, como una seria amenaza para la producción de cervezas no pasteurizadas (Asano et al., 2007).

También se ha observado que frente a la exposición a uno o más factores de estrés, las bacterias que no forman esporas se defienden al entrar en un estado de latencia que se llama “viable no cultivable” (Suzuki et al., 2006) reestableciendo sus capacidades para contaminar después de la activación (Deng et al., 2016). Todos estos ejemplos, demuestran que los microorganismos contaminantes están tan bien adaptados a la cerveza que su detección y control implica un desafío permanente para las microcervecerías.

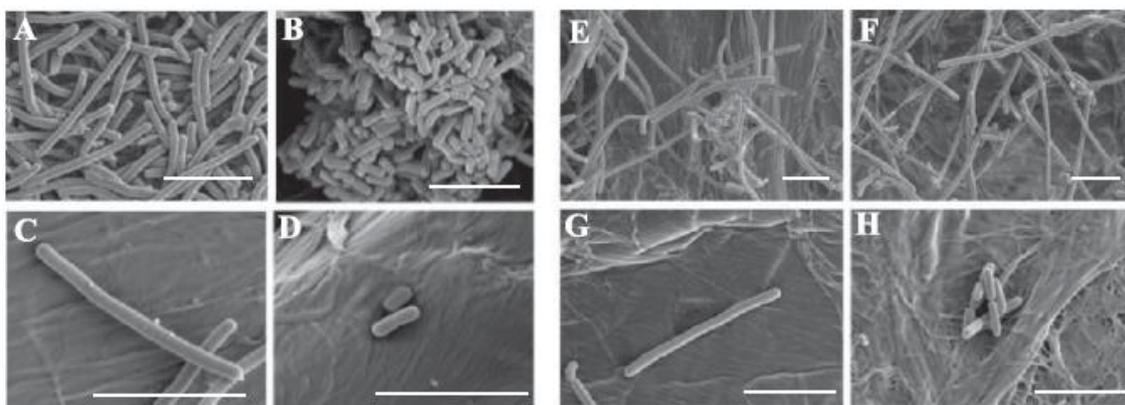


Figura 1.4. Comparación morfológica de bacterias lácticas adaptadas y no adaptadas a cerveza. (A, C) *L. brevis* ABBC45 no adaptada; (B, D) *L. brevis* ABBC45 adaptada a la cerveza; (E, G) *L. lindneri* no adaptada DSM 20690T; (F, H) *L. lindneri* DSM 20690T adaptado a la cerveza. Barras: 5 μm . (Asano, 2007).

Principales microorganismos contaminantes y fuentes de contaminación

Afortunadamente, los registros de contaminantes más problemáticos se reducen a relativamente pocas especies de bacterias y levaduras capaces de tolerar y propagarse

en las condiciones desfavorables de la cerveza. El 90 % de las contaminaciones reportadas son causadas por bacterias ácido lácticas de los géneros, *Levilactobacillus* (antes perteneciente al género *Lactobacillus*) y *Pediococcus* (Moretti, 2013; Schneiderbanger et al., 2018; Suzuki, 2020) siendo *Levilactobacillus brevis* la especie de mayor incidencia (Schneiderbanger, 2019; Suzuki, 2015). La contaminación con bacterias Gram negativas como *Acetobacter* y *Gluconobacter* (acetobacterias) también ha sido reportada, aunque en los últimos años la incidencia de estas bacterias fue desplazada por bacterias anaerobias estrictas como *Megasphaera* y *Pectinatus* (Suzuki, 2020). A su vez, se ha observado que algunos géneros de la familia *Enterobacteriaceae* como *Obesumbacterium*, *Hafnia*, *Klebsiella* y *Citrobacter* son capaces de alterar el mosto y la cerveza en estadios tempranos de la fermentación (Paradh, 2015; Priest, 2006).

La calidad de la cerveza también puede verse afectada por la presencia de levaduras contaminantes, que son aquellas que no se encuentran bajo el control del cervecero (Priest, 2006). Estas levaduras pueden producir turbidez, compuestos fenólicos, ésteres, alcoholes superiores, super atenuación (atenuación mayor a la esperada) y un exceso de carbonatación (Priest, 2006; Matouloková et al., 2013). Las levaduras contaminantes o “levaduras salvajes”, como se las conoce en la jerga cervecera, se pueden dividir en dos grandes grupos: las del género *Saccharomyces* y las levaduras comúnmente agrupadas como “no-*Saccharomyces*”, como *Brettanomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Filobasidium*, *Sporobolomyces*, *Hansenula*, *Torulopsis*, *ZygoSaccharomyces* y *Wickerhamomyces*, entre otros (Suiker & Wösten, 2022).

Los eventos de contaminación microbiana se dividen en contaminaciones primarias, las cuales se originan por microorganismos presentes en las materias primas, mosto o la fermentación, y en contaminaciones secundarias las cuales ocurren durante el envasado de la cerveza. Debido a que el mosto es hervido previo a la fermentación, la cerveza es más susceptible a la contaminación en la “etapa fría” de la producción (Figura 1.1). Alrededor del 50 % de los problemas microbiológicos se atribuyen a contaminaciones secundarias ocurridas en la sección de envasado en cerveza, pero las consecuencias de una contaminación primaria pueden ser más peligrosas para el producto (Vaughan et al., 2005). Una fuente potencial de contaminación es a través de las materias primas y materiales, como agua de elaboración de cerveza, malta y lúpulo (Hill, 2015; The Brilliant Beer Company, 2010). Estos ingredientes naturales pueden contener microorganismos

en su superficie y potencialmente colonizar diferentes lugares de la fábrica. En este sentido, Bokulich et al. (2015) estudiaron cómo las bacterias y hongos se distribuyen en una fábrica de cerveza utilizando métodos moleculares y estadísticos. Ellos encontraron que la mayoría de los microorganismos relevados en la fábrica, provenían de las materias primas usadas para elaborar cerveza y que las diferentes partes de la fábrica contenían diferentes especies de microorganismos que fueron capaces de esparcirse en nuevas partes del edificio luego de un año. Otra de las principales vías de contaminación es a través de las levaduras. Esto puede ocurrir por errores de manejo y manipulación de levadura reutilizada (levadura proveniente de una fermentación anterior), ya que se pueden transportar bacterias y levaduras salvajes de una fermentación a otra (Moretti, 2013). Como consecuencia se obtienen tantos lotes contaminados como reutilizaciones se hayan realizado, provocando grandes problemas al productor. Existen también ocasiones en las que los inóculos iniciadores de levaduras (propagadas *in situ* o levaduras líquidas comerciales) contienen contaminantes, los cuales son incorporados al mosto junto con la levadura cervecera. Zarnkow, (2021) determinó que el 82,4 % de 43 muestras de propagación de levaduras líquidas tenían contaminaciones con al menos un microorganismo, encontrando bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, bacterias del ácido acético, bacterias lácticas y levaduras salvajes. Por otro lado, también se han registrado contaminantes en levaduras secas comerciales. Manzano et al. (2005), encontraron contaminación con bacterias lácticas en levaduras secas comerciales en un rango de 90 UFC/g y observaron mayores niveles de contaminación después de las fermentaciones realizadas con dichos inóculos (hasta $2,7 \times 10^6$ CFU/g) (Manzano et al., 2005) poniendo en evidencia el impacto que puede causar sobre la fermentación una mínima contaminación en el inóculo de levadura.

Métodos de detección de contaminantes

Tradicionalmente, la detección de contaminaciones microbianas en cerveza y otras bebidas fermentadas ha sido evaluada utilizando medios de cultivo especialmente diseñados para esa función. Aunque la ciencia y la tecnología han logrado grandes avances en los métodos rápidos de detección e identificación de microorganismos, la detección de contaminaciones de cerveza utilizando medios de cultivo sigue siendo la

técnica más utilizada en los laboratorios cerveceros dentro de las fábricas (Hutzler et al., 2015; Matoulková et al., 2013) y con frecuencia se utiliza más de un medio para detectar una amplia gama de contaminantes. Los medios de cultivo mayormente utilizados se detallan en la Tabla 1.2 y siguen los principios básicos para el cultivo de microorganismos utilizados en microbiología:

- Medios nutritivos (N): medio sintético complejo preparado en el laboratorio que contiene diferentes cantidades de sustancias que son conocidas por apoyar el crecimiento de muchos microorganismos.
- Medio selectivo (S): Aquel que favorece el crecimiento de algunos organismos mientras suprime el crecimiento de otros.
- Medio diferencial (D): Aquel que causará un cambio observable en el medio cuando se produce una determinada reacción bioquímica particular, contribuyendo a la diferenciación a nivel de especie o género por las diferentes morfologías alcanzadas cuando desarrollan en dicho medio.

Tabla 1.2. Medios de cultivo empleados para la detección de microorganismos contaminantes de cerveza. Recomendados por *European Beer Convention* (Martin & Moll, 1984) y *American Society of Brewing Chemists* (ASBC, 2011b).

	Medio de Cultivo	Tipo	Microorganismo	Recomendado
BACTERIAS	MRS (de Man, Rogosa and Sharpe)	N	BAL	EBC, ASBC
	Raka-Ray	N	BAL, G(-)	EBC, ASBC
	VLB S7-S (Versuchs- und Lehranstalt für Brauerei in Berlin)	N	BAL	EBC
	HLP (Hsu's <i>Lactobacillus</i> and <i>Pediococcus</i> medium)	S	BAL	EBC, ASBC
	WLD (Wallerstein Differential)	S/D	BAL, G(-)	EBC, ASBC
	SDA (Schwarz Differential Agar)	D	BAL	EBC, ASBC
	PYF (Peptone, Yeast extract and Fructose)	S	G(-)	EBC
	SMMP (selective medium for <i>Megasphaera</i> and <i>Pectinatus</i>)	S	G(-)	ASBC
	UBA (Universal Beer Agar)	N	LAB, G(-)	EBC, ASBC
	NBB (Nachweismedium für bierschädliche Bakteriën)	S/D	LAB, G(-)	EBC
LEVADURAS	LCSM (Lin's Sulphate Cupric Media)	S	SAC, NO-SAC	EBC, ASBC
	LISINA	S	NO-SAC	EBC, ASBC
	LWYM (Lin's Wild Yeast Differential Medium)	D	SAC, NO-SAC	EBC, ASBC
	CLEN	S	NO-SAC	EBC, ASBC
	H. MYGP + COPPER MEDIUM	S	SAC, NO-SAC	EBC, ASBC
	WLN (Wallerstein Laboratories Nutrient)	D	SAC, NO-SAC	EBC, ASBC

EBC: *European Beer Convention*; ASBC: *American Society of Brewing Chemists*; N: nutritivo; S: selectivo; D: diferencial; BAL: bacterias ácido lácticas; G (-): bacterias Gram negativas; SAC: levaduras contaminantes Sacaromicéticas; NO-SAC: levaduras No Sacaromicéticas.

Durante las últimas décadas, los métodos clásicos para microbiología y fisiología han sido modificados y, en parte, reemplazados por sofisticados métodos moleculares, como secuenciación de ADN, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnicas quimiotaxonómicas, métodos espectrométricos (Hutzler et al., 2015). Actualmente, la técnica de PCR en tiempo real ha ganado popularidad en la industria cervecera (Juvonen et al., 2008) y existen múltiples kits de PCR disponibles comercialmente, que detectan e identifican con alto poder de fidelidad a los principales contaminantes cerveceros. Estos ensayos de PCR comerciales son sistemas generalmente rápidos (menos de 2 h para la identificación de microorganismos) y fácil de usar para el control de calidad de rutina en las cervecerías.

La contaminación microbiana ha demostrado ser uno de los factores limitantes más importantes que afecta a calidad de la cerveza en general y en las cervezas artesanales en particular (Back, 2005; Giovenzana et al., 2014; Manzano et al., 2011). Sin embargo, las microcervecerías argentinas raramente establecen criterios microbiológicos y políticas que garanticen la calidad de sus productos. Además, la investigación en materia de ciencia y tecnología cervecera en Argentina es muy reciente y la calidad microbiológica de la cerveza está escasamente estudiada. Estudios preliminares a esta tesis, comprobaron que las contaminaciones microbianas en cervezas de la Patagonia Andina son una problemática que afecta a las cervezas de nuestra región, ya que casi el 80 % de las cervezas mostraron evidencias de contaminación (Latorre, 2016). Esta información motivó la realización de esta tesis doctoral a fin de continuar la investigación sobre la temática de las contaminaciones microbiológicas, que afectan fuertemente a muchos productores de cerveza. En dicho contexto, este trabajo se centró en evaluar la incidencia de microorganismos contaminantes de cerveza en los principales polos productivos del país, con especial foco en la Patagonia Andina y las posibles relaciones entre la presencia de contaminantes respecto de variables fisicoquímicas y sensoriales, a fin de generar información útil para su detección y control en las cervecerías artesanales de Argentina.

Hipótesis

La calidad de las cervezas artesanales producidas en los principales polos productivos de Argentina se encuentra afectada por la presencia de microorganismos contaminantes.

Objetivo General

Estudiar la incidencia de contaminaciones microbianas en cervezas artesanales de los principales polos productivos de Argentina, identificar a los principales microorganismos contaminantes y estudiar su relación con parámetros fisicoquímicos y sensoriales para diseñar estrategias de prevención y control.

Objetivos específicos

1. Estudiar la incidencia de contaminaciones microbianas en cervezas artesanales provenientes de la Costa Atlántica, Centro del país y en especialmente cervezas de la Patagonia Andina, determinar relaciones entre la presencia de contaminantes respecto de variables fisicoquímicas de la cerveza y evaluar el impacto de las contaminaciones a nivel sensorial.
2. Identificar las bacterias y levaduras contaminantes utilizando métodos moleculares o quimiotaxonómicos y conformar la primera colección de cepas de contaminantes cerveceros.
3. Caracterizar a nivel genético y fenotípico a los aislamientos de *Saccharomyces* sp. contaminantes y evaluar la incidencia de levaduras *Saccharomyces* con poder diastático.
4. Desarrollar estrategias de prevención y control de contaminantes en fábrica.

Capítulo II

Incidencia de contaminantes microbianos en cerveza artesanal



La producción de cerveza artesanal en Argentina ha experimentado un continuo crecimiento durante los últimos 20 años. Este crecimiento significa un gran impacto en las bioeconomías regionales ya que genera múltiples puestos de trabajo, ayuda a diversificar las matrices productivas, e impacta positivamente en otros sectores económicos como servicios, metalúrgica, transporte, gastronomía, entre otros (Colino et al., 2017; Kaderian, 2018). La región Andina de la Patagonia tiene un rol muy importante en materia de antecedentes cerveceros, siendo Bariloche una de las localidades de mayor impacto y reconocimiento en cuanto a la producción de cerveza artesanal. San Carlos de Bariloche presenta la mayor densidad de microcervecerías por habitante de Argentina (40 cervecerías al 2018), siendo la localidad con mayor relación de litros de cerveza artesanal elaborada por habitante de todo el país (17 litros por persona) (Winkelman, 2018). En la actualidad la ACAB (Asociación de Cerveceros Artesanales de Bariloche) cuenta con 19 cervecerías inscriptas, 18 de la ciudad de Bariloche. Nuestros registros del CRELTEC indican que por fuera de la ACAB existirían al menos 15 emprendimientos más de diferente escala. El sector productivo de Bariloche y su zona de influencia, está integrado por actores que presentan fuertes asimetrías en relación con el tamaño de producción, tecnologías incorporadas y mercados en los que operan (Lugones et al., 2019). Patrones similares se pueden observar en Buenos Aires y en las ciudades de Santa Fe, Córdoba y Mar del Plata, encontrándose en esta última Antares, la cervecería artesanal más grande del país con una producción mensual mayor a 300.000 litros y más de 20 franquicias en todo el país.

El rápido crecimiento en el volumen y la cantidad de cervecerías artesanales, así como la mayor demanda de cervezas de calidad por parte del consumidor, fuerza a los cerveceros y cerveceras a buscar constantemente estrategias de control de calidad eficientes y asequibles que les garantice competitividad y su permanencia en el mercado. En este contexto, el objetivo de este capítulo fue evaluar la incidencia de contaminaciones microbianas en cervezas artesanales provenientes de los principales polos productivos del país, determinar relaciones entre la presencia de contaminantes

respecto de variables fisicoquímicas de la cerveza y evaluar el impacto de las contaminaciones a nivel sensorial.

Materiales y métodos

Muestras de cerveza

Se analizaron muestras provenientes de localidades en las que la producción de cerveza tiene mayor impacto. Las mismas fueron organizadas en dos grupos: cervezas elaboradas en la Patagonia Andina (conformando el grupo 1 en el que se incluyen 43 cervecerías) y por otro lado las cervezas originarias del centro y costa atlántica del país (grupo 2, con 13 cervecerías involucradas) Tabla 2.1. Se analizaron muestras de cervezas embotelladas y muestras de cerveza terminada almacenada en fermentadores o BBT (*Bright Beer Tanks*). Las muestras se tomaron en función de la disponibilidad en el mercado/fábrica priorizando abarcar la mayor variedad de estilos.

Tabla 2.1. Muestras de cervezas artesanales tomadas de botellas y fermentadores/BBT provenientes de distintas localidades de importancia productiva de Argentina.

Clasificación	Localidades	N° Botellas	N° Fermentadores/BBT	Total
Grupo 1 Patagonia Andina	Caviahue, V. la Angostura, S. M. de los Andes, Dina Huapi, Bariloche, el Bolsón, Lago Puelo, El Hoyo, Epuyen, Esquel, Trevelin y Usuahia	75	45	120
Grupo 2 Centro y Costa Atlántica	Córdoba, Santa Fe, Rosario, Buenos aires y Mar del Plata	25	10	35
Total		100	55	155

Las muestras en botella fueron obtenidas directamente de los productores o en locales de venta al público dentro de su fecha de vencimiento, y fueron conservadas a 4 °C hasta su análisis. Las muestras provenientes de fermentadores/BBT fueron tomadas en

condiciones asépticas según protocolos de *American Society of Brewing Chemists (ASBC 2011a)* y analizadas el mismo día en que fueron tomadas.

Medios de cultivo

La detección de bacterias aeróbicas/microaerófilas totales se realizó en medio de cultivo diferencial de Wallerstein (WLD) marca *Sigma* (Green & Gray, 1950) (Anexo I). En las muestras de formato de botella se inocularon 100 µL de cerveza utilizando el método microbiológico de siembra en superficie con espátula de *Drigalski* y se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias por mL de cerveza (UFC/mL). Para las muestras provenientes de BBT, se inoculó 1 mL de muestra en profundidad para aumentar la sensibilidad del método, ya que en general, la cerveza en los tanques se almacena en condiciones contraladas de temperatura y por tiempos menores que en las botellas. Las muestras de ambos formatos (tanque y botella) fueron incubados a 30°C durante 48-72 hs. A modo de control positivo, se utilizaron las cepas *Levilactobacillus brevis* WLP 672, *Lactobacillus delbrueckii* WLP 677 (colección White Labs) y una cepa *Acetobacter* sp. de la colección del CRELTEC. También se confirmó que las cepas cerveceras Ale S-04 y US 05 y la cepa Lager W-34/70 (Fermentis) no se desarrollaran en el medio de cultivo.

Para la detección de bacterias ácido lácticas se utilizó el medio semisólido de cultivo Hsu's para *Lactobacillus* y *Pediococcus* (HLP) marca *Siebel Institute* (ASBC, 2011b) (Anexo I). En este caso, se colocaron 14 mL del medio de cultivo en tubos Falcon® de 15 mL, se adicionó 1 mL de la muestra y se determinó presencia o ausencia de estos microorganismos. Los cultivos fueron incubados a 30°C durante 48-72 hs. A modo de control positivo, se utilizaron las cepas *Levilactobacillus brevis* WLP 672, *Lactobacillus delbrueckii* WLP 677 (colección White Labs). También se confirmó que las cepas cerveceras Ale S-04 y US 05 y la cepa Lager W-34/70 (Fermentis) no se desarrollaran en el medio de cultivo.

Para la detección de levaduras contaminantes se utilizaron los medios sulfato de cobre de Lin (LCSM) marca *Sigma* (Lin, 1981) y/o YM con sulfato de cobre (500 ppm) (Anexo I). Para las cervezas embotelladas se inocularon 100 µL de la muestra mediante siembra en superficie en el medio y para las muestras provenientes de fermentador/BBT, se inoculó

1 mL de muestra en profundidad para aumentar la sensibilidad del método. Las placas se incubaron durante 48-72hs a 25°C y luego se realizó el recuento de UFC/mL de cerveza. Además, se realizaron controles negativos con las principales levaduras cerveceras utilizadas en la zona en formato seco (Safale 04 y Safale 05 de marca *Fermentis* y Nottingham de la marca *Lallemand Brewing*) para confirmar que en el medio de cultivo LCSM no crecían dichas cepas de levadura. También se realizó un control positivo con la levadura no sacaromycética *Wickerhamomyces anomalus* (colección CRELTEC) y una cepa contaminante de *Saccharomyces cerevisiae* WLP 644 (colección White Labs).

Se consideró que la muestra de cerveza estaba contaminada cuando el recuento de UFC fue mayor o igual a 10 UFC/mL de cerveza en los medios sólidos y/o cuando se registró crecimiento de colonias en el medio de cultivo semisólido HLP. Este límite se eligió según lo sugerido por Hill (2015) para la detección de bacterias y se extrapoló para la detección de levaduras.

Por último, se estudió si la presencia de contaminaciones microbianas se relaciona con el lugar de procedencia (Grupo 1 o 2) y/o del formato de la muestra (botellas/tanques), utilizando el software estadístico Graph pad prism V8. Además, se evaluó si formato de la muestra influyó sobre la carga microbiana encontrada en las cervezas contaminadas usando el mismo programa.

A partir de las placas de cultivo con medio sólido se aislaron las colonias morfológicamente diferentes. En total 78 bacterias y 72 levaduras fueron aisladas y críoconservadas a -80 °C utilizando glicerol (20 % v/v) como crio-protector para su posterior identificación. Estos microorganismos contaminantes fueron ingresados al cepario del Centro de Referencia en Levaduras y Tecnología Cervecera (CRELTEC), perteneciente al Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC), CONICET - UNComahue.

Caracterización fisicoquímica

La caracterización fisicoquímica se realizó sobre las cervezas embotelladas utilizando los métodos propuestos por la ASBC. Para cada muestra se determinó el pH, unidades internacionales de amargor (IBUs) y color de la cerveza.

pH: Se midió el pH de las muestras previamente descarboxatadas por agitación y a temperatura ambiente (ASBC,2011c) utilizando pH metro (Sartorius PR15).

IBU: Los IBUs fueron medidos por espectrofotometría según el protocolo propuesto por la ASBC (ASBC, 2011d). Para ello, se realizó la extracción de iso- α -ácidos homogeneizando vigorosamente en vortex 2,5 mL de muestra con 0,25 mL de HCl 3 N y 5 mL de iso-octano (2,2,4-trimetilpentano) como solvente de extracción. La muestra se centrifugó y la absorbancia de la fase superior se midió a 275 nm con cubeta de cuarzo de 500 μ L (1 cm de paso), utilizando un espectrofotómetro UV (Shimadzu UV-1800). Los IBUs fueron calculados mediante la siguiente ecuación:

$$IBU = Absorbancia^{275} \times 50$$

Color: mediante espectrofotometría se midió el color de la cerveza previamente descarboxatada y filtrada utilizando la unidad SRM (*Standard Reference Method*). El método propuesto por ASBC determina la cantidad de luz absorbida por la cerveza en una cubeta de cuarzo de 500 μ L (1 cm de paso) cuando es iluminada en la longitud de onda específica de 430 nm (ASBC 2011e). La valoración del color en SRM es igual a diez veces este valor de absorbancia como lo muestra la siguiente ecuación:

$$Color = Absorbancia^{430} \times 10$$

Se evaluó la existencia de correlaciones entre la presencia de contaminantes y las variables fisicoquímicas analizadas utilizando un modelo de regresión logística binomial mediante el uso del paquete estadístico lme4 del software *R-project* (R Core Team, 2013). Se estableció el nivel de significancia a valores de *p* inferiores a 0,05.

Análisis sensorial

Se realizó el análisis sensorial de las muestras de cerveza embotellada provenientes de la Patagonia Andina (75 muestras) con el fin de detectar *off-flavors* (ver Tabla 1. 1). Las cervezas fueron agrupadas en 3 categorías según los descriptores percibidos. En la categoría “acidez y/o fenoles” se incluyeron los descriptores asociados a contaminación (presencia de fenoles percibido como aroma a clavo de olor o establo y de ácidos orgánicos percibido como acidez). La categoría “otros defectos” incluyó descriptores

indeseados que pueden ser causados por contaminaciones, aunque también pueden deberse a fallas en el proceso de elaboración. Esta categoría agrupa deméritos como diacetilo (aroma y sabor a manteca), compuestos sulfurados como el dimetil sulfuro (DMS) (aroma y sabor a choclo, otras verduras hervidas), y acetaldehído (aroma y sabor a manzana verde) entre otros (ver Tabla 1. 1). Por último, la categoría “sin defectos” incluyó las cervezas a las que no se encontró ningún demérito sensorial. El análisis sensorial fue llevado por personal entrenado en la cata de cerveza: 3 mujeres de 26, 27 y 34 años, 2 de ellas actualmente Juezas internacionales de *Beer Judge Certification Program* (BJCP) y 2 hombres 27 y 40 años (uno de ellos Juez BJCP). Se siguieron los lineamientos propuestos por la ASBC (ASBC, 2011f). En la Figura 2.1 se puede observar la planilla utilizada en la cata. La muestra la planilla utilizada por los catadores en el análisis sensorial.

Panelista: _____

Muestra: _____

Fecha: _____

Marque con una **X** cuando perciba los siguientes descriptores

ACIDEZ (láctica o acética) _____

FENOLES (especiado/ahumado) _____

OTROS DEFECTOS (diacetilo, DMS, sulfuros, acetaldehído, solvente, otro) _____

SIN DEFECTOS _____

Comentarios: _____

Figura 2. 1. Planilla utilizada por los catadores en el análisis sensorial.

Se estudió la existencia de relaciones entre los deméritos percibidos sensorialmente (“acidez y/o fenoles” y “otros defectos”) y el promedio de UFC/mL de las muestras contaminadas únicamente con bacterias, así como las muestras contaminadas únicamente con levaduras mediante test de Welch. También se analizó la relación entre

la presencia de acidez con la presencia de BAL utilizando el mismo test estadístico. En todos los casos se utilizó el programa Graph Pad Prism 8 para realizar los análisis

Resultados

Análisis microbiológico de cervezas artesanales

Grupo 1: Localidades de la Patagonia Andina

De las 75 muestras envasadas en botella provenientes de cervecerías andino patagónicas, el 69,3 % evidenció crecimiento de microorganismos contaminantes (bacterias y/o levaduras en un número superior a 10 UFC/mL de cerveza). Del total de muestras analizadas, el 45,3 % de las cervezas mostraron resultados positivos para el medio de cultivo HLP (selectivo para bacterias ácido lácticas de los géneros *Levilactobacillus* y *Pediococcus*). Con la excepción de 2 muestras, todos los casos positivos para HLP también lo fueron para el medio WLD (que permite la detección y recuento de bacterias acéticas, especies de *Flavobacterium*, *Proteus* y otras bacterias termofílicas, y bacterias ácido lácticas (BAL)). Por su parte, se registraron 9 muestras positivas para el medio WLD que fueron negativas para el medio HLP, totalizando así un 57,3 % de muestras con presencia de bacterias contaminantes. En cuanto a la detección de levaduras contaminantes se observó crecimiento de colonias superior a 10 UFC/mL en el medio de cultivo LCSM en el 39,7 % de las cervezas analizadas.

En el 29,3 % de las muestras se detectaron exclusivamente bacterias, mientras que 12 % presentó únicamente levaduras contaminantes, y el 28 % de las muestras presentaron ocurrencia de ambos tipos de microorganismos (Figura 2.2). Las muestras en las que se evidenció crecimiento de bacterias en WLD (41 muestras) presentaron un amplio rango de valores de entre 10 a $2,1 \times 10^7$ UFC/ mL de cerveza (en promedio $7,3 \times 10^5$ UFC/ mL). Por otro lado, las cervezas con presencia de levaduras contaminantes (31 muestras) presentaron valores de recuento en un rango de 10 a 1×10^4 UFC/mL de cerveza (en promedio $2,7 \times 10^3$ UFC/mL).

Por otra parte, de los 45 productos terminados provenientes de BBT/fermentador el 22,2 % presentó contaminación microbiológica antes de salir al mercado (>10 UFC/mL de cerveza) (Figura 2.3). De estas muestras, 2,2 % de las cervezas se hallaron contaminadas solo con bacterias, 8,9 % únicamente con levaduras y en el 11,1 % de las muestras se encontraron tanto bacterias como levaduras (Figura 2.3). Un 8,8 % de las cervezas analizadas mostraron resultados positivos en el medio HLP, selectivo para bacterias lácticas y todos los casos HLP positivos fueron también detectados por el medio WLD. Por su parte, los recuentos de colonias fueron inferiores a los hallados en muestras embotelladas (promedio de levaduras contaminantes 33 UFC/mL y bacterias 1×10^2 UFC/mL de cerveza).

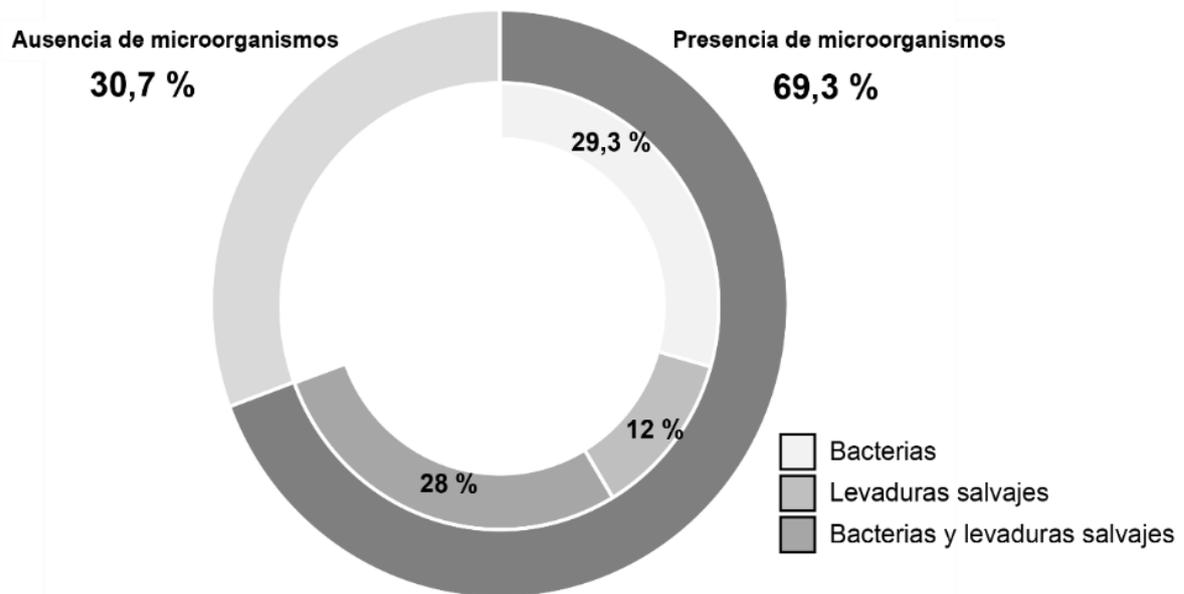


Figura 2.2. Incidencia de microorganismos contaminantes en 75 muestras de cerveza embotellada producidas por microcervecerías del Grupo 1 (Patagonia Andina).

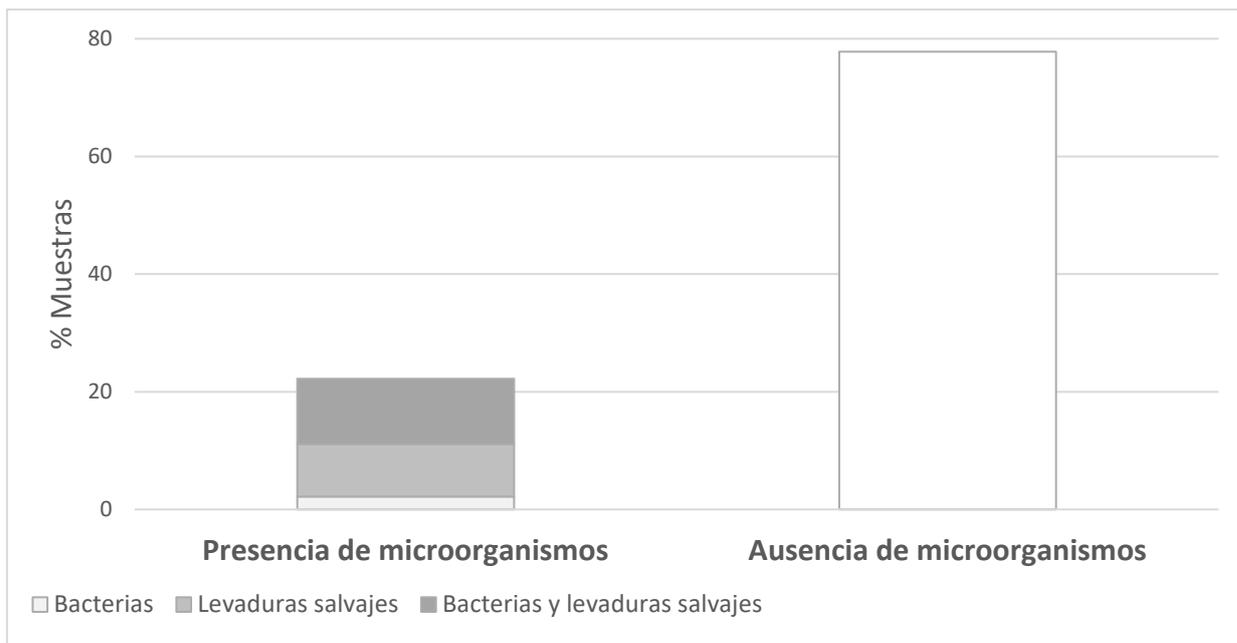


Figura 2.3. Incidencia de microorganismos contaminantes en 45 muestras de cerveza terminada provenientes de BBT/fermentador y producidas por microcervecerías del grupo 1 (Patagonia Andina).

Por último, se observó que en el 20 % de las muestras provenientes de BBT/fermentador, se registró crecimiento de colonias entre 1 y 10 UFC/mL. Sin embargo, estas cervezas no fueron consideradas contaminadas ya que los valores de UFC fueron menores al criterio utilizado en este trabajo (>10 UFC/mL). De todas maneras, los microorganismos contaminantes involucrados en la contaminación fueron aislados e identificados.

Grupo 2: Localidades del centro del país y costa atlántica

Se detectó la presencia de contaminantes microbianos en el 52 % de las muestras de cerveza embotellada provenientes del grupo geográfico 2 Centro y Costa Atlántica (Figura 2.4). El 12 % de las muestras registró únicamente la presencia de bacterias y este mismo valor se obtuvo para muestras contaminadas solo con levaduras, mientras que el 28 % de las muestras analizadas presentaron la ocurrencia de ambos tipos de contaminantes.

Las muestras en las que se evidenció crecimiento de bacterias en WLD (10 muestras) presentaron un amplio rango del número de colonias variando de 1×10^2 a $7,2 \times 10^7$ UFC/mL de cerveza (en promedio $1,05 \times 10^7$ UFC/mL). Un 24 % de las cervezas analizadas mostraron resultados positivos en el medio HLP, selectivo para bacterias lácticas y todos los casos HLP positivos fueron también detectados por el medio WLD. Por otro lado, las

cervezas con levaduras contaminantes (10 muestras) presentaron valores de recuento en un rango de 90 a $3,7 \times 10^3$ UFC/mL de cerveza (en promedio $1,4 \times 10^3$ UFC/mL).

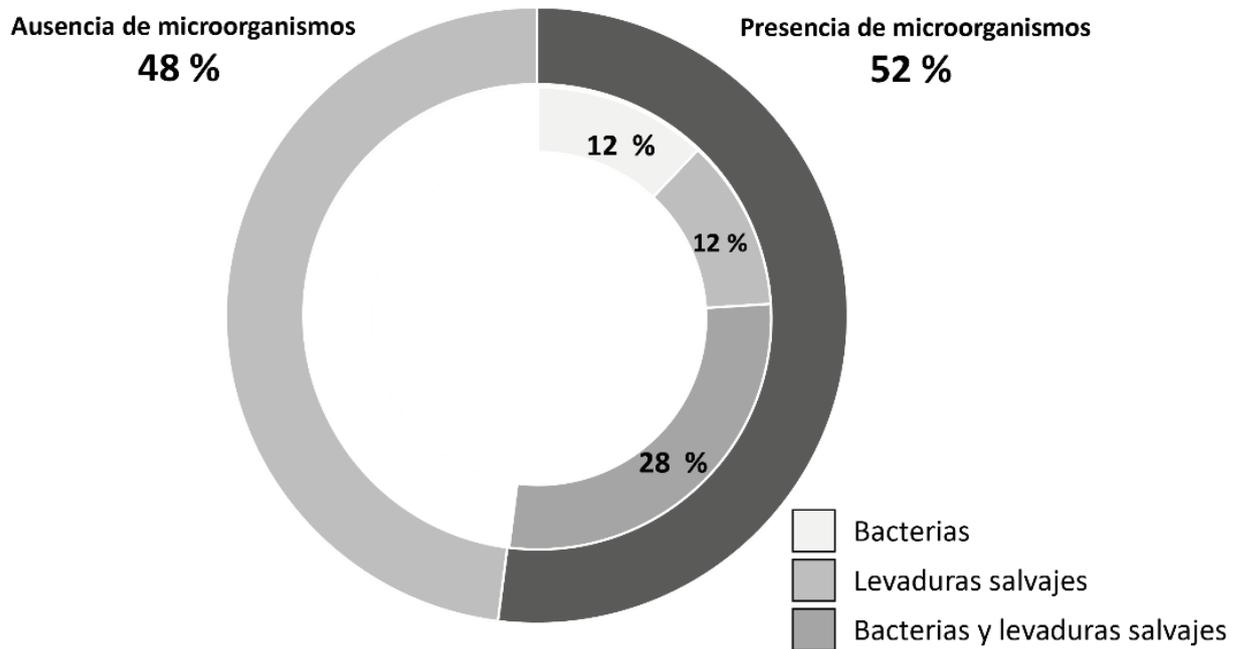


Figura 2.4. Incidencia de microorganismos contaminantes en 25 muestras de cerveza embotellada producidas por microcervecerías del grupo 2 (centro y costa del país).

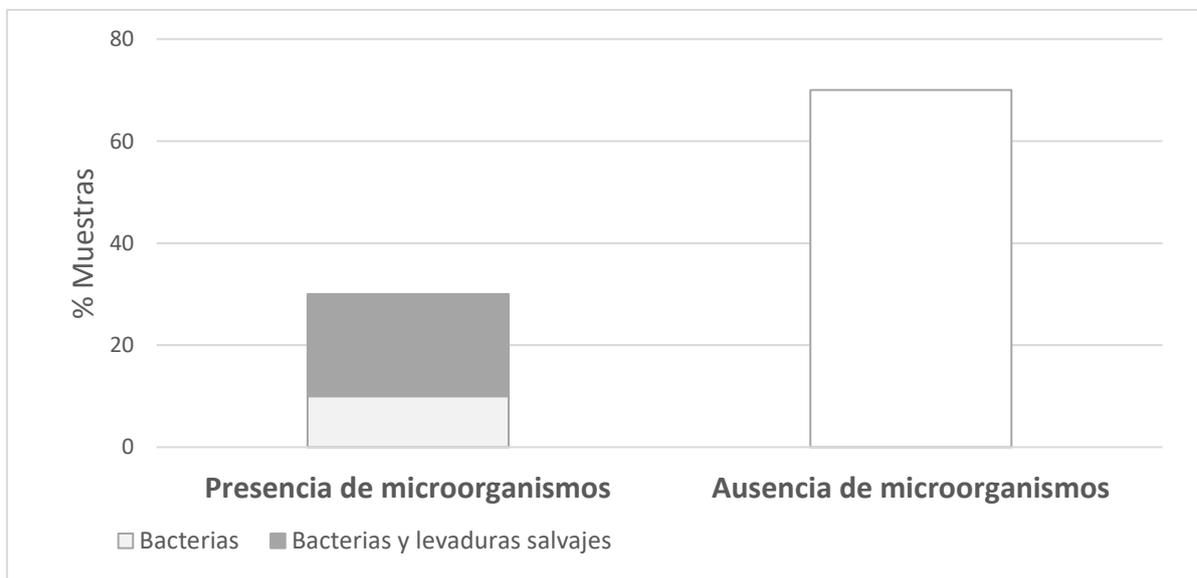


Figura 2.5. Incidencia de microorganismos contaminantes en 10 muestras de productos terminados provenientes de BBT/fermentador producidas por microcervecerías del grupo 2 (centro y costa del país).

Por otro lado, el 30 % de los productos terminados provenientes de BBT/fermentador presentaron contaminación microbiológica (>10 UFC/mL de cerveza). De este porcentaje, el 10 % correspondió a contaminaciones causadas únicamente por

bacterias, mientras que en el 20 % restante se encontraron tanto bacterias como levaduras (Figura 2.5). Las muestras en las que se evidenció crecimiento de bacterias en WLD (10 muestras) presentaron un amplio rango del número de colonias variando de 2×10^2 a 3×10^4 UFC/ mL de cerveza (en promedio 6×10^3 UFC/mL). Con respecto a la prevalencia de BAL en las muestras (HLP positivas), ésta se encontró en un 20 % de las cervezas provenientes de tanques y fueron también detectadas por el medio WLD. Por otro lado, las cervezas con levaduras contaminantes (2 cervezas) presentaron valores de recuento promedio 2,2 UFC/mL.

Una síntesis de los resultados globales de incidencia de contaminación microbiana en cervezas artesanales de las zonas estudiadas puede observarse en la Tabla 2.1. Se encontró que esta fue significativamente mayor en muestras de cerveza embotellada que en las muestras provenientes de tanques ($p < 0,0001$). La carga bacteriana presente en muestras en formato de botella fue 3 órdenes de magnitud mayor que en muestras de tanques, mientras que la carga de levaduras en cervezas embotelladas fue 2 órdenes de magnitud mayor que en muestras de tanques (valores estadísticamente significativos de $p < 0,0001$ en ambos casos). Asimismo, se pudo establecer que la ocurrencia de contaminaciones no depende del grupo geográfico ($p = 0,7234$) y que la incidencia de contaminaciones en ambos grupos de estudio resultó similar (cercana al 50 %). Por último, de las 55 cervecerías involucradas en este trabajo, el 80 % presentó al menos una cerveza con indicio de contaminación microbiológica.

Tabla 2.2. Número de muestras contaminadas en formato botella (N= 75 Grupo 1 y N=25 Grupo 2) y muestras de cerveza terminada antes de ser envasada (N=45 Grupo 1 y N=10 Grupo 2).

Clasificación	Botellas	Fermentador/BBT	% contaminación*
Grupo 1			
Patagonia Andina	52	10	51,6 %
Grupo 2			
Centro y Costa Atlántica	13	3	45,7 %
% Contaminación*	65 %	23,6 %	

*Número de muestras contaminadas (>10 UFC/mL) / N total.

Análisis fisicoquímico de cervezas embotelladas

Las cervezas estudiadas mostraron valores de pH que variaron entre 3,26 y 4,97 con un promedio de $4,42 \pm 0,27$. Las muestras que registraron crecimiento de bacterias (detectadas en WLD y HLP) mostraron correlación con pH bajos ($p=0,0088$) (Figura 2.66).

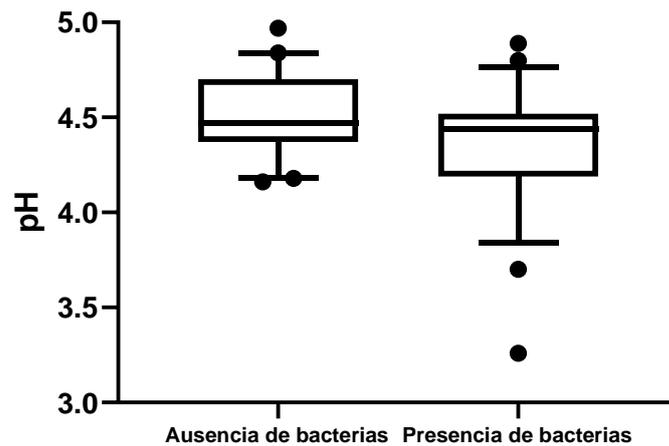


Figura 2.6. Relación entre el pH y la presencia/ausencia de bacterias en cerveza artesanal embotellada.

En cuanto a las unidades de amargor (IBU), las cervezas variaron entre 7,8 y 75,7 IBUs (en promedio $25,5 \pm 13,4$ IBUs). Al analizar la relación entre los IBUs y la ocurrencia de contaminaciones, solo se observó correlación con la presencia de bacterias lácticas (cervezas con HLP positivo) a IBUS más bajos ($p= 0,0485$) (Figura 2.7).

En relación al color, las muestras variaron entre 2 y 70 SRM (en promedio $13,05 \pm 13,70$ SRM) y no se encontró correlación entre los eventos de contaminación y el color de la cerveza ($p= 0,805$) (Figura 2.88).

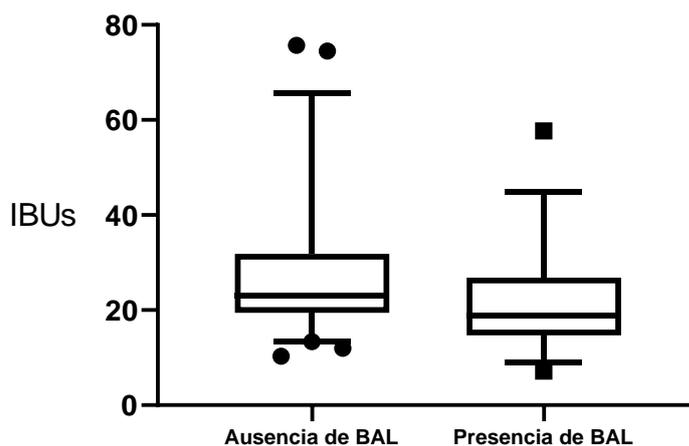


Figura 2.7. Relación entre IBUs y la presencia/ausencia de bacterias ácido lácticas (BAL) en cerveza artesanal embotellada.

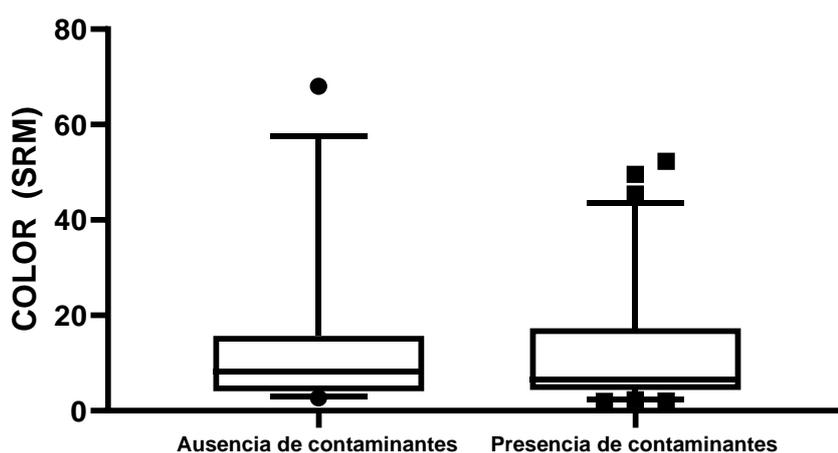


Figura 2.8. Relación entre el color de la cerveza y la presencia/ausencia de bacterias y/o levaduras contaminantes en cerveza artesanal embotellada.

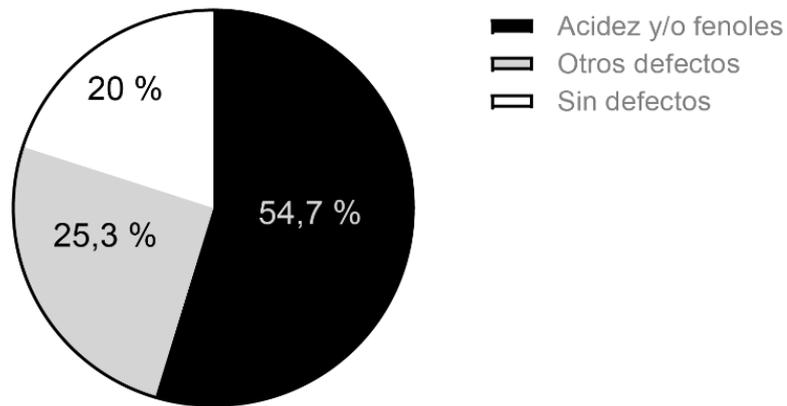
Análisis sensorial de cervezas embotelladas de la Patagonia Andina

Como análisis complementario a los estudios microbiológicos, las cervezas en formato de botella de la Patagonia Andina, fueron evaluadas sensorialmente para detectar posibles defectos asociados a contaminaciones microbianas y agrupadas en 3 grupos según los descriptores percibidos. Se detectó que el 54,7 % de las cervezas catadas presentaba los descriptores básicos de contaminación que se consideran inaceptables para el estilo de cerveza definido por el productor y conformaron el grupo “acidez y/o fenoles” (Figura 2.99a). Estas cervezas presentaron una acidez pronunciada y/o aroma y sabor (*flavor*) a compuestos fenólicos (aromas especiados o a clavo de olor). El 25,3 %

de las cervezas presentaron descriptores que podrían o no estar vinculados a eventos de contaminación (“otros defectos”), pero que influyen de forma negativa en la tomabilidad. Entre ellos, se encontró principalmente aroma y sabor a manteca (diacetilo), aroma y sabor a choclo (dimetil-sulfuro) y huevo (compuestos sulfurosos). El 20 % de las cervezas analizadas conformaron el grupo “sin defectos” ya que no se percibieron deméritos a nivel sensorial, sin embargo, se registró la presencia de contaminantes en 6 de las 15 muestras. La figura 2.9b relaciona, los resultados del análisis sensorial con el tipo de microorganismo encontrado en las muestras. La presencia de acidez fue el principal descriptor que pudo asociarse a los incidentes de contaminación, ya que se percibió en el 75 % de las muestras contaminadas solo con bacterias, 30 % en las muestras contaminadas con levaduras y 50 % de las muestras contaminadas con ambos tipos de microorganismo (Figura 2.99b).

Por otro lado, la presencia del descriptor acidez no fue explicado por la cantidad de UFC registrada en las muestras, ya que el promedio de UFC/mL ($5,1 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^6$ UFC/mL) de las muestras contaminadas exclusivamente con bacterias que presentaron acidez, no mostró diferencias significativas con respecto al promedio de UFC/mL ($4,3 \times 10^6 \pm 9,1 \times 10^6$ UFC/mL) de las muestras contaminadas exclusivamente con bacterias que no presentaron este descriptor ($p=0,4145$). Tampoco se observaron diferencias entre las cervezas con y sin acidez y el número de UFC de levaduras ($p=0,6112$). La presencia de acidez parece estar vinculada a la ocurrencia de BAL, ya que 13 de las 15 muestras con acidez, registraron crecimiento de BAL (86,6 %) (Figura 2.102.10). En el caso de las levaduras, donde el descriptor principal para levaduras salvajes en la industria cervecera son los compuestos fenólicos, no se encontró dicha asociación. Los principales deméritos encontrados pertenecieron al grupo “otros defectos”, entre los cuales se destacaron DMS (dimetil sulfuro detectado como aroma a choclo), diacetilo (aroma a manteca) y sulfuros (aroma a huevo y compuestos sulfurados).

a)



b)

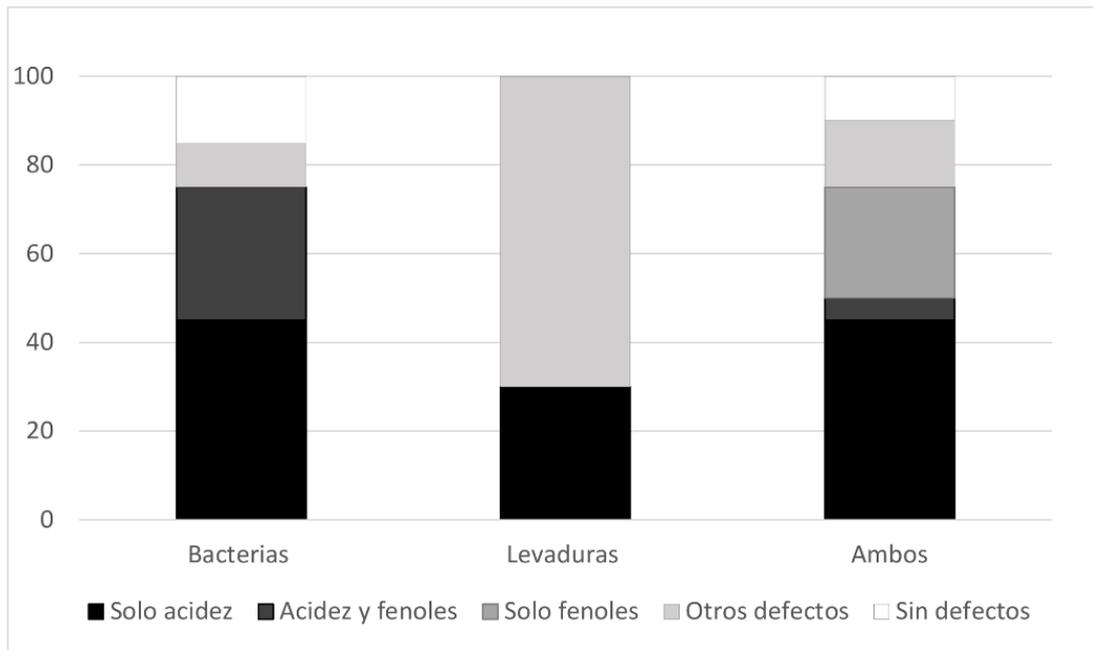


Figura 2.9 a). Resultados del análisis sensorial de cervezas artesanales. La categoría “acidez y/o fenoles” incluye las muestras que presentaron descriptores comúnmente asociados a contaminación. La categoría “otros defectos” agrupa las muestras que presentaron defectos como DMS, diacetilo y sulfuros y “sin defectos” hace referencia a las muestras que no presentaron deméritos sensoriales. 2.6 b). Descriptores sensoriales hallados según el tipo de microorganismo contaminante (bacterias, levaduras o ambos) encontrado en la cerveza.

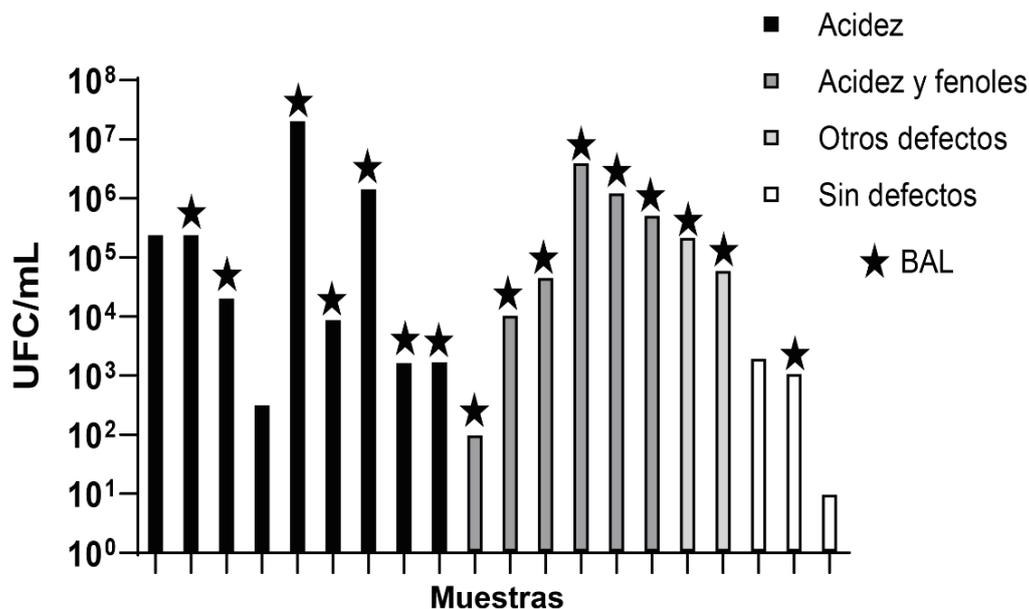


Figura 2.10. Recuentos de UFC/mL de muestras contaminadas únicamente con bacterias. El color de las barras revela los defectos percibidos sensorialmente y las estrellas indican la presencia de BAL en las muestras de cerveza.

Discusión

La evaluación de la calidad microbiológica de cervezas artesanales en las regiones estudiadas, evidenció una elevada proporción de cervezas contaminadas, y resalta la necesidad de establecer protocolos de calidad dentro de las fábricas. El crecimiento de microorganismos en los medios de cultivo utilizados, permitió el aislamiento de todas las bacterias de este trabajo, cuya identidad se discutirá en el Capítulo III.

Por otro lado, el medio de cultivo HLP brindó información complementaria acerca de la bacteria involucrada en la contaminación ya que, dado su carácter selectivo, permite el crecimiento solo de miembros de la familia *Lactobacillaceae*. Este medio detectó la presencia de BAL en el 28,3 % de las cervezas argentinas estudiadas (155), valor similar al encontrado por Menz et al. (2010), quien detectó BAL en 27,5 % de las cervezas artesanales de Australia. En Italia se ha reportado la presencia de BAL en 41 % de las cervezas artesanales (Moretti, 2013) y 15 % en Estados Unidos (White, 2008). Trabajos más actuales como el de Schneiderbanger (2019), Garcia Lopez et al. (2020) y Rodríguez-Saavedra et al. (2020) confirman que las BAL son las principales bacterias que afectan a

las cervezas artesanales a nivel mundial y que las cervezas estudiadas argentinas responden a este mismo patrón.

La utilización del medio de cultivo HLP resultó rápida y práctica, y esto lo convierte en un medio de fácil implementación en fábrica ya que además de su facilidad de inoculación, no requiere esterilización por autoclave. El medio HLP es importado y tiene un valor aproximado promedio de \$200 (dólares americanos) por 500 g de medio de cultivo, es decir que, en pesos argentinos, este valor ronda entre los \$30.000 (cotización oficial noviembre 2022). Teniendo en cuenta que este medio se usa al 7 %, su rendimiento es de aproximadamente 500 muestras, el valor de cada muestra ronda los \$ 60 (pesos argentinos, cotización oficial noviembre 2022). Este valor no representa un gasto significativo para las cervecerías, sin embargo, la factibilidad de la importación de este medio de cultivo puede estar sujeto a las políticas económicas del país. Este hecho resalta la importancia de generar investigación y desarrollo en la temática, para en un futuro, sustituir las importaciones de este medio por uno de origen nacional.

En cuanto a levaduras salvajes, los medios de cultivo con sulfato de cobre, permitieron la detección de levaduras contaminantes en un tercio de las muestras estudiadas (33 %). Este valor es mayor al relevado por Suzuki (2020) quién realizó una extensa revisión que involucró datos tomados entre 1992 y 2002 en Europa, y mostró que las levaduras salvajes fueron responsables del 2 al 15 % de las contaminaciones de cerveza en ese período. Por su parte, López et al. (2020) detecto contaminaciones causadas por levaduras en el 59 % de las cervezas estudiadas en España. La identidad genética de las levaduras aisladas en esta tesis se discutirá en los capítulos III y IV.

Las contaminaciones microbianas para ambas regiones resultaron superiores en muestras embotelladas en comparación con muestras de cerveza terminada previo a su fraccionamiento. Esta afirmación se condice con la bibliografía, que advierte que las contaminaciones secundarias son predominantes en los eventos de contaminación ya que el envasado de la cerveza conlleva el mayor riesgo de introducción de microorganismos (Bokulich et al., 2015; Hofmann & Fischer, 2015; Storgårds et al., 2006; Timke et al., 2005a). Esto se debe a que cada etapa donde el producto tiene contacto con una “nueva” superficie o se expone directamente al medio ambiente, el riesgo de contaminación aumenta (Hofmann & Fischer, 2015). Dicho riesgo de contaminación durante el proceso de llenado de botellas y latas, surge por contacto directo entre la

cerveza y las superficies contaminadas del envase mismo o por el contacto con flujos de aire proveniente de superficies contaminadas involucrados en el proceso de llenado. El paso posterior al llenado es el tapado del envase, aquí nuevamente el contenedor puede ser considerado como altamente vulnerable a la contaminación por rociado de agua o microorganismos en el ambiente directo. Además, el equipamiento técnico de envasado es más propenso a proporcionar condiciones que permiten la formación de biopelículas (*biofilms*), aumentando el riesgo para el desarrollo y crecimiento de microorganismos (Bokulich et al., 2015; Storgårds et al., 2006; Timke et al., 2005a).

Los *biofilms* se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos adheridos a una superficie (Timke et al., 2005a). En esta matriz los microorganismos involucrados adquieren ventajas adaptativas importantes como mayor resistencia al estrés, un incremento en la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, mejor aprovechamiento del agua, y posibilita la transferencia de material genético (ADN) (Costerton et al., 1999; Donlan, 2002). Todas estas circunstancias pueden incrementar sus capacidades de supervivencia de los microorganismos e incluso la resistencia a los químicos utilizados en la limpieza y sanitización. Storgards et al. (2006), ha observado que después de la desinfección de la superficie, los microorganismos de un *biofilm* pueden recolonizar la superficie rápidamente (entre 2 y 12 h). Por su parte, Shabini & Devolli (2003) explican que la comunidad microbiana de un *biofilm* puede variar en el tiempo y de acuerdo al sector de la cervecería.

Por otra parte, algunas de las muestras de producto terminado almacenadas en BBT y fermentadores también mostraron evidencias de contaminación microbiológica (contaminación primaria), mostrando que la problemática de las contaminaciones puede iniciarse en las etapas previas al envasado y que pueden ser detectadas antes de su salida al mercado. También pudo confirmarse que casi no hubo diferencias en la incidencia de contaminaciones entre los grupos de estudio y que ésta se encontró cercana al 50 %, sugiriendo que la problemática de las contaminaciones no responde a una variable geográfica. En este sentido, en un trabajo complementario a esta tesis con foco en la Ciudad Autónoma y Gran Buenos Aires, se detectó la presencia de contaminantes en el 73 % de las cervezas artesanal analizadas (Duhourq et al., 2021). Cabe aclarar que los productos de dicho trabajo, fueron exclusivamente tomados a

partir de cerveza envasada en barril y no se tuvo en cuenta muestras provenientes de fermentadores y BBTs. Considerando los datos como un solo conjunto, es evidente que las cervezas argentinas necesitan enfocarse en la importancia del control microbiológico para prevenir, detectar o erradicar contaminaciones.

La caracterización fisicoquímica de las cervezas analizadas, refleja la diversidad de estilos disponibles en el mercado, ya que se encontraron cervezas con bajo amargor, así como cervezas amargas y cervezas tanto claras como oscuras. De los análisis fisicoquímicos realizados en este estudio, el pH mostró ser un parámetro que se relaciona con la presencia de bacterias, indicando su relevancia como herramienta complementaria y accesible para el control de calidad frente a las principales bacterias contaminantes. Esta afirmación, también fue observada por Cendón Fernandez (2018) quien indica que el pH podría ser un indicador de la presencia de microorganismos ya que las cervezas contaminadas registraron una disminución en el valor de este parámetro.

Por otro lado, se confirmó que las cervezas con altos IBUs presentaban menor grado de contaminación causada por BAL, debido a las diferencias en la composición de la pared celular con respecto a las bacterias Gram negativas, que permite la entrada de iso-alfa-ácidos al interior de la célula. La acción antibiótica de los iso-alfa-ácidos del lúpulo se debe a que son ácidos débiles que pueden atravesar la membrana citoplasmática de bacterias Gram positivas y una vez dentro de la célula actúan como protonóforos que disipan el gradiente de pH transmembrana (Suzuki et al., 2006). Sin embargo, se ha observado que en múltiples ocasiones, las BAL presentan alta resistencia a los iso-alfa-ácidos del lúpulo (Behr, 2008; Sakamoto & Konings, 2003; Suzuki et al., 2006) gracias al gen *horA*, identificado originalmente en *Levilactobacillus brevis*, que codifica para una proteína de membrana (HorA) de la familia de transportadores multidrogas ABC que expulsa a los alfa-ácidos hacia afuera de la célula. Además, existen otros genes *horB* y *horC*, los cuales codifican para proteínas transportadoras multidrogas dependientes de la fuerza protomotriz que también le otorgan resistencia los compuestos antibióticos del lúpulo (Behr, 2008). Estos mecanismos de resistencia explican que las BAL, aun siendo naturalmente más susceptibles al lúpulo, sean las principales bacterias contaminantes en la industria cervecera.

Por último, el análisis sensorial puso en evidencia que las contaminaciones microbianas tienen un impacto considerable a nivel organoléptico ya que en más de la mitad de las

cervezas estudiadas (provenientes de la Patagonia andina) se detectaron descriptores negativos como acidez y *flavors* fenólicos. Estos defectos estuvieron relacionados con la presencia de bacterias y/o levaduras contaminantes. Así mismo, Moretti (2013) confirmó que la presencia de BAL, aún en bajas densidades celulares (1 UFC/mL), causa una acidez notable sensorialmente. El resto de los defectos sensoriales registrados en este trabajo correspondieron a descriptores que podrían o no estar vinculados a una contaminación microbiana, pero igualmente influyeron de forma negativa en la tomabilidad de la cerveza. Las cervezas que no presentaron defectos sensoriales, pero si la presencia de contaminantes, pertenecían a estilos de cerveza con caracteres y sabores fuertes que pudieron enmascarar los efectos causados por la contaminación. Por ejemplo, de las 6 muestras en esta situación, 3 cervezas pertenecían al estilo *India Pale Ale* (IPA) con alto grado de amargor (entre 45-65 IBUs) y con alta presencia de lúpulo en aroma, una al estilo *Dubbel* de origen belga con alta graduación alcohólica y fuertes notas frutales y especiadas y las dos restantes al estilo *Strong Ale*. La aparición de indicadores sensoriales asociados a contaminantes en el producto terminado y su relación con los resultados de los análisis microbiológicos y fisicoquímicos demuestran la utilidad del análisis sensorial como herramienta complementaria para la detección de contaminaciones, aunque en el caso de los estilos con caracteres fuertes o alta graduación alcohólica los defectos pueden verse enmascarados.

A raíz de los resultados obtenidos en este capítulo, se concluye que 8 de cada 10 fábricas presentaron problemas de contaminación sugiriendo que la presencia de bacterias y levaduras salvajes es una problemática común en las cervecerías artesanales y pone en evidencia la necesidad de implementar o ajustar los protocolos de calidad en las mismas. Así mismo, se pudo confirmar que las contaminaciones en cerveza envasada fueron casi 3 veces más frecuentes que previo a su acondicionamiento. Estos resultados cobran relevancia en la actualidad, ya que en el último año las prácticas de envasado en lata y botella han aumentado significativamente a raíz de la pandemia, poniendo de manifiesto la necesidad de implementar sistemas de control de calidad en fábrica que eviten los incidentes de contaminación en el área de envasado. Por último, se encontró que la presencia de acidez acompañado por una disminución del pH en la cerveza terminada puede servir como herramienta que sugiere la presencia de contaminaciones bacterianas.

Capítulo III

Identificación de microorganismos contaminantes



Introducción

Principales bacterias contaminantes

Como se explicó en el Capítulo 1, las bacterias ácido lácticas (BAL) lideran los eventos de contaminación de la cerveza artesanal en el mundo, en términos de frecuencia de contaminación y en los efectos negativos en el perfil de sabores de la cerveza (Back, 2005; Menz et al., 2010b; Schneiderbanger, 2019; Schneiderbanger et al., 2018; Suzuki, 2015). Los microorganismos designados como BAL, pertenecen a la familia *Lactobacillaceae* la cual tradicionalmente comprendía solo dos géneros: *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Estos dos géneros fueron responsables del 60-90 % de las contaminaciones en Europa durante el periodo 1980-2002 (Back, 2005). Una tendencia similar fue observada en los estudios realizados durante el período 2010-2013, utilizando análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Schneiderbanger et al., 2018). Esta tendencia fue observada nuevamente en el trabajo de Suzuki, (2020) quien amplió el análisis hasta 2016 encontrando BAL en un porcentaje de incidencia de este grupo de 95,5 % en 2016 (Schneiderbanger et al., 2018; Suzuki, 2020).

Las BAL han estado relacionadas con los alimentos desde hace siglos y constituyen un grupo de bacterias que comparten características morfológicas, metabólicas y fisiológicas, están relativamente relacionadas filogenéticamente. Se trata de bacterias con pared Gram positiva, que son anaerobias facultativas, catalasas negativas, no formadoras de esporas. A pesar de su metabolismo predominantemente anaeróbico, también son microaerófilas y en los medios de cultivo sólidos, son capaces de formar colonias en presencia de aire. Se pueden distinguir dos vías metabólicas principales de fermentación de carbohidratos, la vía homofermentativa y la vía heterofermentativa. La primera, utiliza la glucólisis (vía de Embden-Meyerhof - Parmas) y da como producto final casi exclusivamente ácido láctico bajo condiciones estándar. Las BAL heterofermentativas, utilizan la vía metabólica del 6-fosfogluconato y dan como resultado cantidades significativas de otros productos, como etanol, acetato y CO₂, además del ácido láctico (Khalid, 2011). Las BAL heterofermentativas también pueden

producir una serie de metabolitos como, propiónico y cítrico, bacteriocinas, vitaminas, peróxido de hidrógeno y exopolisacáridos de distinto peso molecular (Parra Huertas, 2010).

Las especies mayormente reportadas en incidentes de contaminación en cerveza tradicionalmente pertenecían al género *Lactobacillus*, aunque recientemente este género fue dividido y reclasificado dando lugar a nuevos géneros y muchas especies fueron renombradas por ser ampliamente diversas a nivel fenotípico, ecológico y genotípico (Zheng et al., 2020). Considerando la nueva taxonomía de la familia *Lactobacillaceae*, las especies que presentan la capacidad de desarrollarse en la cerveza son: *Levilactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri*, *Loigolactobacillus backii*, *Secundilactobacillus collinoides*, *Lacticaseibacillus casei* y *Lactiplantibacillus plantarum* (Back, 2005; Priest, 2006; Suzuki, 2015). Estas bacterias son principalmente heterofermentativas y altamente resistentes a los compuestos antibióticos del lúpulo. *Levilactobacillus brevis* es la bacteria con mayor incidencia de contaminación (Behr, 2008; Moretti, 2013; Sakamoto & Konings, 2003; Suzuki, 2020; Suzuki et al., 2006) alcanzando porcentajes de ocurrencia entre 35 y 51 % entre 1980 y 2016 (Suzuki, 2020). Por su parte, *Pediococcus* es un género de BAL ampliamente reportado en los eventos de contaminación. La especie *P. damnosus* la que más preocupa a los cerveceros, ya que produce grandes cantidades de diacetilo (aroma a manteca) (Back, 2005). También se ha relacionado a la presencia de *Pediococcus* el exceso de acidez, turbidez, sedimento granular y producción de exopolisacáridos (que proporcionan a la cerveza una consistencia gelatinosa). Además, se ha registrado que especies pertenecientes a este género pueden adherirse a las levaduras que lideran la fermentación generando, algunas veces, sedimentación prematura de las mismas, resultando en una fermentación lenta o incluso incompleta (Priest, 2006).

En los últimos años, las bacterias Gram negativas anaerobias estrictas *Megasphaera* y *Pectinatus* han aumentado su incidencia en los eventos de contaminación. Estas bacterias pertenecen a la familia *Acidaminococcaceae* y hasta la década del 1980 representaban el 6 % de los incidentes de contaminación microbiana. Este porcentaje aumentó a casi al 38 % en las siguientes décadas debido al avance de las tecnologías de llenado de botellas, ya que otorgan un porcentaje casi nulo de oxígeno que provee el ambiente adecuado para su crecimiento (Paradh, 2015). El crecimiento de estas

bacterias en la cerveza provoca turbidez, sedimentos, pequeños grumos y producción de ácido butírico, caproico y sulfhídrico, que producen aromas desagradables (Paradh, 2015; Paradh & Hill, 2016). El crecimiento de *Megasphaera* y *Pectinatus* en la cerveza depende de la combinación de varios factores, como el pH, el contenido de alcohol, y el más determinante: el contenido de oxígeno. La membrana externa que presentan las bacterias de estos géneros es altamente hidrofóbica e impide la entrada de los compuestos con actividad antimicrobiana del lúpulo (iso- α -ácidos) a la célula. (García García, 2012).

El segundo grupo de bacterias Gram negativas con la capacidad de alterar la cerveza son bacterias aerobias o anaerobias facultativas, entre ellas se encuentran las bacterias ácido acéticas (BAA) y enterobacterias. Inicialmente las BAA como *Acetobacter* y *Gluconobacter* eran los principales contaminantes de la cerveza, ya que pueden metabolizar el etanol a ácido acético, lo que le otorga a la cerveza sabor y aroma a vinagre (Sakamoto & Konings, 2003). Con la implementación de tecnologías que eliminan el oxígeno en la etapa de envasado y efectivos procesos de limpieza y sanitización, estas bacterias ya no se consideran de mayor relevancia para los cerveceros modernos, su importancia se limita a los sistemas dispensadores cerveza (Paradh & Hill, 2016; Sakamoto & Konings, 2003). Sin embargo, en el segmento de la cerveza artesanal es posible que aún sean causantes de problemas debido a la implementación de tecnologías de elaboración más tradicionales. Enterobacterias como *Obesumbacterium*, *Hafnia*, *Klebsiella* y *Citrobacter* pueden alterar el mosto, si se tarda en inocular la levadura, ya que crecen rápidamente y producen dimetil-sulfuro, compuestos fenólicos y diacetilo (Paradh, 2015). Estas bacterias no suelen causar alteraciones en la cerveza terminada, ya que en general, no toleran el etanol y los pH bajos (Vriesekoop et al., 2012). Sin embargo, pueden aparecer en las primeras etapas de la fermentación produciendo sabores y olores extraños e inhibición del crecimiento de la levadura cervecera.

Principales levaduras contaminantes

Como se explicó anteriormente, la presencia de levaduras que no hayan sido inoculadas intencionalmente por el productor, y no están bajo su control, pueden alterar la cerveza

y se las considera “levaduras salvajes” (por su definición en inglés *wild yeast*) o “levaduras contaminantes”. El crecimiento de levaduras contaminantes durante la fermentación y / o en el producto envasado puede dar lugar a múltiples defectos, como turbidez, sedimentos, superatenuación y sabores desagradables como consecuencia de compuestos fenólicos, ácidos, ácidos grasos y ésteres (Matoulková et al., 2013). Las levaduras contaminantes se pueden dividir en dos grupos: las pertenecientes al género *Saccharomyces* y las que no son de este género. Las primeras representan el mayor riesgo y su detección y control es un desafío para las cervecerías por su similitud fisiológica y morfológica con la levadura inoculada. El grupo de levaduras contaminantes no *Saccharomyces* es heterogéneo: contiene levaduras de los géneros *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Filobasidium*, *Wickerhamomyces*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Hansenula*, *Torulopsis*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulaspora*, *Filobasidium*, *Sporobolomyces* y *ZygoSaccharomyces* (Suiker & Wösten, 2022). Los géneros *Candida* y *Pichia* son los más comunes en las plantas cerveceras (Matoulková et al., 2013; van der Aa Kühle, 1998). En términos de los defectos que producen en la cerveza, estas levaduras se consideran menos riesgosos que las del grupo *Saccharomyces*, particularmente por su capacidad restringida para crecer y multiplicarse bajo condiciones anaeróbicas y también para fermentar azúcares presentes en el mosto (Boulton & Quain, 2001).

El sector artesanal de producción de cerveza está actualmente, atravesando un período de cambio y experimentación impulsado, en gran medida, por la demanda de los clientes de experimentar sabores alternativos, nuevos estilos e incluso cervezas con bajo contenido de alcohol (Gibson et al., 2017). Para atender esta necesidad de innovación, algunas levaduras (y bacterias) han pasado de ser microorganismos indeseables asociados al deterioro de los alimentos (incluida la cerveza), a agentes claves en el desarrollo de productos novedosos (Sannino et al., 2019). Para evaluar el potencial uso de levaduras no convencionales en la producción de cerveza, las investigaciones se centran en estudiar características como la utilización de maltosa (principal azúcar del mosto), el desempeño fermentativo, la tolerancia al etanol y a bajas temperaturas, la tolerancia a los compuestos que provienen del lúpulo, la utilización de aminoácidos, la formación de POF y de compuestos de sabor y aroma, y también la síntesis de enzimas que interactúan con el lúpulo (Burini et al., 2021). Se ha evaluado el potencial uso en la

producción de cerveza de levaduras no sacaromycéticas como *Wickerhamomyces anomalus*, *Brettanomyces claussenii*, *Torulasporea delbrueckii* y diferentes especies de *Pichia*, entre otras, así como levaduras del género *Saccharomyces* no domesticadas (Azzolini et al., 2012; Basso et al., 2016; Bellut et al., 2018; Burini et al., 2021; Capece et al., 2018; Gibson et al., 2017). Sin embargo, muchos de los parámetros fermentativos y compuestos aromáticos de interés para la producción de cerveza, suele ser cepa dependiente (Bellut et al., 2018) por lo que el estudio de estas características debe ser evaluado en cada cepa.

Métodos de identificación de microorganismos contaminantes

En los últimos años se ha observado un crecimiento importante en la oferta de métodos moleculares aplicados para la identificación de microorganismos relacionados al entorno cervecero. En la Tabla 3.1. se listan las metodologías más utilizadas basadas en métodos morfológicos y fisiológicos, métodos genéticos, métodos inmunológicos y quimiotaxonómicos para la identificación de bacterias y levaduras relacionadas con la elaboración de cerveza.

Tabla 3.1. Descripción general de los métodos de identificación y diferenciación de bacterias y/o levaduras relacionadas al entorno cervecero. Tomado de (Hutzler et al., 2015) con modificaciones.

Tipo de metodología	Método	Referencias
Métodos morfológicos y fisiológicos	<i>Métodos tradicionales</i> (Medios de cultivo selectivos/diferenciales, catalasa, oxidasa, Gram, esporulación, utilización de distintos carbohidratos, etc.) <i>Sistemas fisiológicos comerciales en miniatura</i> (API 20C, AUX, rapid IDyeast plus)	(ASBC Microbiological Control 5, 2011; Bou et al., 2011; Briggs et al., 2004; Green & Gray, 1950; Kurtzman & Fell, 2011; Lin, 1981; Martin & Moll, 1984; Matoulková et al., 2013; Priest, 2006)
Métodos quimiotaxonómicos	<i>Análisis de ácidos grasos totales</i> (FAME = determinación de metilo de ácidos grasos compuestos de éster)	(Timke et al., 2005)
	<i>Huellas dactilares de proteínas</i> (mapa de proteínas 2D)	(Kobi et al., 2004)

	<i>Métodos de espectrometría de masas</i> (MALDI-TOF MS, GC-TOF MS)	(Blättel et al., 2013; Lauterbach et al., 2017; Usbeck et al., 2013)
	<i>Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier</i> (FT-IR)	(Büchl et al., 2008)
Métodos inmunológicos	<i>Técnica basada en anticuerpos monoclonales</i> (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas)	(Schloter et al., 1995)
Métodos genéticos	<i>Secuenciación</i> (Regiones específicas/ genoma completo)	(Bou et al., 2011; Hutzler, 2009; Kurtzman et al., 2011)
	<i>Cariotipo</i> (Comparación de tamaño, forma y número de los cromosomas)	(Esteve-Zarzoso et al., 2001; Sipiczki et al., 2010).
	<i>Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción</i> (RFLP, mt ADN)	(Beltran et al., 2002); (Kurtzman et al., 2011; Priest & Campbell, 2003; Ruiz et al., 2000)
	<i>Hibridación in situ de fluorescencia/quimioluminiscencia</i> (Fish/CisH)	(Kurtzman et al., 2011; Xufre et al., 2006).
	<i>Métodos Basados en PCR</i> (PCR (cebadores específicos) PCR-DGGE, PCR TGGE PCR-DHPLC PCR en tiempo real RAPD-PCR SAPD-PCR PCR de microsatélites AFLP-PCR)	(Hutzler, 2009; Hutzler et al., 2010; Juvonen et al., 2008; Kurtzman et al., 2011; Priest, 2006; Ruiz et al., 2000; Schneiderbanger et al., 2018)

Dados los problemas inherentes que presentan los sistemas de identificación fenotípicos (por ejemplo, el tiempo, la especificidad y que no todas las cepas de una misma especie muestran características fisiológicas y morfológicas homogéneas), los métodos de identificación basados en el ADN se han establecido como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia. Los métodos moleculares acortan los tiempos de respuesta de los denominados métodos convencionales ya que en general, no dependen del cultivo de los microorganismos para su identificación. Sin embargo, suelen tener un costo superior, ya que requieren un equipamiento específico y personal calificado de los que no se dispone en todos los laboratorios. Asimismo, la

identificación molecular no es siempre accesible de forma inmediata y generalmente se utiliza conjuntamente con la identificación tradicional.

En la década de los 80, comenzó la búsqueda de candidatos que, siendo genes estables, permitieran establecer relaciones filogenéticas entre los microorganismos, como los genes que codifican para las subunidades ribosómicas 5S, 16S, 23S en bacterias (Bou et al., 2011) y 5,8S, 18S y 26S en levaduras (Kurtzman et al., 2011). En la taxonomía bacteriana, el análisis de la secuencia génica del ARNr 16S es la herramienta más ampliamente utilizada. Este marcador *housekeeping* está presente en todas las bacterias y se presenta como una familia de multigenes u operones cuya función casi no se modifica con el tiempo y actúa como un marcador eficiente de evolución (Bou et al., 2011). De la misma manera, en la taxonomía de levaduras, a menudo se utiliza el dominio 26S rDNA D1/D2 y el espaciador transcrito interno (ITS) para la identificación a nivel de especie (Kurtzman et al., 2011). Estos marcadores además de ser útiles para la detección e identificación de los microorganismos, proporcionan información útil y rápida sobre su filogenia, ya que mediante la comparación con bases de datos públicas que contienen un amplio número de secuencias, es posible establecer relaciones de parentesco entre los microorganismos.

Por otro lado, el uso de la técnica de desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) ha cobrado gran relevancia y ha mostrado gran potencial como herramienta para la identificación rápida y fiable de levaduras y bacterias en la industria de las bebidas y alimentos (Lauterbach et al., 2017; Usbeck et al., 2013). Esta técnica utiliza las proteínas microbianas que dan como resultado un espectro de masas con un patrón característico en intensidad y distribución de masa. Para muchos microorganismos, este patrón es específico de la especie y se puede utilizar como una “huella digital peptídica” para identificar los microorganismos.

Las ventajas de la espectrometría de masas MALDI-TOF son el alto rendimiento, el bajo costo en reactivos, la aplicación en muestras sólidas y la facilidad de uso. En el caso de la identificación tiene especial relevancia la rapidez en la emisión de resultados, la posibilidad de partir de una colonia minúscula y la identificación de microorganismos difíciles de identificar por métodos convencionales. La principal desventaja es el alto costo del equipo, la imposibilidad de identificar microorganismos muy relacionados

entre sí, o microorganismos que no estén presentes en la base de datos (Hutzler et al., 2015; Mansilla et al., 2019; Usbeck et al., 2013).

Cada sistema MALDI-TOF tiene su propia base de datos de microorganismos, que es propiedad del sistema y que construyen y mantienen las propias compañías. Por lo que la sensibilidad de identificación dependerá, en parte, de que tan completa sea la base de datos. En ocasiones el software del MALDI-TOF proporciona identificaciones a nivel de género o especie con unos valores de fiabilidad altos y que sin embargo no son lo suficientemente precisos. Esto ocurre debido a que hay microorganismos muy relacionados entre sí cuyos espectros de masas son iguales o casi iguales y el software del equipo no permite diferenciarlos. En este caso hay que tener en cuenta que se debe informar sólo a nivel de género o de grupo (Mansilla et al., 2019). Sin embargo, en el futuro estas limitaciones podrían ir desapareciendo con las mejoras de las bases de datos.

Este capítulo tuvo como objetivo estudiar la identidad de las bacterias y levaduras aisladas en el capítulo 2 utilizando métodos genéticos y quimiotaxonómicos.

Materiales y métodos

A partir de las placas sembradas con cerveza que registraron crecimiento microbiano (Capítulo 2), se aislaron las colonias con diferente morfología. Se crioconservaron en total, 78 bacterias y 72 levaduras para su identificación. La identidad de los aislamientos fue evaluada utilizando técnicas moleculares basadas la secuenciación de genes ribosomales (ADNr) o en algunos casos, la técnica quimiotaxonómica MALDI- TOF MS.

Identificación basada en métodos moleculares de ADN

Extracción de ADN

La extracción del ADN de bacterias y levaduras no sacaromycéticas fue realizada a partir de un cultivo puro de 24-48 h, del cual se tomó una ansada de biomasa y se resuspendió en 500 µL de EDTA 5 mM. Luego se centrifugó por 5 min a 8000 rpm y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se congeló a -80°C por 30 min y luego se colocó en

baño termostático a 65°C. Se agregaron perlas de vidrio y 500 µL de Buffer de lisis (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 2 % Triton X-100, 1 % SDS) y 250 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1 v/v). Se incubó en agitación durante 20 min y se separaron las fases mediante centrifugación (10 min a 13000 rpm). Se recuperó la fase acuosa, se agregaron 2 vol de etanol al 70 % v/v frío y se incubó 30 min a -80°C para precipitar el ADN. Se centrifugó 5 min a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante. El pellet de ADN se lavó con 500 µL de etanol absoluto frío y luego se resuspendió con 50 µL de agua libre de ADNasa/ARNasa (Libkind et al., 2003).

Secuenciación de la región ITS y 16S de ADN ribosómico

Las bacterias fueron identificadas mediante la amplificación de la subunidad ribosomal 16S por PCR con los cebadores 27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1495r (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3') (Kolbert & Persing, 1999) y la identidad de las levaduras se estudió mediante la amplificación de la región ITS del ARNr utilizando el cebador ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') según White et al. (1990).

Los productos de amplificación de levaduras y bacterias fueron secuenciados por MACROGEN Korea. Las secuencias obtenidas se editaron manualmente y se compararon contra las secuencias tipo equivalentes en bases de datos públicas accesibles (GenBank) usando la herramienta computacional BLAST disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>.

La secuenciación de 3 aislamientos bacterianos presentó resultados inconclusos, por lo cual fueron identificados en el Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA, CONICET) según Nediani et al. (2017).

Identificación basada en espectrofotometría de masa (MALDI- TOF MS)

El método de espectrometría de masas de ionización / desorción láser asistida por matriz (MALDI- TOF MS) se utilizó para la identificación de bacterias, levaduras sacaromicéticas y no sacaromicéticas que no se pudieron identificar mediante secuenciación de la región ITS (levaduras) o 16S (bacterias) por baja calidad de las secuencias. Esta metodología se realizó en el centro de investigación para la elaboración

de cerveza y la calidad de los alimentos Weihenstephan, instituto de investigación perteneciente a la Universidad Técnica de Munich en Fraising, Alemania. Esta etapa se realizó en el marco de una pasantía de investigación financiada por la empresa de levaduras secas *Lallemand* en el año 2019.

Para llevar a cabo la identificación, las cepas fueron crecidas en YM agar (levaduras) y agar nutritivo suplementado con mosto cervecero (bacterias) durante 48hs a 25°C. Se esparció el material biológico de una sola colonia recién cultivada directamente sobre la matriz de lectura, creando una película delgada con un palillo estéril. Cada pocillo de la placa matriz se cubrió con 1 µL de ácido fórmico al 70 % (Sigma Aldrich, Alemania). Se secó la placa matriz a temperatura ambiente y luego se agregó 1 µL de solución matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (Sigma Aldrich, Alemania), con una concentración final de 10 mg / ml (50,0 % ACN, 2,5 % ácido trifluoroacético (Sigma Aldrich, Alemania)). Se utilizó un equipo MALDI Biotyper y un software FlexControl (versión 3.0 Bruker Daltonics). Los parámetros fueron ajustados según recomendaciones del fabricante (Bruker Daltonik GmbH, 2016). Para la calibración del espectrómetro se utilizó un estándar que consistió en el perfil proteico de una cepa de *Escherichia coli* DH5 péptido alfa, que posee proteínas adicionales (BTS; Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). El BTS se utilizó también como control positivo para validar la corrida.

El espectro creado por cada aislamiento se comparó con los espectros de referencia en la base de datos y el algoritmo del programa FlexControl generó una puntuación entre 0,000 y 3,000. Cuanto mayor fue la puntuación, mayor fue el grado de similitud entre los espectros de la muestra y los de la base de datos en la biblioteca de referencia. Se utilizó un registro mayor o igual a 2 para identificar los aislamientos a nivel de especie y 1,8 a 2 para identificación a nivel de género, según lo recomienda el manual de usuario del equipo MALDI Biotyper (Bruker Daltonik GmbH, 2016).

Resultados

Al evaluar la identidad de los aislamientos según los métodos explicados anteriormente, se observó que muchas bacterias y levaduras aisladas de una misma muestra presentaron la misma identidad a pesar de haber mostrado diferente morfología al

momento de su aislamiento. Estos aislamientos “repetidos” (19 aislamientos de bacterias y 12 de levaduras) no fueron considerados en los análisis de resultados para no sobreestimar la incidencia de dicho microorganismo en las muestras.

Por otro lado, algunos aislamientos no pudieron ser identificados ya que no sobrevivieron a la crioconservación o se contaminaron los cultivos. En otros casos, no fue posible la identificación por problemas de resolución de las secuencias o el espectro generado por MALDI- TOF. Estos casos incluyen 15 bacterias (6 bacterias del grupo 1 y 9 bacterias del grupo 2) y 2 aislamientos de levaduras (grupo 2) que no pudieron ser identificados.

Identificación de bacterias

De las cervezas que registraron crecimiento de bacterias (64) fue posible la identificación taxonómicamente de 44 aislamientos. Los resultados de identificación se resumen en la Tabla 3.2. y los detalles de cada aislamiento (origen geográfico, formato de la muestra, estilo de la cerveza de origen, fecha de aislamiento, etc.) se encuentran en el ANEXO II. Los resultados mostraron que 26 aislamientos (40 % de las muestras con bacterias) pertenecían a *Levilactobacillus brevis*, presente en el 16,7 % de las muestras de cervezas analizadas. Esta bacteria se encontró en principalmente en muestras de cerveza embotellada, aunque también estuvo presente en cervezas terminadas provenientes de tanques (ANEXO II). Además de esta bacteria, otro aislamiento de bacteria ácido láctica (BC17) proveniente de cerveza en botella fue identificado como *Loigolactobacillus backii*.

El segundo grupo más representativo pertenece al género de bacterias ácido acéticas *Acetobacter* sp. con 10 aislamientos obtenidos a partir de muestras de cerveza embotellada. Esta bacteria se encontró presente en el 8,3 % de las muestras analizadas (15,6 % de las muestras con bacterias). No fue posible la identificación a nivel de especie ya que la comparación de las secuencias según el algoritmo Blast arrojó resultados ambiguos para 8 de los 10 aislamientos. Sin embargo, fue posible discriminar entre pares de especies: los aislamientos BC29, BC35, BC45 y BC69 presentaron 99,61 % de afinidad con *A. malorum* y *A. cerevisiae*, mientras que los aislamientos BC31 y BC38 presentaron similitud del 99,25 % con *A. aceti* y *A. sicerae*, los aislamientos BC43 y BC50 presentaron

99,71 % de afinidad con las especies *A. faborum* y *A. lovaniensis*. El aislamiento BC41 presentó similitud con las especies *Asaia bogorensis* y *Asaia lannensis*, sin embargo, el porcentaje de identidad fue menor al 90 %.

Un tercer grupo está integrado por 5 enterobacterias (todas aisladas de cerveza embotellada), 3 de estos aislamientos fueron identificados como *Raoultella ornithinolytica* (BC23, BC25 y BC26), provenientes de la misma cervecería (diferentes muestras), uno como *Cronobacter dubliniensis* (BC81) y otro como *Klebsiella oxytoca* (BC82) estos últimos pertenecientes a otras dos cervecerías. Las muestras de origen de estas enterobacterias se caracterizaron por poseer densidades finales elevadas (y, por lo tanto, valores de alcohol menores de lo esperado) y un pH elevado en comparación al promedio de cervezas analizadas (4,42 – 4,89) ambos atributos, que son indicativos de fermentaciones ineficientes o inconclusas. Además, se obtuvieron aislamientos individuales pertenecientes a las especies *Pseudomonas hunanensis* y *Staphylococcus epidermis* provenientes de muestras de cerveza embotellada (ANEXO II).

Por último, en la Tabla 3.2. se puede observar que algunas cervecerías presentaron diversidad de contaminantes en sus cervezas, por ejemplo, la cervecería BRY 3 y BRY 15, se aislaron 3 especies de bacterias diferentes. Asimismo, se aisló el mismo microorganismo en diferentes muestras de la misma cervecería, por ejemplo, la cervecería BRY 15 y la cervecería BRY 21 presentaron contaminación con la misma bacteria en los 3 estilos de cerveza analizados.

Tabla 3.2. Identificación molecular de bacterias contaminantes de cervezas artesanales de la Patagonia Andina, centro y costa atlántica de Argentina, utilizando secuenciación de la región 16S o MALDI- TOF MS como métodos de identificación.

Grupo taxonómico	Especie	Método ID	Cervecería (N° de aislamientos)	Código aislamiento
Bacterias ácido lácticas (Gram +)	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Sec. ADN >99,28 %	BRY 3 (2)	BC32, BC36
			BRY 15 (2)	BC16, BC60
			BRY 16 (2)	BC48, BC64
			BRY 17 (2)	BC103, BC104
			BRY 18 (1)	BC15
			BRY 20 (1)	BC55
			BRY 21 (1)	BC19
			BRY 23 (1)	BC28
			BRY 30 (1)	BC49
			BRY 31 (3)	BC51, BC53, BC62
			BRY 33 (2)	BC58, BC59
			BRY 36 (1)	BC65

			BRY 37 (1)	BC67
		MALDI- TOF MS >2.00	BRY 44 (1) BRY 55 (4)	BC105 PAC BC001, PAC BC002, PAC BC003, PAC BC010
	<i>Loigolactobacillus backii</i>	Sec. ADN 99,91 %	BRY 15 (1)	BC17
Bacterias ácido acéticas* (Gram -)			BRY 5 (1)	BC29
			BRY 3 (1)	BC35
	<i>Acetobacter malorum</i>	Sec. ADN	BRY 6 (1)	BC45
	<i>Acetobacter cerevisiae</i>	>99,61 %	BRY 38 (1)	BC69
			BRY 10 (1)	BC39
			BRY 27 (1)	BC42
	<i>Acetobacter faborum</i>	Sec. ADN	BRY 28 (1)	BC43
	<i>Acetobacter lovaniensis</i>	>99,71 %	BRY 31 (1)	BC50
	<i>Acetobacter aceti</i>	Sec. ADN	BRY 3 (2)	BC31
	<i>Acetobacter sicerae</i>	>99,25 %		BC38
	<i>Asaia bogorensis</i>	Sec. ADN	BRY 3 (1)	BC41
	<i>Asaia lannensis</i>	85,24 %		
Otras bacterias	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Sec. ADN 99,80 %	BRY 21 (3)	BC23, BC25, BC26
	<i>Cronobacter dublinensis</i>	Sec. ADN 98,89 %	BRY 42 (1)	BC81
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Sec. ADN 99,89 %	BRY 7 (1)	BC82
	<i>Staphylococcus epidermis</i>	Sec. ADN 99,89 %	BRY 35 (1)	BC63
	<i>Pseudomonas hunanensis</i>	Sec. ADN 99,51 %	BRY 15 (1)	BC18

*Se presentan las 2 identidades posibles para cada bacteria acética ya que la comparación de las secuencias según el algoritmo Blast arrojó resultados ambiguos. Seq. AND: secuenciación de ADNr utilizando los primers 27f y 1942r.

Identificación de levaduras contaminantes

De las muestras estudiadas, 60 de ellas registraron crecimiento de levaduras contaminantes a partir de las cuales se aislaron 72 levaduras siendo posible la identificación de 58 de ellas, tanto sacaromícéticas como no sacaromícéticas. Treinta y cuatro aislamientos fueron identificados como *Saccharomyces* spp. (Tabla 3.3) utilizando MALDI- TOF MS (56,6 % de las muestras contaminadas con levaduras), representando el 23 % de las cervezas totales involucradas en este estudio. Este tipo de levaduras se encontró tanto en muestras de tanques como de botellas y fue hallada en ambos grupos geográficos (ANEXO II).

Los restantes 24 aislamientos correspondieron a levaduras no sacaromycéticas, representando el 15,5 % de las muestras analizadas (y 41,4 % de las cervezas con levaduras) (Tabla 3.3). Estas levaduras fueron identificadas como *Wickerhamomyces anomalus* (8 aislamientos), *Pichia* sp. (8 aislamientos), *Candida* sp. (3 aislamientos), *Clavidospora lusitaniae* (1 aislamiento), *Torulospora delbrueckii* (1 aislamiento) y *Wickerhamiella pararrugosa* (1 aislamiento) todos ellas pertenecientes al filum *Ascomycota*. Además, fue posible identificar a dos aislamientos pertenecieron al filum *Basidiomycota* identificados como *Trichosporon ovoides* y *Naganishia adeliensis* (ANEXO II).

Como en el caso de las bacterias, se puede observar diversidad de levaduras contaminantes en una misma fábrica, como es el caso de la cervecería 3 que presentó 3 levaduras contaminantes de diferente especie además de las 3 especies de bacterias mencionadas anteriormente. Asimismo, algunas fábricas como BRY 1, BRY 21 y BRY 8 presentaron múltiples aislamientos de la misma levadura.

Tabla 3.3. Identificación molecular de levaduras contaminantes aisladas de cervezas artesanales de la Patagonia Andina, centro y costa atlántica de Argentina, utilizando secuenciación de la región ITS o MALDI- TOF MS como métodos de identificación.

Grupo taxonómico	Especie	Método	Cervecería (N° de aislamientos)	Código Aislamiento
Ascomycota	<i>Saccharomyces</i> sp.	MALDI-TOF MS 1,80-2,00	BRY 1 (4)	PAC LC012, PAC LC013, PAC LC014, PAC LC015
			BRY 2 (1)	PAC LC023
			BRY 3 (2)	LC34, PAC LC021
			BRY 4 (1)	LC47
			BRY 5 (1)	LC26
			BRY 6 (3)	LC42, LC43, PAC LC022
			BRY 7 (1)	LC54
			BRY 8 (3)	PAC LC002, PAC LC007, PAC LC010
			BRY 9 (3)	LC339, PAC LC016, PAC LC017
			BRY 10 (1)	LC38
			BRY 11 (2)	LC109, LC110
			BRY 12 (1)	LC21
			BRY 13 (1)	LC35
			BRY 14 (4)	LC23, LC24,

			LC25A, LC25B
		BRY 15 (2)	LC16, LC50
		BRY 16 (1)	LC45
		BRY 43 (1)	LC100
		BRY 17 (2)	LC104, LC105
		BRY 21 (1)	LC19
		BRY 23 (1)	LC32
	Seq.ADN	BRY 28(1)	LC40
	>99,82 %	BRY 6 (1)	LC44
<i>Wickerhamomyces</i>		BRY 17 (1)	LC103
<i>anomalous</i>		BRY 44 (1)	LC107
	MALDI- TOF MS	BRY 8 (1)	PAC LC006
	>2,00	BRY 3 (1)	PAC LC019
			LC102, LC106
		BRY 17 (2)	LC108
<i>Pichia</i> sp.	MALDI- TOF MS	BRY 46 (1)	PAC LC003
	1,80-2,00	BRY 23 (1)	PAC LC001,
		BRY 8 (4)	PAC LC005, PAC LC009 B, PAC LC0011
	MALDI- TOF MS	BRY 56 (2)	PAC LC018,
<i>Candida</i> sp.	1,80-2,00	BRY 3 (1)	PAC LC024 PAC LC020
<i>Torulospora</i> <i>delbrueckii</i>	MALDI- TOF MS	BRY 8 (1)	PAC LC009 A
	>2,00		
<i>Clavidospora</i> <i>lusitaniae</i>	Seq. ADN	BRY 21 (1)	LC18
	100 %		
<i>Wickerhamiella</i> <i>pararrugosa</i>	Seq. ADN	BRY 3 (1)	LC33
	99,89 %		
<i>Trichosporon</i> <i>ovoides</i>	Seq. ADN	BRY 3 (1)	LC31
	99 %		
Basidiomycota	Seq. ADN	BRY 7 (1)	LC52
	100 %		
<i>Naganishia</i> <i>adeliensis</i>			

Discusión

La identificación molecular confirmó que *L. brevis* es la especie que predomina en las cervezas contaminadas con bacterias, lo mismo ha sido descrito por Suzuki (2015). Dicho trabajo, mostró que *L. brevis* fue y es la principal bacteria que contamina la cerveza en Europa, contabilizando 26-51 % de los incidentes de contaminación según múltiples estudios realizados entre 1980 y 2016. *Lactobacillus backii* también es una bacteria descrita frecuentemente en los incidentes de contaminación (Bohak et al.,

2006; Schneiderbanger, 2019; Schneiderbanger et al., 2018) aunque en este trabajo estuvo representada por un solo aislamiento, esta bacteria fue responsable del 5 -15 % de los incidentes de contaminación en Europa (Schneiderbanger, 2019; Schneiderbanger et al., 2018). En síntesis, se identificaron BAL en el 17 % de las cervezas estudiadas en este trabajo, aunque este número podría estar subestimado ya que 15 aislamientos bacterianos no pudieron ser identificados y al menos 12 de las muestras de origen de dichos aislamientos registraron crecimiento en el medio HLP. Además, como se discutió en el capítulo II, la incidencia de BAL teniendo en cuenta los resultados del medio HLP fue de 28,3 % de las cervezas de los sitios estudiados.

Aunque la bibliografía consultada asegura que el género *Pediococcus* representa entre el 1 y 15 % de las contaminaciones (Schneiderbanger et al., 2020; Suzuki, 2015) no se aislaron representantes de este género en las muestras de cerveza estudiadas. Esto podría deberse a que esta bacteria está catalogada como “difícil de cultivar” en los medios utilizando las técnicas tradicionales de cultivo y su detección es más frecuente mediante métodos rápidos de tecnología de ADN independientes de cultivo. *Pediococcus* es conocida como una bacteria de crecimiento lento en los medios de detección de laboratorio y, a menudo, requiere algunos componentes específicos de la cerveza para su crecimiento (Suzuki, 2015). Además, se ha observado que crece a temperaturas bastante bajas (entre 22 y 25 °C) en comparación con la temperatura óptima de otras bacterias contaminantes (25°- 30 °C). Asimismo, se sabe que *Pediococcus* crece preferentemente en ambientes relativamente ricos en CO₂ y a pH superiores a 4,2 y con bajos contenidos de ácidos amargos de lúpulo y etanol (Sakamoto & Konings, 2003). Cabe señalar también que, debido a la naturaleza difícil de cultivar, las especies de *Pediococcus* y otras BAL como *L. lindneri* y *L. paracollinoides* pueden haber sido subestimadas como agentes causantes de contaminación microbiológica en la industria cervecera (Suzuki, 2015).

El segundo grupo de bacterias aislado con alta frecuencia en este trabajo fue el del género *Acetobacter*. Su elevada ocurrencia en producto final denota que las microcerveceras, al menos hasta el momento que se realizó este trabajo, no contaban con el equipamiento adecuado para impedir el ingreso de oxígeno en el proceso de producción o en la etapa de envasado para reprimir el crecimiento de estos microorganismos aerobios obligados. Este tipo de bacterias poseen un rol importante

en la iniciación de *biofilms*, y debido a la mayor resistencia a la limpieza mecánica y química, actúan como reservorio de otros microorganismos contaminantes (Juvonen, 2015; Paradh, 2015; Schneiderbanger, 2019). Con la información proporcionada por la secuenciación de la región 16S fue posible determinar al menos tres tipos de *Acetobacter* diferentes que afectaron a las cervezas patagónicas. Este inconveniente también fue observado por Vega Perez (2010) quien asegura que la región 16S de ADN ribosomal no discrimina entre especies muy próximas por el alto grado de similitud en la secuencia. Varios estudios han demostrado que las secuencias de genes *housekeeping* como *dnaK*, *groEL* y *rpoB* tienen una resolución superior en comparación a las secuencias de genes 16S rRNA para determinar las relaciones filogenéticas de especies estrechamente relacionados de la familia *Acetobacteraceae* (Brady et al., 2008; Cleenwerck et al., 2010; Martens et al., 2007).

En tercer lugar, se aislaron bacterias pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, cuya presencia se utiliza como indicadora del nivel de higiene y sanitización en las plantas de producción debido a que normalmente son susceptibles al etanol y a pH bajos (Paradh & Hill, 2016). Por esta razón algunas enterobacterias como *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Escherichia* y *Klebsiella* normalmente no son capaces de desarrollarse en la cerveza terminada (Menz et al., 2010b, 2011; Paradh & Hill, 2016) pero en algunos casos pueden sobrevivir por tiempos prolongados en el producto si hubo reproducción en las etapas iniciales de la fermentación. Por ejemplo, enterobacterias patógenas como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* son capaces de sobrevivir hasta 30 días cuando se las conserva a 4°C incluso en presencia de 5 % de alcohol o 20 días a pH inferior a 4 (Menz et al., 2011). Esto explicaría el aislamiento de enterobacterias en las cervezas de este trabajo, ya que las mismas presentaron densidades finales elevadas (y por lo tanto valores esperados de alcohol menores a lo esperado), y/o pH relativamente altos (4,4-4,9), ambos indicadores de fermentaciones ineficientes y/o inconclusas. Nuestros resultados indican la existencia, si bien en muy baja proporción (3,2 % de las cervezas, 5,3 % cervecerías), de enterobacterias en cervezas artesanales. Esta situación atenta contra la calidad y sobre todo la inocuidad de la cerveza artesanal al no generarse las barreras fisicoquímicas normales de la cerveza, principalmente niveles de alcohol y pH adecuados.

En relación a la identificación de levaduras, dos tercios de los aislamientos obtenidos, correspondieron al género *Saccharomyces*. En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y Gran Buenos Aires, Duhourq et al. (2021) encontraron una incidencia de levaduras *Saccharomyces* contaminantes en el 36,6 % de las cervezas analizadas provenientes de barril, lo cual representó un 57,9 % de las muestras contaminadas con levaduras. Como conclusión, podría decirse que estas levaduras dominan los incidentes de contaminación en los principales polos productivos de cerveza artesanal de nuestro país. De la misma manera, varios autores observaron que, el género *Saccharomyces* fue el dominante en los incidentes de contaminación en Europa (Deák, 2008; Hutzler et al., 2012; Meier-Dörnberg et al., 2017; Suzuki, 2020). En el capítulo 4 se analizará en detalle la identidad de los aislamientos del género *Saccharomyces*.

En cuanto al grupo de levaduras no sacaromicéticas, *Wickerhamomyces anomalus* fue una de las levaduras más frecuentes en las muestras (presente en el 5,16 % de las cervezas estudiadas), y se encontró tanto en muestras de botella como de tanque en ambos sitios estudiados. Esta levadura ascomicética es un contaminante frecuente en cerveza y otras bebidas (Hutzler et al., 2012; Satora et al., 2014). También se ha observado que *W. anomalus* juega un rol importante en la formación de *biofilms*, ya que esta levadura domina la colonización de superficies de los equipos en las líneas de llenado de cerveza (Storgårds et al., 2006). En los últimos años, se ha puesto atención en el uso de esta levadura como “levadura no convencional” para el desarrollo de nuevos estilos y cervezas distintivas. Esto se debe a que muchas cepas de *W. anomalus* produce marcados niveles de esteroides y alcoholes entre los que se destacan sabores asociados con banana y rosas, aromas deseables que pueden impartir novedosas características a la cerveza (Ravasio et al., 2018).

Al igual que *W. anomalus*, levaduras del género *Pichia*, también mostraron elevados niveles de incidencia en las cervezas estudiadas (5,16 % de las cervezas estudiadas). Aunque no fue posible discriminar a nivel de especie con total certeza (ya que los valores de identificación por MALDI-TOF se encontraron entre 1,8 y 2), el software propone que la especie más probable según la base de datos, corresponden a *P. membranofaciens* o *P. fermentans*, aunque para confirmar esta afirmación, son necesarios estudios genéticos. La aproximación que brinda MALDI-TOF acerca de que *P. membranofaciens* o *P. fermentans* son las especies más probables, cobra sentido al consultar la

bibliografía, ya que estas especies son típicas levaduras que contaminan bebidas, y se han encontrado en jugo de manzana, cidra, cerveza, refrescos, mosto y vino (Deák, 2008). Los parámetros fermentativos de estas especies están actualmente en estudio para evaluar su implementación como levaduras no convencionales, ya que representan una potencial fuente de innovación (Vicente et al., 2021).

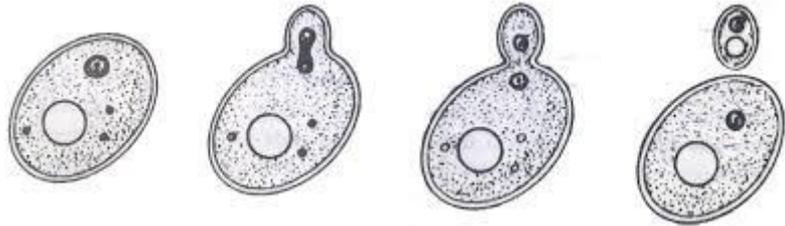
El género *Candida* es ampliamente diverso a nivel fenotípico, ecológico y genotípico (Kurtzman et al., 2011) y como consecuencia de esta diversidad, está en constante revisión y reclasificación (Boontham et al., 2021; Kurtzman et al., 2016). Las especies pertenecientes al género *Candida* son sospechosas de ser patógenas o patógenos oportunistas, aunque de las 300 especies, solo unas pocas especies (y cepas) tienen esta capacidad. Esto se debe a que la especie *C. albicans* es la especie que con mayor frecuencia es responsable de los trastornos clínicos/médicos en infecciones por levaduras (Goldenberg et al., 2005). Otras especies del género *Candida* como *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. sake*, *C. intermedia* y *C. guilliermondii* juegan un papel importante no sólo en fermentaciones espontáneas, sino también como microorganismos que deterioran bebidas y otros alimentos. Que las especies de *Candida* que contaminan las bebidas puedan ser o no patógenos (oportunistas), no está bien documentado en las pruebas microbiológicas realizadas en las bebidas y como consecuencia en la literatura no se le presta mucha atención a este hecho (Hutzler et al., 2012). Las especies de *Candida* reportadas como deteriorantes de cerveza, son *C. parapsilosis*, *C. sake* y *C. intermedia* (Hutzler et al., 2012) son especies de levadura que actúan de forma oportunista, y se han encontrado en cerveza, en equipos de cervecerías además de jugos y bebidas sin alcohol. En este trabajo la identificación a nivel especie de los 3 aislamientos de *Candida* utilizando tecnología MALDI-TOF, no fue del todo certera, ya que los puntajes asociados en la identificación de estas levaduras estuvieron entre 1,8 – 2, y esto significa que no se cumplieron los requisitos de alta consistencia elegidos. Sin embargo, el sistema arrojó que la mejor coincidencia en la base de datos, fue con *C. intermedia* para el aislamiento PAC LC20 y *C. guilliermondii* para PAC LC18 y PAC LC24. Si esta identificación fuera confirmada, es importante considerar que *C. guilliermondii* además de haberse encontrado en entornos de fermentaciones espontáneas, también ha sido reportada como patógena. Por ejemplo, *C. guilliermondii* es causante de 0,7 % de las candidiasis a nivel mundial y 3,7 % en Latinoamérica (Gómez

et al., 2011; Pfaller et al., 2010). Por su parte, *C. intermedia* es considerada un problema potencial en los jugos de naranja concentrados, jugos refrigerados y productos lácteos, y bebidas fermentadas debido a su habilidad para sobrevivir y crecer bajo condiciones ambientales adversas (Hutzler et al., 2012; Kurtzman et al., 2011; Medina de Salcedo et al., 2001). Además, se ha demostrado que *Candida intermedia* es una levadura capaz de resistir los procesos normales de pasteurización, ocasionando frecuentemente el deterioro de jugos y de productos lácteos pasteurizados (Medina de Salcedo et al., 2001). Con respecto a su patogenicidad, no se han encontrado referencias que describan a esta levadura como patógena y Kurtzman et al. (2011) en su descripción de la especie se refiere a esta levadura como “patogenicidad desconocida.”

El resto de las levaduras no sacaromícéticas identificadas, estuvieron representadas por un solo aislamiento y se trata de levaduras que no son frecuentes en eventos de contaminación cervecera, excepto por la levadura *Torulaspota delbrueckii*. Esta levadura es frecuente en los incidentes de contaminación de cerveza y otras bebidas (Deák, 2008; Hutzler et al., 2012; Matouliková et al., 2013), aunque actualmente es una de las levaduras no convencionales más popular por su capacidad de impartir características interesantes a las bebidas fermentadas. *T. delbrueckii* fue la primera levadura no sacaromícética en ser comercializada para la producción de vinos (en 2003), ésta es conocida en la industria vitivinícola por incrementar el *flavor* frutado (Albertin et al., 2014; Azzolini et al., 2012). King y Dickinson fueron los primeros en observar el potencial de esta especie en la producción de cerveza, al detectar su capacidad para modificar el aroma del producto final a partir de la biotransformación de monoterpenos del lúpulo, lo que genera mayores cantidades de linalol (King & Richard Dickinson, 2000).

Capítulo IV

Levaduras contaminantes del género *Saccharomyces*



Introducción

En la elaboración de cerveza, la cepa de levadura utilizada para la fermentación es uno de los factores claves que influyen en el perfil de aromas y sabores. Se han identificado que las levaduras cerveceras pueden producir más de 500 compuestos de aroma y sabor (White & Zainasheff, 2010) que impactan directamente en el *flavor* de la cerveza y pueden ser aprovechados para el diseño de las recetas. Dado el rol fundamental que tienen las levaduras en el perfil sensorial de la cerveza, es importante asegurar que la fermentación sea conducida sólo por la levadura cervecera elegida. Las levaduras contaminantes del género *Saccharomyces*, son las más peligrosas para el producto por su capacidad de crecer anaeróbicamente y de competir con la levadura cervecera en la fermentación del mosto, que luego puede acompañarse por la producción de compuestos aromáticos indeseables (Matoulková et al., 2013). En particular, las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* conocidas como *S. cerevisiae* var. *diastaticus* han sido reportadas en muchas publicaciones para describir levaduras super-atenuantes / altamente fermentativas (Jespersen et al., 2000; Marín-Navarro et al., 2011). Las levaduras *S. cerevisiae* con poder diastático son capaces de metabolizar los carbohidratos residuales de la cerveza terminada, como dextrinas complejas y almidones, debido a la presencia de genes *Sta* involucrados en la síntesis de enzimas glucoamilasas extracelulares (Adam et al., 2004). Según estudios recientes, los genes *Sta* se originaron a partir de la fusión entre los genes *Flo11* y *Sga1* de *S. cerevisiae* (Krogerus et al., 2019a). El gen *Sga1* codifica para la glucoamilasa intracelular específica que interviene en el proceso de esporulación y está típicamente inactivo en las cepas cerveceras (Abbet, 2019; Burns et al., 2021; Krogerus et al., 2019a) mientras que el gen *Flo11* produce una glicoproteína de superficie que es inducida en las últimas etapas de la fermentación y juega un papel importante rol en la floculación. La familia de genes *Sta* comprende tres genes, *Sta1*, *Sta2* y *Sta3* (Hostinová & Gašperík, 2010). Las secuencias de ADN de estos genes son casi idénticas, pero recibieron diferentes nombres ya que estaban ubicados en diferentes cromosomas y grupos de enlace (Tamaki, 1978). Sin embargo, el gen *Sta1* es el mejor caracterizado de los tres, y al estar

típicamente inactivo en cepas cerveceras industriales, su presencia en las cepas de *S. cerevisiae* se ha convertido en el criterio para diagnosticar *S. cerevisiae* “var. *diastaticus*” (Balogh & Maráz, 1996; Burns et al., 2021). Aunque *S. cerevisiae* var. *diastaticus* no es una variedad aceptada taxonómicamente (las diferencias genéticas no aclaran tal diferenciación), a menudo se utiliza como sinónimo para describir a cepas de *S. cerevisiae* que contienen el gen *Sta1*. En este trabajo al igual que en el de Abbet (2019) y Meier-Dörnberg et al. (2018), se utiliza el término “var. *diastaticus*” como sinónimo de *Sta1* +, mientras que cuando se refiere a *S. cerevisiae* “diastáticas” se hace referencia a la capacidad de degradar el almidón y/o las dextrinas (Abbet, 2019). Esta diferencia radica en que la presencia del gen *Sta1* no siempre es indicativo de su poder diastático, ya que se ha observado que una mutación en el sitio promotor del gen, puede causar variabilidad en el metabolismo de estos azúcares e incluso incapacidad de consumir las dextrinas (Krogerus et al., 2019a).

A diferencia de la mayoría de las cepas de elaboración de cerveza, las levaduras contaminantes de *S. cerevisiae* son capaces de producir compuestos fenólicos a partir de la descarboxilación de ácidos precursores como ácido ferúlico, cinámico y cumárico presentes en la malta (Meier-Dörnberg et al., 2018; Štulíková et al., 2021). La descarboxilación, mediada por las enzimas Pad1p y Fdc1p, ocurre durante la fermentación temprana y los genes involucrados en la producción de estas enzimas son los genes *Pad1* y *Fdc1* (Mukai et al., 2014). La presencia de estos genes activos en las cepas de *S. cerevisiae* determinan el fenotipo conocido como POF + (“*phenolic off-flavors*”). Estudios a nivel genómico mostraron que la mayoría de las cepas domesticadas para la producción de cervezas de tipo *Ale* (con la excepción de las levaduras usadas para la producción de cervezas belgas y de trigo) perdieron la habilidad de producir estos fenoles volátiles, no así cepas salvajes o las relacionadas a otras industrias como pan, sake, vino y bioetanol (Gallone et al., 2016; Gonçalves et al., 2016). Esta pérdida, que se la considera un producto del proceso de domesticación, se debe a mutaciones en general puntuales de los genes antes mencionados que generan codones *stops* prematuros o marcos de lectura corridos (Gonçalves et al., 2016).

Otra diferencia respecto a las levaduras cerveceras, es que las levaduras contaminantes de *S. cerevisiae* esporulan con frecuencia (Meier-Dörnberg et al., 2018; Rachon et al., 2021; Suiker et al., 2021) lo que brinda facilidades para que se propaguen

eficientemente dentro y entre las cervecerías así como la posibilidad de sobrevivir a tratamientos térmicos (Rachon et al., 2021).

El género *Saccharomyces* comprende especies muy estrechamente relacionadas con características morfológicas y fisiológicas similares. Este alto grado de relación dificulta la identificación a nivel de especies y la diferenciación de cepas utilizando los marcadores frecuentes de ADN ribosómico rara vez se pueden aplicar con éxito. Actualmente existen sistemas especializados para PCR en tiempo real que pueden ser utilizados para identificar diferentes especies de levaduras del género *Saccharomyces* de manera rápida y precisa. Hutzler et al. (2015) resume los principales sistemas de PCR en tiempo real junto con los cebadores y la especificidad de cada sistema para el complejo *Saccharomyces sensu stricto*. Dicho complejo abarca las siguientes especies: *S. cerevisiae* y *S. pastorianus* (levaduras domesticadas involucradas en la producción de cerveza, vino, bioetanol, sake y muchas otras bebidas alcohólicas y alimentos), *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus*, *S. arboricolus*, *S. uvarum* y *S. eubayanus* (levaduras encontradas en ambientes naturales). Por su parte, para la tipificación a nivel de cepa, la región del espacio intergénico (IGS) ofrece la mayor resolución para identificar levaduras estrechamente relacionadas y linajes subespecíficos (Fell & Blatt, 1999). La región IGS incluye una serie de múltiples unidades repetidas con numerosas deleciones e inserciones (*indels*). Estas unidades e *indeles* repetidos proporcionan características que podrían usarse para denotar cepas que difieren en capacidades bioquímicas y fisiológicas (Fell & Blatt, 1999; Libkind et al., 2007).

Las levaduras contaminantes de *S. cerevisiae* pueden ingresar a la cerveza como contaminantes primarios en el inóculo de levaduras cerveceras o en la fermentación y como contaminantes secundarios en el proceso de envasado. Una contaminación primaria puede conducir a una competencia con la levadura cervecera durante la fermentación y aumentar la concentración celular de la primera en el fermentador. Si la crema de levaduras es reutilizada, la contaminación puede ser dispersada a otros lotes. Sin embargo, estas levaduras, actúan habitualmente como contaminantes secundarios por malas prácticas de limpieza en el sector de envasado, o como consecuencia de residuos en botellas y barriles (Štulíková et al., 2021). Las cepas contaminantes de *S. cerevisiae* pueden ingresar al producto directamente por contacto a través de líneas de

cerveza o por circulación de aire en el área de la máquina envasadora. (Meier-Dörnberg et al., 2018).

La presencia de cepas con poder diastático de *S. cerevisiae* en cervezas envasadas, puede generar pérdidas millonarias a los productores de cerveza. Por ejemplo, en 2014, *10 Barrel Brewing Co.* retiró botellas de su cerveza ácida llamada "Swill". El retiro del mercado fue motivado por informes de cerveza saliendo a borbotones de las botellas y un informe de una botella de vidrio rota como resultado de la contaminación con *S. cerevisiae* var. *diastaticus* (Rees, 2014). En 2016, *Left Hand Brewing Company* de Longmont, Colorado, cervecería que la Asociación de Cerveceros de EE. UU. ubicada en el puesto 44 en la lista de las cervecerías artesanales más grandes de los Estados Unidos, retiró al menos 20.000 cajas de su cerveza artesanal llamada "Nitro Milk Stout". La cerveza brotaba a borbotones como resultado de la fermentación secundaria y el aumento de CO₂. Al parecer, la cepa house *Ale* estaba contaminada con la fuente de contaminación que supuestamente provenía del cultivo de stock de la empresa productora de levaduras White Labs (Begrow, 2017). Después del incidente, la empresa presentó una demanda contra el proveedor de levadura White Labs, acusado de suministrar levadura contaminada con *S. cerevisiae* var. *diastaticus*. Todos estos ejemplos demuestran la necesidad de controlar la incidencia de estas levaduras en las cervezas envasadas y de fomentar el correcto pasteurizado de la cerveza. Por esto, resulta imprescindible conocer primero la incidencia de levaduras contaminantes del género *Saccharomyces* para comprender con mayor claridad el impacto que pueden causar estas levaduras sobre la cerveza y las cervecerías.

El objetivo de este capítulo fue caracterizar fenotípicamente y genéticamente a nivel de cepa, a levaduras del género *Saccharomyces* presuntamente contaminantes, aisladas de cervezas artesanales de la Patagonia Andina, con especial énfasis en estudiar la diversidad y distribución de *S. cerevisiae* var. *diastaticus*.

Materiales y métodos

Aislamientos

Treinta y dos levaduras provenientes de cervezas contaminadas preidentificadas por MALDI- TOF como *Saccharomyces* sp. en el capítulo 3 (Tabla 4.1), fueron caracterizadas a nivel de especie y tipificadas a nivel de cepa. Las cervezas de origen fueron todas de tipo *Ale* elaboradas por 17 microcervecerías artesanales de diferentes localidades de la Patagonia Andina con excepción de un aislamiento proveniente de la provincia de Córdoba. La caracterización a nivel de cepa se realizó en el centro de investigación para la elaboración de cerveza y la calidad de los alimentos Weihenstephan, instituto de investigación perteneciente a la Universidad Técnica de Múnich en Fraising, Alemania. El análisis se realizó en el marco de una pasantía de investigación financiada por la empresa de levaduras secas *Lallemand* en el año 2019.

Tabla 4.1. Levaduras del género *Saccharomyces* aisladas de cervezas artesanales contaminadas de la Patagonia andina (y una cepa proveniente de Córdoba) durante los años 2016-2019.

Aislamiento	Formato	Cervecería	Localidad	Año
PAC LC012	Fermentador	BRY 1	Bariloche	2019
PAC LC013	Fermentador	BRY 1	Bariloche	2019
PAC LC014	Fermentador	BRY 1	Bariloche	2019
PAC LC015	Fermentador	BRY 1	Bariloche	2019
PAC LC023	Fermentador	BRY 2	Bariloche	2019
PAC LC021	Fermentador	BRY 3	Bariloche	2019
LC16	Botella	BRY 15	Epuyen	2016
LC21	Botella	BRY 12	El Bolsón	2016
LC23	Botella	BRY 14	El Bolsón	2016
PAC LC022	Fermentador	BRY 6	Bariloche	2019
LC24	Botella	BRY 14	El Bolsón	2016
LC25 A	Botella	BRY 14	El Bolsón	2016
LC25 B	Botella	BRY 14	El Bolsón	2016
PAC LC002	Fermentador	BRY 8	Bariloche	2019
PAC LC007	Fermentador	BRY 8	Bariloche	2019
PAC LC010	Fermentador	BRY 8	Bariloche	2019
PAC LC016	Fermentador	BRY 9	Bariloche	2019
PAC LC017	Fermentador	BRY 9	Bariloche	2019
LC339	Fermentador	BRY 9	Bariloche	2018
LC26	Botella	BRY 5	Bariloche	2016

LC109	Fermentador	BRY 11	Bariloche	2017
LC110	Fermentador	BRY 11	Bariloche	2017
LC34	Botella	BRY 3	Bariloche	2016
LC35	Botella	BRY 13	El Bolsón	2016
LC38	Botella	BRY 10	Bariloche	2016
LC42	Botella	BRY 6	Bariloche	2016
LC43	Botella	BRY 6	Bariloche	2016
LC45	Botella	BRY 16	Epuypén	2016
LC47	Botella	BRY 4	Bariloche	2016
LC50	Botella	BRY 15	Epuypén	2016
LC54	Botella	BRY 7	Bariloche	2016
LC105	Botella	BRY 17	Córdoba	2017

Caracterización genética de aislamientos de Saccharomyces

La identidad genética de cada aislamiento se estudió utilizando PCR en tiempo real según Hutzler et al. (2010). Para la tipificación a nivel de cepa se realizó un método basado en electroforesis capilar PCR-amplicon del fragmento del espaciador intergénico parcial 2 (IGS2).

Extracción de ADN

Para extraer el ADN de cada aislamiento, las levaduras fueron cultivadas en YM agar (Anexo I) durante 48 horas. Se tomó una ansada de biomasa a partir de una única colonia y se transfirió a un tubo de 1,5 ml. Se mezcló con una alícuota de 200 µL de solución de matriz InstaGene™ (Biorad, Munich, Alemania). Cada tubo se agitó en vórtex durante 10 segundos y se incubó a 56 °C durante 30 minutos, seguido de otros 10 segundos de agitación e incubación a 96 °C durante 8 minutos. Los pasos de incubación ocurrieron en una Thermomix 5436 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Después de la incubación, los tubos se centrifugaron a 13.000 g durante 2 minutos y luego una alícuota de 100 µL del sobrenadante con el ADN se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 mL.

PCR en tiempo real

Para clasificar taxonómicamente los aislamientos se utilizó PCR en tiempo real (Light Cycler® 480 II. Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) empleando una sonda TaqMan®. Las secuencias de *primers* utilizadas se encuentran en la Tabla 4.2. junto con los resultados esperados para cada prueba. El procedimiento empleado para la RT-PCR fue realizado según Hutzler et al. (2010). Todos los sistemas de RT-PCR enumerados en

la Tabla 4.2 son compatibles y se realizaron con 10 µL 2x Mastermix (Light Cycler® 480 Probe Master, Roche, Alemania), 1,4 µL de agua para PCR con ddH₂O, 0,8 µL (400 nM) de cada cebador (Biomers, MLm, Alemania), 0,4 µL (200 nM) sonda (Biomers, MLm, Alemania; sonda MGB de Thermo Fisher Cientific, Applied Biosystems®, EE. UU.), 0,5 µL IAC135-f (250 nM), 0,5 µL de IAC135-r (250 nM), 0,4 µL de IAC135-S (HEX) (200 nM), 0,1 µL IAC135 (dilución 1:10 - 13), 0.1 µL IAC135 rev (dilución 1:10 - 13) y 5 µL de ADN molde con un volumen de reacción total de 20 µL, utilizando el mismo protocolo de temperatura: 95 °C / 10 min; 40 ciclos de 95 °C / 10 s, 60 °C / 55 s; 20 °C. IAC135 fue desarrollado por el Centro de investigación Weihenstephan para la elaboración de cerveza y la calidad alimentaria de la Universidad Técnica de Munich. El IAC es un control de amplificación interno para confirmar que la reacción de PCR en sí tuvo lugar. Las cepas de levadura tipo *Ale S. cerevisiae* (LeoBavaricus - TUM 68®) y tipo lager *S. pastorianus* (Frisinga - TUM 34 / 70®) se utilizaron control como un positivo y negativo según el sistema de RT-PCR utilizado. La señal se consideró positiva cuando el valor Ct (Ciclo umbral) definido como el número de ciclos necesarios para la señal de fluorescencia para cruzar el umbral, fue menor a 30.

Tabla 4.2. Sistemas de PCR en tiempo real para la diferenciación de levaduras de *S. cerevisiae* (S. c.), *S. pastorianus* (S. p.) y *S. cerevisiae var diastaticus* (S.c.d.).(Brandl, 2006; Hutzler et al., 2010, 2015; Josepa et al., 2000; Sampaio et al., 2017).

Sistema	Sistemas de PCR en tiempo real y secuencia de <i>primers</i> (5'-->3')	S. c.	S. c. d.	S. p.	Referencia
Sce	Sc-f CAAACGGTGAGAGATTTCTGTGC Sc-r ATAAAATTGTTTGTGTTTGTACCTCTG ScFAM- ACACTGTGGAATTTTCATATCTTTGCAAC TT-BHQ1	+	+	+	(Brandl, 2006; Josepa et al., 2000)
SC*	SCF1-GGACTCTGGACATGCAAGAT SCR1-ATACCCTTCTTAACACCTGGC SCFAM- CCCTTCAGAGCGTTTTCTCTAAATTGATA C- BHQ1	+	+	-	(Salinas et al., 2009)
TF-COXII	TF-f TTCGTTGTAACAGCTGCTGATGT TF-r ACCAGGAGTAGCATCAACTTAAATACC TF-MGB FAM- ATGATTTTGCTATCCCAAGTT-BHQ1	+	+	-	(Hutzler et al., 2010)

BF-300	BF300E CTCCTTGGCTTGTGCGAA BF300M GGTTGTTGCTGAAGTTGAGA BF300-FAM- TGCTCCACATTTGATCAGCGCCA-BHQ1	-	-	+	(Brandl, 2006)
Sbp	Sbp-r1 TTGTTACCTCTGGGCGTCGA Sbp-r2 GTTTGTACCTCTGGGCTCG SbpFAM- ACTTTTGCAACTTTTTCTTTGGGTTTCGA GCA	-	-	+	(Brandl, 2006; Josepa et al., 2000)
Sdia	Sd-f TTCCAAGTGCCTAGTTCTAGAGG Sd-r GAGCTGAATGGAGTTGAAGATGG SdiaFAM- CCTCCTTAGCAACATCACTTCTCCG- BHQ1	-	+	-	(Brandl, 2006)

*El sistema SC se utilizó de manera complementaria para confirmar *S. cerevisiae* de tipo Ale (Top-fermenting) cuando el sistema Sce o TF-COXII mostraron resultados ambiguos.

Secuenciación de la región D1 / D2 e ITS de ADN ribosómico

La identidad de aislamientos con resultados ambiguos obtenidos por RT-PCR fueron confirmados por análisis de secuencia del D1 / D2 26S y ADN ribosómico ITS1-5.8S-ITS2 según (Hutzler, 2009). Para amplificar el dominio D1/D2 del gen 26S rRNA se utilizaron los cebadores NL1 (5' -GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG- 3') y NL4 (5' -GGTCCGTGTTCAAGACGG- 3') según Kurtzman (2011). La PCR se realizó con 25 µL RedTaq Mastermix 2x (Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, Alemania), 16 µL de agua PCR ddH₂O, 2 µL de cada cebador con una concentración de 400 nM (Biomers, Munich, Alemania) y 5 µL de ADN molde con un volumen de reacción total de 50 µL, utilizando el protocolo de temperatura según Hutzler (2009): 95 °C por 5 min; 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 52 °C por 60 s; 72 °C por 60 s y 72 °C durante 10 min.

Para amplificar el ITS1-5.8S-ITS2 se utilizaron los iniciadores ITS1 (5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG- 3') e ITS4 (5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3') según White et al. (1990). La PCR se realizó con 25 µL RedTaq Mastermix 2x (Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, Alemania), 15 µL de agua PCR ddH₂O, 2,5 µL de cada cebador con una concentración de 500 nM (Biomers, Munich, Alemania) y 5 µL de ADN molde con un volumen de reacción total de 50 µL, utilizando el protocolo de temperatura según Hutzler (2009): 95 °C por 5 min; 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 55,5 °C por 60 s; 72 °C por 60 s y 72 °C durante 10 min.

Los fragmentos amplificados se purificaron utilizando un kit de purificación QIAquick® (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La

concentración de ADN de los amplicones purificados se ajustó a 25 ng μL^{-1} después de medirlos con un espectrofotómetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, EE. UU.). La reacción de secuenciación se asignó a GATC Biotech AG (Konstanz, Alemania). Las secuencias obtenidas se editaron manualmente y se compararon contra las secuencias tipo equivalentes en bases de datos públicas accesibles (GenBank) usando la herramienta computacional BLAST disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>.

Análisis de huellas genéticas mediante PCR electroforesis capilar

Para la tipificación a nivel de cepas, se generaron huellas genéticas basadas en el estudio de la región espaciadora IGS2 dentro del ADN ribosómico, utilizando el método IGS2-314 (Hutzler et al., 2010). Para la amplificación del espaciador intergénico 2 (IGS2-314) los cebadores específicos IGS2-314f (5'-CGGGTAACCCAGTTCCTCACT-3') e IGS2-314r (5'-TAGCATATATTTCTTGTGTGAGAAAGGT-3') (Büchl et al., 2010) se utilizaron en una concentración de 600 nM según lo descrito por Hutzler et al. (2010). Se realizó una PCR con 22,5 μL de RedTaq Mastermix (2 x) (Genaxxon, MLm, Alemania) y 2,5 μL de ADN de plantilla con un volumen de reacción total de 25 μL . La Mastermix contenía 12,5 μL solución *buffer* (RedTaq Mastermix), 7,0 μL de agua para PCR sin ADN y 1,5 μL de cada cebador (Biomers, Munich, Alemania). Los parámetros de ciclado fueron: desnaturalización previa a 95 °C durante 300 s, luego 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, annealingy elongación a 54 °C durante 30 s y 72 °C durante 40 s y para el alargamiento final a 72 °C durante 300 s. La PCR se realizó utilizando un Senso Quest Lab Cyclyer 48s (SensoQuest GmbH, Gottingen, Alemania). Fragmentos amplificados se analizaron mediante un sistema de electroforesis capilar (Agilent Kit DNA 1000) siguiendo las recomendaciones del fabricante (Bioanalyzer Agilent 2100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

*Caracterización fenotípica de aislamientos de *Saccharomyces cerevisiae* contaminantes*

Producción de compuestos fenólicos

Los 32 aislamientos de *Saccharomyces* contaminantes fueron sembrados por duplicado en placas de YM que contenían cada uno de los precursores utilizados en la síntesis de

fenoles (ácido ferúlico, ácido cinámico y ácido cumárico). Para ello, después de esterilizar en autoclave, se añadieron 10 ml/L de ácido cumárico de una solución madre al 1 % p/v en etanol 96 % v/v y 2 mL/L de ácido ferúlico y cinámico a partir de una solución preparada al 5% p/v de cada ácido en etanol 96 %. Las placas se incubaron durante 3 días a 25 °C y luego se evaluaron olfativamente para detectar cualquiera de los siguientes aromas: aroma similar al clavo de olor (el ácido ferúlico se convierte en 4-vinilguaiacol (4-VG,)); similar a la espuma de poliestireno/ plástico/ ahumado (el ácido cinámico se convierte en 4-vinilestireno (4 -VS,)); y aroma medicinal/dentista (el ácido cumárico se convierte en 4-vinilfenol (4-VP)). Se utilizó la levadura cervecera *Ale* de trigo *S. cerevisiae* *LeoBavaricus* - TUM 68® y la levadura contaminante *S. cerevisiae* var. *diastatucus* TUM PI BA 109 como controles positivos (POF +) y *S. pastorianus* Frisinga - TUM 34 / 70® como control negativo (POF -) tal como propone Meier-Dörnberg et al. (2018). Los resultados se registraron como positivo/negativo según la presencia/ausencia de aromas fenólicos.

Capacidad de esporulación

La capacidad de esporulación de todos los aislamientos se evaluó utilizando un medio de cultivo con acetato de sodio que incentiva el proceso de esporulación (Agar Mc Clary, composición en Anexo). Para ello las levaduras fueron inicialmente cultivadas a 25 °C en caldo YM durante 48hs, se tomaron 2 alícuotas de 1 ml de cada cultivo y se colocaron en 2 tubos de tipo Eppendorf. Se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm cada tubo y la biomasa obtenida se lavó con solución fisiológica (NaCl 0,9 M) dos veces y luego se resuspendió en 1 ml de solución fisiológica. Una alícuota de cada tubo se sembró en una placa con agar Mc Clary. Las placas se incubaron durante 7-10 días a 25°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se utilizó la tinción de esporas Schaeffer – Fulton con verde de malaquita 5 % y safranina 0,5 % para visualizar la presencia de esporas al microscopio. Se realizaron recuentos de al menos 500 células y se determinaron aquellas que mostraron ascosporas de las que no (Fernández-González et al., 2015). Finalmente se calculó el porcentaje de esporulación según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ esporulación} = \text{células mostrando ascosporas} / \text{células totales}.$$

El comportamiento de esporulación según el porcentaje de células esporuladas totales se estableció como bajo (<20%) medio (20-30%) alto (> 30%) según Meier-Dörnberg et al. (2018).

Consumo de almidón

Se evaluó la capacidad de consumir almidón de las cepas identificadas previamente como *Sta1* + (Tabla 4.2). Para esto, las levaduras fueron inicialmente cultivadas a 25 °C en caldo YM durante 48hs, se tomó 1 ml de cultivo y centrifugó 5 minutos a 3000 rpm, el pellet obtenido se lavó y luego se resuspendió en 1 ml de solución fisiológica. Se midió su densidad óptica (DO) a 620 nm y el medio de cultivo de almidón (composición en ANEXO I) se inoculó con una concentración inicial de 0,1 DO. Los cultivos en el caldo de almidón se incubaron a 25 °C durante 30 días. Para medir el almidón remanente en los cultivos, se tomaron 300 µL de cultivo y se centrifugaron brevemente para precipitar las células. Se transfirió una alícuota de 4 µL de sobrenadante y se colocó por duplicado en una microplaca en la que cada pocillo contenía 200 µL una solución de Lugol al 0,04 % (solución stock: Yoduro de potasio al 10 % p/v, yodo al 5 % p/v). La absorbancia se midió a 680 nm utilizando un lector de placas (Synergy, BioTek) según Burns (2021). El blanco consistió en la 200 µL de la solución de lugol y 4 µL de agua. Se utilizó la cepa *S. pastorianus* Frisinga - TUM 34 / 70® (*Sta1* -) como control negativo para normalizar las mediciones de absorbancia de las cepas y calcular el porcentaje de almidón consumido por las cepas estudiadas (% almidón consumido = 100 - % de almidón remanente). La cepa TUM PI BA 109 se utilizó como control positivo ya que está descrita como altamente superatenuativa (Meier-Dörnberg et al., 2018) además se incluyó la levadura *Tausonia pullulans* como control positivo que también está descrita como una especie altamente amilolítica (Trochine et al., 2022).

Resultados

Caracterización genética de los aislamientos de Saccharomyces

La identidad de 32 aislamientos, que preliminarmente habían sido identificados como parte del género *Saccharomyces* por MALDI- TOF en el capítulo 3, se corroboró genéticamente ya que los resultados de PCR en tiempo real mostraron que todos fueron positivos para el locus *Sce* que detecta levaduras del género *Saccharomyces* (Tabla 4.3). Además, se constató que ninguno de los aislamientos fue positivo para el sistema utilizado para identificar levaduras cerveceras de tipo lager *Saccharomyces pastorianus* (sistema BF 300). Veintiocho aislamientos fueron positivos para el sistema de PCR TF-COXII basado en el marcador genético mitocondrial COXII. Este sistema de cebadores se utiliza para diferenciar *Saccharomyces cerevisiae* de *S. pastorianus*, *S. uvarum* y *S. bayanus*, por lo que estos 28 aislamientos pertenecerían entonces a la especie *S. cerevisiae*. El aislamiento PAC LC023 fue la única levadura positiva para el sistema *Sbp* (ubicado en el ITS1-5.8S-ITS2) que detecta especies pertenecientes a *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. uvarum* o *S. eubayanus*. Veintiún aislamientos fueron positivos para el marcador del gen *Sta1* (*Sdia*) responsable de la síntesis de la enzima glucoamilasa que fue diseñado para detectar específicamente *S. cerevisiae* var *diastaticus*. Los 11 aislamientos restantes que fueron negativos para *Sdia* fueron positivos para el sistema TF-COXII, sugiriendo que podrían pertenecer a una cepa cervecera o cepas contaminantes de *Saccharomyces cerevisiae* pero con ausencia del gen *Sta1*.

Los aislamientos PAC LC007, PAC LC015, PAC LC022, PAC LC023, LC50, LC339 mostraron resultados ambiguos de PCR en tiempo real (resaltados en gris en la Tabla 4.3). Por esta razón, se utilizó el sistema adicional SC de acuerdo con Salinas et al. (2009) para detectar levaduras *Ale S. cerevisiae*. Todos los aislamientos mostraron señales positivas confirmando su identidad con *S. cerevisiae* (PAC LC015 Ct= 27,01; PAC LC022 Ct = 25,26, PAC LC007 Ct = 23,26; LC339 Ct = 27,99; LC50 Ct = 27,14). Considerando que estos aislamientos también fueron positivos para el sistema *Sdia*, se consideraron *S. cerevisiae* var. *diastaticus* observándose en total, una ocurrencia de levaduras *Sta1* + en el 66 % de los aislamientos. Esto representa el 17,5% de las muestras de cerveza analizadas (N = 120) y 47 % de las cervecerías estudiadas (N = 45). El aislamiento PAC LC 023

representa un caso excepcional, dado que fue positivo para el sistema SC (valor Ct = 26,74) y el sistema S_{dia}, pero también fue positivo para S_{bp}. En consecuencia, se secuenciaron las regiones ITS y D1/D2. Los resultados mostraron una identidad del 100% con *Saccharomyces uvarum* CBS 395 (número de acceso NR153310.1).

El análisis de huellas genéticas mediante PCR electroforesis capilar del locus IGS2-314 se utilizó para tipificar los aislamientos a nivel de cepa junto con dos de las principales levaduras utilizadas por las microcervecías artesanales en la elaboración de cerveza tipo *A/e*. Los resultados muestran una gran diversidad genética entre los aislamientos para el locus IGS2-314 (Figura 4.1) y todas las cepas mostraron diferentes patrones de bandas en comparación con las cepas de referencia, siendo la cepa LC25 A la más similar a la cepa S-04 (81,8 % de similitud). La cepa de referencia US-05 tuvo una similitud muy baja (<21 %) con el resto de aislamientos estudiados. Ocho de las 17 cervecías incluidas en esta sección tenían múltiples aislamientos y para el 75 % de estos casos los aislamientos de la misma cervecía no comparten patrones de bandas (BRY 1, BRY 3, BRY 6, BRY 11, BRY 14 y BRY 15). Por ejemplo, las cervecías BRY 6 y BRY 14 tenían tres aislamientos cada una y según la tipificación realizada, todos pertenecen a cepas distintas. El caso contrario a esta situación también pudo observarse, ya que se detectaron patrones de bandas similares para aislamientos de la misma cervecía (BRY 8 y BRY 9). Un caso interesante es el de la cervecía BRY 9 donde se encontró el aislamiento LC339 (*Sta1+*) casi un año antes que los aislamientos PAC LC016 y PAC LC017, y una vez analizados molecularmente se observó que poseen el mismo patrón genético para la región IGS2-314.

Tabla 4.3. Resultados de PCR en tiempo real para diferenciación de *Saccharomyces* sp. Sce: identifica cepas de la especie *S. cerevisiae*; BF300: identifica levaduras *Lager*; TF: identifica levaduras tipo *Ale* (*Top Fermenting*); Sbp: para distinguir *S. bayanus/pastorianus*; Sdia: diferencia las levaduras *Sta1* + para identificar *S. cerevisiae* var. *diastatucus*. Las filas marcadas en gris, resaltan los aislamientos que presentaron resultados ambiguos y fueron evaluados posteriormente mediante el sistema SC. (*) Resultados promedio de dos réplicas.

Cepa #	Sce (valor C _t)	BF300 (valor C _t)	TF (valor C _t)	Sbp (valor C _t)	Sdia (valor C _t)
PAC LC 012	+ (20.82)	-	+ (24.16)	-	-
PAC LC013	+ (18.50)	-	+ (21.95)	-	-
PAC LC014	+ (20.49)	-	+ (22.18)	-	-
PAC LC015	+ (20.59)	-	-	-	-
PAC LC023	+ (26.41) *	- *	- *	+ (22.22) *	+ (27.04) *
PAC LC021	+ (20.38)	-	+ (23.62)	-	+ (25.30)
LC16	+ (18.98)	-	+ (21.11)	-	-
LC21	+ (19.84)	-	+ (21.59)	-	+ (26.44)
LC23	+ (18.55)	-	+ (18.85)	-	+ (23.35)
PAC LC022	+ (19.07)	-	-	-	+ (26.06)
LC24	+ (18.98)	-	+ (21.89)	-	+ (26.54)
LC25A	+ (21.31)	-	+ (24.98)	-	+ (26.84)
LC25 B	+ (19.58)	-	+ (22.44)	-	+ (26.23)
PAC LC002	+ (19.43)	-	+ (23.88)	-	+ (24.92)
PAC LC007	+ (17.62)	-	-	-	+ (22.16)
PAC LC010	+ (18.76)	-	+ (23.22)	-	+ (23.69)
PAC LC016	+ (18.11)	-	+ (23.02)	-	+ (27.88)
PAC LC017	+ (19.07)	-	+ (22.24)	-	+ (25.57)
LC339	+ (22.09)	-	-	-	+ (27.97)
LC26	+ (20.07)	-	+ (23.26)	-	+ (25.57)
LC109	+ (20.94)	-	+ (22.04)	-	+ (25.70)
LC110	+ (18.78)	-	+ (20.09)	-	-
LC34	+ (20.88)	-	+ (23.55)	-	-
LC35	+ (20.08)	-	+ (22.99)	-	+ (25.61)
LC38	+ (20.51)	-	+ (22.06)	-	+ (25.45)

LC42	+ (17.38)	-	+ (18.34)	-	-
LC43	+ (18.04)	-	+ (19.23)	-	-
LC45	+ (17.82)	-	+ (19.80)	-	-
LC47	+ (19.68)	-	+ (22.94)	-	+ (24.46)
LC50	+ (20.11)	-	-	-	+ (26.43)
LC54	+ (21.14)	-	+ (23.88)	-	+ (26.80)
LC105	+ (19.93)	-	+ (24.06)	-	-

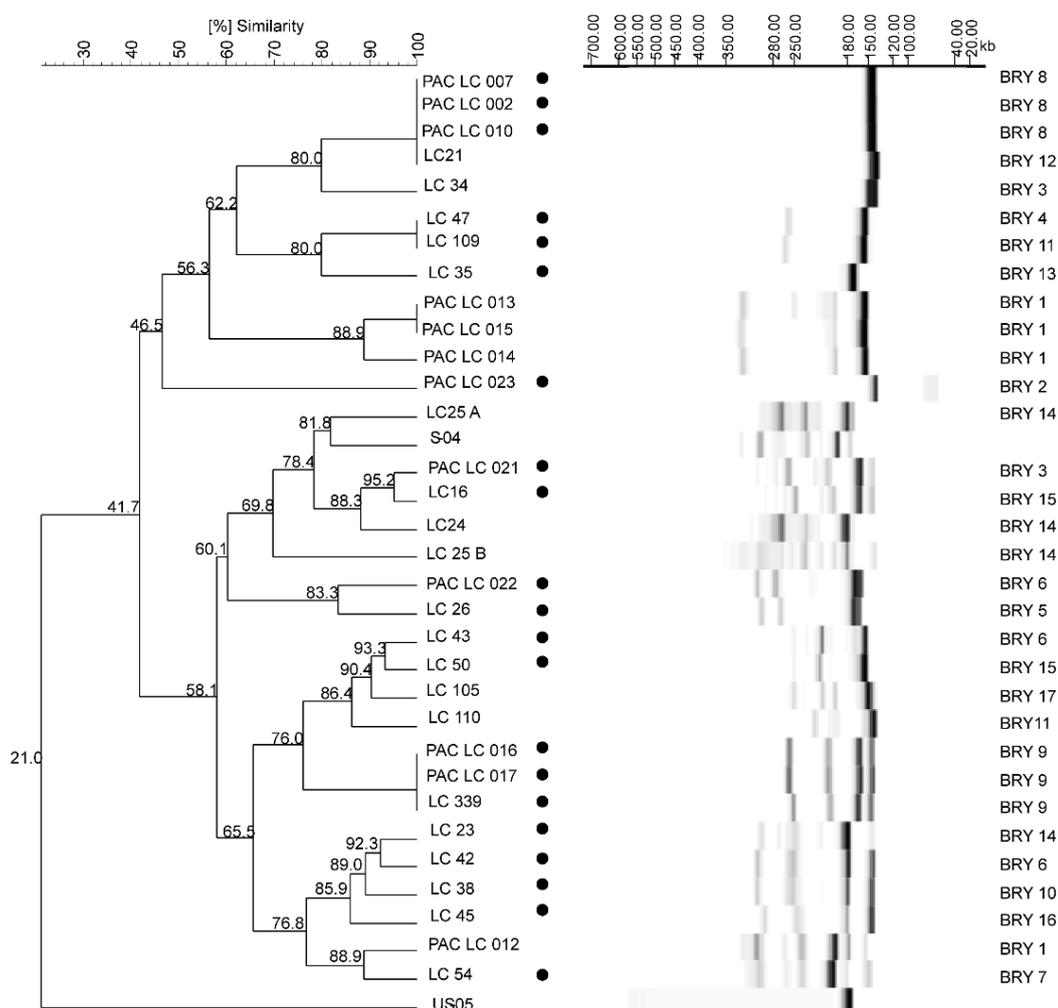


Figura 4.1. Relación genética basada en bandas de ADNr IGS2-314 de 32 *Saccharomyces* aislados de cervezas contaminadas y 2 cepas de levaduras cerveceras (S0-4 y US05) (dendrograma construido con Bionumerics 7.6). Los puntos indican las cepas que fueron positivas para el gen *Sta1* y por lo tanto identificadas como *S. cerevisiae* var. *diastáticus*. A la derecha de la figura se encuentra el código de la cervecería (BRY).

Otro hallazgo interesante es el elevado número de casos en los que se obtuvieron patrones genéticos similares (> 89,0 % de similitud) y condición *Sta1* para aislamientos de diferentes cervecías. Por ejemplo, los aislamientos PAC LC002, PAC LC007 y PAC LC010 (BRY 8) son idénticos a LC21 (BRY 12), también los aislamientos LC110 (BRY 4) y LC109 (BRY 11); PAC LC021 (BRY 3) y LC16 (BRY15); LC43 (BRY 6) y LC50 (BRY15); y aislamientos LC42 (BRY6), LC23 (BRY10) y LC38 (BRY14).

En términos de la distribución de la condición *Sta1* y por lo tanto identidad de *S. var. diastaticus* dentro del dendrograma, se observa que este rasgo está considerablemente extendido entre la mayoría de los grupos, con pocas excepciones de grupos de aislamientos que tienen tanto resultados positivos como casos *Sta1* negativos. Probablemente el caso más notable es el que conforma el grupo de aislamientos PAC LC002, PAC LC007, PAC LC010 y LC21 con 100 % de similitud entre sí, y sin embargo la LC21 es *Sta1* negativo mientras que el resto de las cepas es *Sta1* positivo. No obstante, se debe notar que la cepa LC21 proviene de una fábrica de cerveza diferente. Se observó que 4 de las 8 cervecías con más de 1 aislamiento analizado mostró tanto cepas positivas para *Sta1* como negativas para este gen.

Caracterización fenotípica de los aislamientos

Producción de compuestos fenólicos

Se evaluó sensorialmente la formación de compuestos fenólicos en placas de cultivo que contenían sus precursores (ácido ferúlico, cumárico y cinámico). Se consideraron POF + las cepas que evidenciaron cualquiera de los aromas a clavo, ahumado, goma, poliestireno y medicinal. En 27 de las 32 (84%) cepas estudiadas fue posible detectar alguno de los aromas mencionados (cepas POF +) mientras que en 5 de los aislamientos (LC23, LC24, LC25 A, LC25 B y LC110) no se detectó ningún compuesto fenólico. Cabe recordar que, para este análisis, las cepas en estudio se compararon con la cepa *S. cerevisiae* *LeoBavaricus* - TUM 68® (POF+) y *S. pastorianus* Frisinga- TUM 34 / 70® (POF-).

Capacidad de esporulación

Luego de incubar las 32 levaduras en medio de cultivo Mc. Clary durante 7-10 días, 26 cepas fueron capaces de producir esporas (81 % de las cepas). El porcentaje de

esporulación de las cepas con esta capacidad varió entre 1,9 y 46,5 % (en promedio 19,7 %). En la Figura 4.2 se pueden observar los porcentajes promedio de esporulación obtenidos para cada cepa. La mayoría de las levaduras estudiadas presentó bajo nivel de esporulación (entre 0 y 20 % coloreadas en verde) aunque también se observaron altos niveles de esporulación (mayores al 30 % coloreados en rojo.) La cantidad de ascosporas observada dentro de los ascos variaron entre 1 y 4 siendo predominante la formación de 2 y 3 esporas dentro de los ascos.

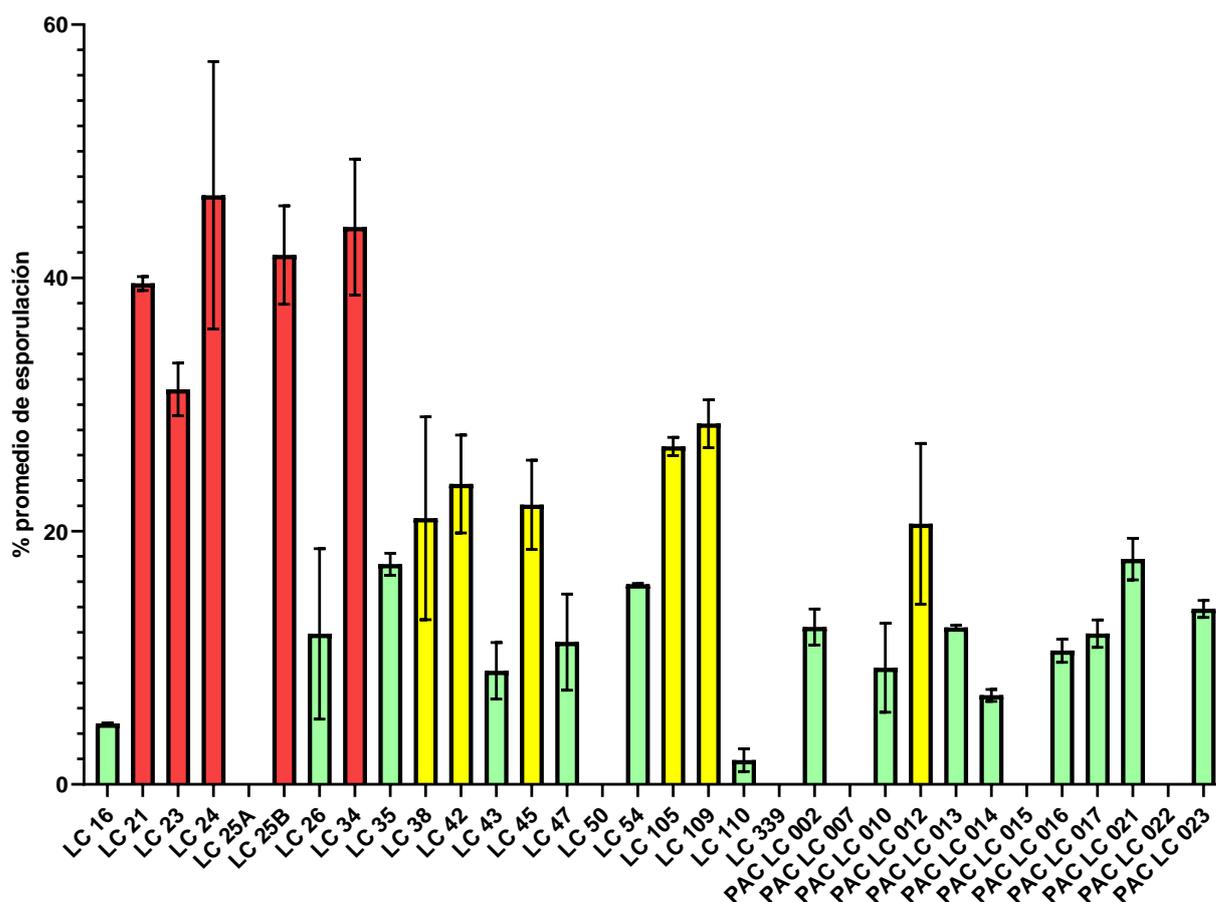


Figura 4.2. Porcentaje de esporulación de cepas contaminantes del género *Saccharomyces*. Las barras verdes indican niveles de esporulación bajos (1-20 %); las barras amarillas indican niveles de esporulación medio (entre 20 y 30 %); y las barras rojas hacen referencia a niveles de esporulación altos (> 30%).

Consumo de almidón

La capacidad de consumir el almidón de las 21 cepas *Sta1* + con respecto a la cepa control *Sta1* – (TUM 34/70) luego de 4 semanas de incubación fue variable. De las 21 cepas *Sta1* + estudiadas, la mayoría de las cepas (12) fueron capaces de consumir más del 50 % de del almidón en el medio (línea punteada, Figura 4.3), confirmando la

actividad del gen *Sta1*. Cinco cepas (LC23, LC43, LC45, LC47 y LC54) consumieron más almidón que la cepa control *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* TUM PI BA 109, descrita como altamente superatenuativa. Las cepas LC26, LC50 y LC339 no fueron capaces de consumir nada del almidón disponible.

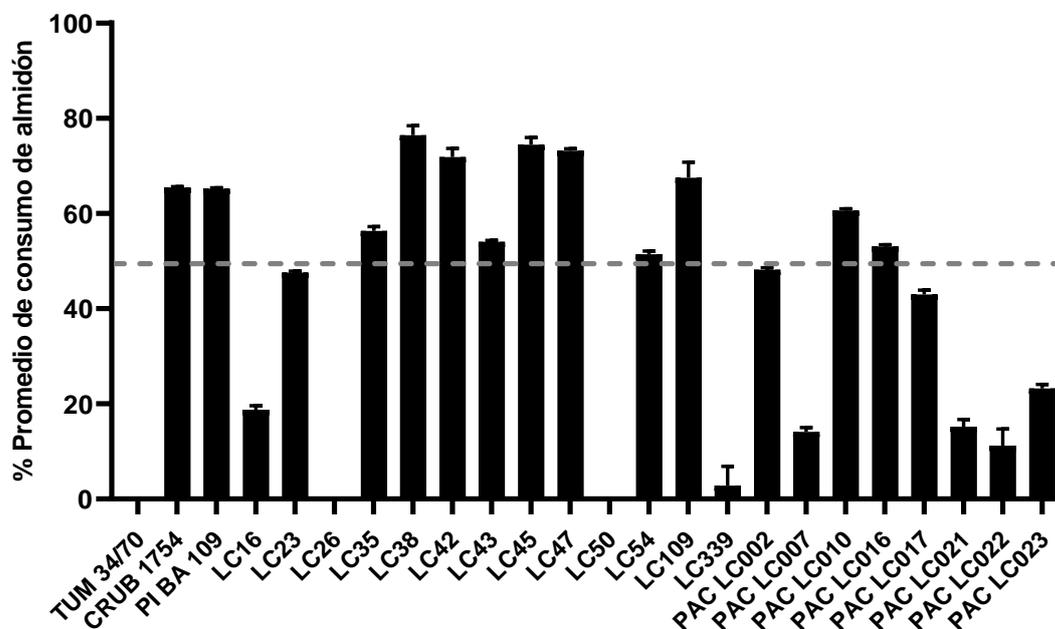


Figura 4.3. Porcentaje de consumo de almidón de cepas de *S. cerevisiae* var. *diastaticus* (*Sta1* +). La cepa *Sta1* - TUM 34/70 se incluyó como control negativo y la cepa *S. cerevisiae* var. *diastaticus* PI BA 109 como control positivo. La línea punteada marca el 50 % del almidón consumido.

La Tabla 4.4 sintetiza los resultados genéticos y fenotípicos de los aislamientos estudiados y en él pueden observarse las cepas que más impacto podría tener al contaminar una cerveza (remarcadas en gris). Por ejemplo, en el resumen se puede observar que las cepas más peligrosas para el producto son *Saccharomyces Sta1* positivas (+) que fueron capaces de consumir más del 50 % del almidón, producir fenoles y esporular al menos en un 20 %. Es interesante observar que, salvo una excepción (LC25 A), las cepas negativas para el gen *Sta1*, mostraron elevados valores de esporulación.

Tabla 4.4. Resumen de resultados de la caracterización genética y fenotípica de levaduras *Saccharomyces* contaminantes aisladas de la Patagonia Andina. Se muestra la condición *Sta1* positiva (+) y negativa (-), la producción de fenoles (POF) positiva (+) y negativa (-), el nivel de esporulación se expresó en rangos de 0 %, entre 1-20 % y mayor a 30 %. El nivel de consumo de almidón se expresó en rangos de consumo de 0 %, entre 1-20%, y consumo superior al 50 %. En gris se resaltan las cepas con condiciones que podrían tener mayor impacto en la contaminación de cervezas.

Cervecería	# Cepa	<i>Sta1</i>	POF	Esporulación	Actividad diastática
BRY 1	PAC LC012	(-)	(+)	20-30 %	n.d
BRY 1	PAC LC013	(-)	(+)	1-20 %	n.d
BRY 1	PAC LC014	(-)	(+)	1-20 %	n.d
BRY 1	PAC LC015	(-)	(+)	0 %	n.d
BRY 2	PAC LC023	(+)	(+)	1-20 %	20-50 %
BRY 3	PAC LC021	(+)	(+)	1-20 %	1-20 %
BRY 3	LC34	(-)	(+)	> 30 %	n.d
BRY 4	LC47	(+)	(+)	1-20%	> 50 %
BRY 5	LC26	(+)	(+)	1-20%	0 %
BRY 6	PAC LC022	(+)	(+)	0 %	1-20%
BRY 6	LC42	(+)	(+)	20-30%	> 50 %
BRY 6	LC43	(+)	(+)	1-20 %	> 50 %
BRY 7	LC54	(+)	(+)	1-20 %	> 50 %
BRY 8	PAC LC002	(+)	(+)	1-20 %	20-50 %
BRY 8	PAC LC007	(+)	(+)	0 %	n.d
BRY 8	PAC LC010	(+)	(+)	1-20 %	> 50 %
BRY 9	PAC LC016	(+)	(+)	1-20 %	> 50 %
BRY 9	PAC LC017	(+)	(+)	1-20 %	20-50 %
BRY 9	LC339	(+)	(+)	0 %	0 %
BRY 10	LC38	(+)	(+)	20-30 %	> 50 %
BRY 11	LC109	(+)	(+)	20-30 %	> 50 %
BRY 11	LC110	(-)	(-)	1-20 %	n.d
BRY 12	LC21	(-)	(+)	> 30 %	n.d
BRY 13	LC35	(+)	(+)	1-20 %	> 50 %
BRY 14	LC23	(+)	(-)	> 30 %	> 50 %

BRY 14	LC24	(-)	(-)	> 30 %	n.d
BRY 14	LC25 A	(-)	(-)	0 %	n.d
BRY 14	LC25 B	(-)	(-)	> 30 %	n.d
BRY 15	LC16	(+)	(+)	1-20 %	1-20%
BRY 15	LC50	(+)	(+)	0 %	0 %
BRY 16	LC45	(+)	(+)	1-20 %	> 50 %
BRY 17	LC105	(-)	(+)	1-20 %	n.d

Discusión

Se confirmó la pertenencia al género *Saccharomyces* de las 32 levaduras aisladas de cervezas contaminadas y se demostró mediante la utilización de diversos sistemas de PCR en tiempo real que, a excepción de un aislamiento, las cepas corresponden a la especie *S. cerevisiae*. Estudios genéticos a nivel de cepa, permitieron determinar que 31 de los aislamientos mostraron diferencias con respecto a las cepas cerveceras utilizadas como referencia, confirmando que se trata de levaduras contaminantes. Este hallazgo concuerda con los resultados obtenidos por otros autores que afirman que las principales levaduras contaminantes de cerveza corresponden a esa especie (Meier-Dörnberg et al., 2018; Suzuki, 2020; van der Aa Kühle, 1998).

También pudo confirmarse una alta incidencia *S. cerevisiae* var. *diastaticus* entre las levaduras *Saccharomyces* estudiadas (66 %). Dicho valor representa el 17,5 % de las muestras de cerveza analizadas en la Patagonia (N = 120) y 47 % de las cervecerías (N = 45). Nuestros resultados implican que la mayoría de las levaduras contaminantes del género *Saccharomyces* de este trabajo, son portadoras del gen *Sta1* responsable de la síntesis de glucoamilasas extracelulares involucradas en el metabolismo de dextrinas y almidones presentes en la cerveza terminada. Estos hallazgos confirman que *S. cerevisiae* var. *diastaticus* es la levadura contaminante más relevante de la industria cervecera artesanal del sur de Argentina, como lo es en Europa (Meier-Dörnberg et al., 2017) y probablemente, lo sea en otros polos productivos de nuestro país. En la Ciudad autónoma de Buenos Aires y Gran Buenos Aires, investigadores encontraron una

incidencia de *Saccharomyces* contaminantes en el 36,6 % de las cervezas analizadas provenientes de barril en GBA y CABA (Duhourq et al., 2021) y realizaron un *screening* preliminar para determinar la presencia de *S. cerevisiae* var. *diastaticus* en los aislamientos. Los resultados preliminares mostraron que los aislamientos de *Saccharomyces* contaminantes fueron capaces de consumir almidón como única fuente de carbono, sugiriendo que podrían contener el gen *Sta1* (Eizaguirre, 2022 - comunicación personal), aunque se necesitarán estudios genéticos para confirmar esta afirmación.

La prevalencia y distribución del gen *Sta1* entre cepas salvajes y domesticadas de *S. cerevisiae* fue analizada por Krogerus et al. (2019). Ellos realizaron una búsqueda BLAST utilizando los ensamblajes de genomas completos producidos en los últimos estudios de secuenciación. De los 1169 ensamblajes de genoma disponibles públicamente que fueron consultados, 54 contenían una coincidencia del 100 % con la secuencia completa del gen *Sta1* (4,6 %) y sólo diez de las 54 cepas *Sta1* secuenciadas parecían tener la delección de 1162 pb en el promotor que determina la expresión del gen. El mencionado trabajo también determinó que la mayoría de los genomas con el gen *Sta1* se encontró dentro del linaje “Beer 2” que incluye el 20,6 % de todas las cepas cerveceras (contiene levaduras procedentes de Bélgica, Reino Unido, Estados Unidos, Alemania, y Europa del Este) y el linaje “French Guiana human” (que incluye *S. cerevisiae* no relacionadas al ambiente cervecero y fueron aisladas de frutas, animales y humanos). Como no todas las cepas de estos linajes contienen *Sta1* a pesar de estar estrechamente relacionadas, se necesitarán estudios detallados para descubrir si el gen *Sta1* se adquirió de forma independiente en cepas de estos grupos, si fue adquirido por recombinación, o si *Sta1* fue adquirido por un antepasado común y luego perdido en algunas cepas. La teoría más aceptada sugiere que como los genes *Sta1* se encuentran ubicados en las regiones subteloméricas, y estas regiones son inestables y propensas a la recombinación (Brown et al., 2010), es posible que cepas de estos linajes que carecen de *Sta1* lo hayan perdido (Krogerus et al., 2019b). Al igual a lo que ocurre con el linaje “Beer 2” en nuestro trabajo, la distribución de las cepas en el dendrograma obtenido a partir de la amplificación por PCR del locus IGS2-314, reveló que el gen *Sta1* está considerablemente extendido entre la mayoría de los grupos y se observó que las cerveceras con más de un aislamiento analizado mostraron tanto cepas positivas para *Sta1* como negativas. Serán necesarios

análisis genéticos más profundos y estudios bioinformáticos para determinar y esclarecer cómo se distribuyen las levaduras portadoras del gen *Sta1* aisladas en este trabajo entre los linajes filogenéticos de *S. cerevisiae* a fin de reconstruir la historia evolutiva de *S. cerevisiae* var. *diastatucus*.

El estudio a nivel de cepa generado a partir de la amplificación por PCR del locus IGS2-314 estudiado en este trabajo, indicó que salvo una excepción (LC25 A que mostró alta similitud alta con la cepa S0-4), las cepas estudiadas mostraron perfiles genéticos diferentes a las cepas cerveceras utilizadas como control. Este hecho resalta el buen desempeño de los medios de cultivo con sulfato de cobre como agente selectivo para aislar levaduras contaminantes del género *Saccharomyces*. Además, la industria artesanal comúnmente no aplica técnicas de filtrado o centrifugado, por lo que las capacidades selectivas de los medios de cultivo se ponen a prueba frente a concentraciones elevadas de levadura cervecera. Sin embargo, para descartar con seguridad que ninguna cepa aislada como contaminante, sea en verdad una levadura cervecera, sería necesaria la comparación de la región del locus IGS2-314 con una mayor cantidad de cepas cerveceras comerciales o realizar estudios a nivel genómico.

La gran heterogeneidad genética encontrada entre las cepas de levaduras estudiadas, incluso entre cepas provenientes de la misma cervecería sugieren una alta diversidad de levaduras contaminantes asociado a diferentes eventos y fuentes de contaminación. Sin embargo, el caso contrario también fue observado, ya que fue posible detectar los mismos patrones genéticos en cepas aisladas de una misma cervecería (por ejemplo, la cervecería BRY 1, BRY 8 y BRY 9). Esta es una indicación de posibles contaminaciones cruzadas que se extendieron a los diferentes lotes probablemente a través de levadura reutilizada, equipos y/o superficies mal desinfectadas u otras vías relativas al proceso y de que las cepas están bien establecidas en las fábricas involucradas. La contaminación cruzada es muy probablemente la causa predominante de deterioro en cualquier fábrica de cerveza (Meier-Dörnberg et al., 2018), y este hecho subraya la necesidad de una vigilancia constante de la higiene en las fábricas de cerveza.

Un caso interesante es el de la cervecería BRY 9 donde el aislamiento *Sta1* positivo LC339 se obtuvo casi un año antes que PAC LC016 y PAC LC017, con los que es genéticamente idéntico para el locus estudiado. Gracias a la información que se pudo recabar de esta cervecería en particular, se conoció que la cervecería trasladó sus instalaciones a una

nueva ubicación entre la obtención del primero y el segundo de los aislamientos, lo que sugiere que esta cepa está fuertemente establecida en los equipos de la cervecería.

Otro hallazgo interesante es el elevado número de casos (5) en los que patrones genéticos similares y condición *Sta1* se obtuvieron para aislamientos de diferentes cervecerías. Estos resultados sugieren potenciales casos de contaminación cruzada entre establecimientos productivos debido a algún tipo de interacción como equipamiento compartido, el intercambio de materias primas como cremas de levadura de reutilización, o incluso proyectos colaborativos de cerveza. El hecho de que una misma cepa de *S. cerevisiae* contaminante se haya instalado en cervecerías que se encuentran en diferentes áreas geográficas sugiere que las fábricas comparten proveedores de materias primas, por ejemplo, levaduras secas, lúpulos y maltas (principalmente malta base) y que los respectivos entornos y prácticas cerveceras son muy similares. En cualquier caso, hay muchas posibilidades de que las levaduras contaminantes de la cerveza encuentren nichos para establecerse dentro de las fábricas considerando que las materias primas para la cerveza se almacenan y se procesan durante todo el año en un programa de producción continua, creando un ambiente estable en las superficies de los equipos que interactúan con estos mismos sustratos en bruto a diario (Bokulich et al., 2015).

Por último, la tipificación genética demostró que el aislamiento PAC LC023 representa un caso único, dado que muestra un patrón de bandas muy diferente a los demás (54,5 % diferente al grupo más cercano). Teniendo en cuenta que la secuenciación de la región ITS y D1/D2 confirmó que la identidad de la cepa corresponde a *S. uvarum* y que a su vez, mostró resultados positivos para la presencia del gen *Sta1* es evidente que se trata de una cepa muy interesante que requiere un análisis más profundo, dado que la ocurrencia de levaduras *Sta1* + aisladas en ambientes naturales es muy baja (Gonçalves et al., 2016; Krogerus et al., 2019b; Suiker et al., 2021) y tampoco se han podido encontrar referencias de cepas *Sta1* + en levaduras de *Saccharomyces* tipo lager. Esta combinación de características genotípicas sugiere la posibilidad de que se trate de un híbrido. Por esto, esta cepa PAC LC023 ha sido seleccionada para futuros estudios de su genoma completo a fin de poder dilucidar su composición genómica.

La caracterización a nivel fenotípico permitió determinar el grado de peligrosidad que cada cepa presentaba para una cerveza al analizar la capacidad de producir fenoles

(impacto organoléptico), capacidad de esporular (resistencia a tratamientos térmicos y químicos) y capacidad de consumo de almidón (superatenuación).

Respecto a la producción de fenoles, 27 de las 32 levaduras estudiadas fueron capaces de producir fenoles a partir de sus precursores (ácido ferúlico, cumárico y cinámico) razón por la cual fueron catalogadas como cepas POF+. Si bien en algunos estilos de cerveza como las weizen (trigo) y muchas cervezas belgas la presencia de estos compuestos son considerados un atributo positivo, cuando en cantidad excesiva o presentes en otros estilos, son considerados defectos e indicadores de contaminación. Los fenoles volátiles tienen umbrales sensoriales bajos y pueden, incluso a niveles traza, producir un impacto significativo en el sabor de la cerveza (Coghe et al., 2004). Se informa que el umbral de detección sensorial de 4-vinilguayacol (4-VG) es de 0,2–3,5 mg/L, y el de 4-vinilfenol (4-VF) ha sido reportado en un rango de 0,02–2,7 mg/L (Coghe et al., 2004; Cui et al., 2015). Meier-Dörnberg et al. (2018) encontró que las 23 levaduras *S. cerevisiae* var. *diastaticus* estudiadas en su trabajo fueron capaces de producir compuestos fenólicos por encima del umbral de detección y por encima del valor promedio para las cervezas comerciales de trigo alemanas. Por su parte, Štulíková et al. (2021), halló que todas las cervezas contaminadas experimentalmente con *S. cerevisiae* var. *diastaticus* mostraron valores de 4-VG que superaban el umbral establecido (0,3 mg/L). En línea con estos trabajos, todas las cepas *S. cerevisiae* con el gen *Sta1* aquí estudiadas fueron también POF+, sin embargo, no se ha podido correlacionar con la presencia de fenoles en las cervezas de origen de los aislamientos ya que nuestro abordaje fue cualitativo a nivel sensorial y muchas de las muestras presentaron otros defectos que pudieron enmascarar la percepción de estos compuestos. Por otro lado, las muestras de origen de los aislamientos con código PAC no fueron evaluados sensorialmente y la presencia de fenoles en esas cervezas no se pudo constatar.

Con respecto a la capacidad de esporulación en *S. cerevisiae*, se ha observado que es un proceso común en cepas naturales y que este fenómeno puede ser inducido bajo ciertas condiciones como cambios repentinos en las condiciones ambientales o deficiencia de nutrientes (Kurtzman et al., 2011). La forma del asco, así como el número de esporas, es muy variable y depende del género y la especie de levadura (Powell & Kerruish, 2017). Las levaduras *Saccharomyces* tienden a producir de una a cuatro esporas típicamente encerradas dentro de un asco de forma elipsoidal o tetraédrica. Como consecuencia de

la domesticación, la mayoría de las levaduras cerveceras, se reproducen asexualmente a través de mitosis, lo que da como resultado nuevas células y poblaciones de células teóricamente idénticas, salvo que se produzcan mutaciones aleatorias. En este trabajo, el porcentaje de esporulación de los 32 aislamientos de *S. cerevisiae* estudiados y la cantidad de ascosporas desarrolladas en cada uno de ellos fue variable. La mayoría de las cepas estudiadas (47 %) mostraron bajos niveles de esporulación (menor al 20 %) mientras que las cepas LC24, LC25B y LC34 presentaron la mayor capacidad de esporulación (superior al 40 %). Sin embargo, estas levaduras fueron *Sta1* negativas y solo LC34 fue capaz de producir fenoles, contrarrestando el efecto que podría causar la contaminación con esas levaduras. Milani et al. (2015) y Rachon et al. (2021) estudiaron que cepas esporuladoras de *S. cerevisiae* pueden resistir mejor a los procesos térmicos de pasteurización y sobrevivir en las superficies de las fábricas por largos períodos. Esta es una razón más para mantener bajo control la presencia de levaduras contaminantes del género *Saccharomyces* en las fábricas de cerveza.

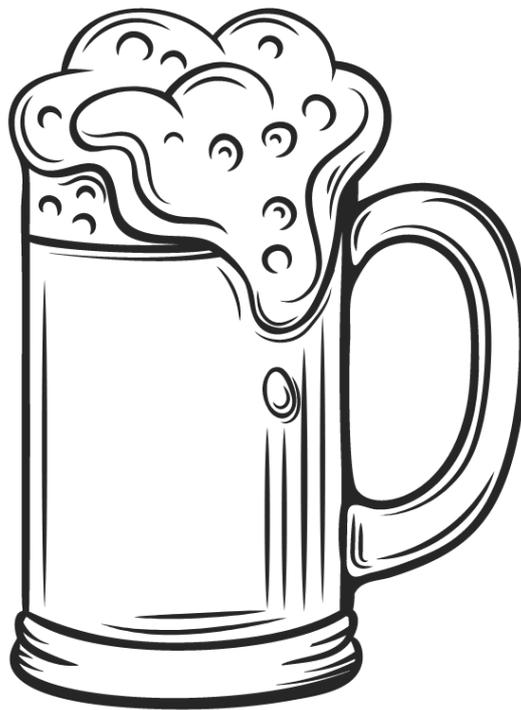
Otra situación a resaltar es que fue imposible inducir esporulación en la cepa LC339 en las condiciones ensayadas, mientras que si fue posible para las cepas PAC LC016 Y PAC LC017 que poseen patrones idénticos en la región ADNr IGS2-314. Esto sugiere que por lo menos en este aspecto no serían iguales y que se requiere de otros estudios genéticos para evaluar si son la misma cepa. Otras teorías pueden incluir haber permanecido en la fábrica todo ese tiempo por ejemplo conformando un biofilm o que la fuente que la introdujo en la fábrica a esa cepa en particular se haya repetido a lo largo del tiempo, por ejemplo, un lote de levadura comercial contaminada utilizada en la elaboración de varios lotes de cerveza, como ocurrió en la cervecería *Left Hand* citado anteriormente. La actividad diastática de las cepas con presencia del gen *Sta1* estudiadas en este trabajo pudo demostrarse a nivel fenotípico en la gran mayoría de los aislamientos (18 de 21) y la mitad de las cepas fue capaz de consumir al menos el 50 % del almidón disponible, en comparación con la cepa incapaz de consumir el almidón (control negativo). Estos resultados confirman que estas levaduras contaminantes representan un alto riesgo para el producto. Es importante que las cervecerías puedan evitar la presencia de levaduras con poder diastático, ya que la fermentación de dextrinas y almidones aumenta el contenido de etanol, y puede causar superatenuación acompañado de un exceso de carbonatación, lo que provoca un efecto *gushing*, y que ocasionalmente

provoca que las botellas y latas estallen causando daños al consumidor y grandes pérdidas económicas (Hutzler et al., 2012; Meier-Dörnberg et al., 2017). En este sentido, se estima que los costos asociados con las incidencias de deterioro debido a la contaminación por *S. cerevisiae* var. *diastaticus* oscilan entre millones y miles de millones de euros anuales solo en Europa (Hutzler et al., 2012; Meier-Dörnberg et al., 2017).

La información generada en este capítulo es sumamente novedosa, ya que representa la primera visión acerca de la diversidad genética y fenotípica de *S. cerevisiae* contaminantes de cerveza de nuestro país, así como la incidencia de cepas *S. cerevisiae* var. *diastaticus* en una región donde coexiste una gran comunidad de microcerveceras. Este estudio proporciona el punto de partida para comenzar a abordar el problema de las contaminaciones causadas por levaduras del género *Saccharomyces* de la manera más eficiente y así ayudar a mejorar la calidad de la cerveza artesanal. Los hallazgos de este capítulo también abren un abanico de posibilidades interesantes en cuanto al uso de las levaduras aisladas como contaminantes, para la innovación productiva de cervezas, así como su aplicación biotecnológica en otras áreas. Estas posibilidades se presentarán hacia el final de esta tesis, en la sección “Implicancias y Perspectivas” mientras que en el capítulo V, se realizaron ensayos de supervivencia y termorresistencia a fin de calcular los parámetros de muerte térmica y sentar las bases de procesos de pasteurización adecuados para eliminar este tipo de levaduras.

Capítulo V

Estrategias de prevención y control de contaminantes en fábrica



Introducción

El proceso de elaboración de la cerveza requiere una serie de pasos altamente específicos e interrelacionados (ver Figura 1.1) y cada etapa, tiene puntos de control que impactan sobre la calidad final del producto. Todas esas etapas de la elaboración de cerveza están atravesadas por un proceso fundamental: la limpieza y sanitización. La mayoría de los potenciales contaminantes de la cerveza se originan a partir de las materias primas y de fallas en la limpieza y sanitización de los equipos de elaboración de cerveza (Bamforth & Lentini, 2008). Por esta razón, la limpieza de los equipos de producción es vital para el desarrollo correcto de las operaciones y esencialmente importante en la calidad del producto final (Adams & Moss, 2016). Sin embargo, en muchas oportunidades, estas prácticas no son consideradas con la importancia debida, arriesgando la estabilidad microbiológica y la vida útil del producto. Para garantizar el buen funcionamiento de las instalaciones y equipos, y para minimizar al máximo el riesgo de contaminación de la cerveza, es necesario ajustar y controlar constantemente los protocolos de limpieza y sanitización.

La limpieza, puede definirse como la eliminación de tierra, residuos orgánicos, suciedad, grasa u otras materias objetables. La sanitización puede definirse como la reducción del número de los microorganismos presentes en el medio ambiente o superficies, por medio de agentes químicos y/o métodos físicos, a un nivel que no comprometa la inocuidad o aptitud del alimento (CAA, 2014). Entonces, las operaciones de limpieza y sanitización cumplen dos finalidades: i) Eliminación de restos adheridos a las superficies que pueden proteger a los microorganismos o pueden servir de fuente de nutrientes. ii) Eliminación de microorganismos (sanitización) para reducir o eliminar aquellos que hayan sobrevivido a la limpieza física.

Un protocolo de limpieza y sanitización estándar debería constar de 6 etapas (Briggs et al., 2004; Davies et al., 2015; Waldrom, 2020)

1. PREENJUAGUE con agua para eliminar partículas sólidas y liberar la superficie para la limpieza química. El preenjuague también sirve para eliminar los sólidos que causan bloqueos en el equipo.

2. LIMPIEZA QUÍMICA ALCALINA utilizando soda caustica o detergente de base alcalina a una concentración de 1 y 2 % a 50-70 °C durante mínimamente 20 minutos. En esta etapa es fundamental ejercer fuerza mecánica para remover la suciedad adecuadamente. Es recomendable utilizar sistemas CIP (*Cleaning in place*) para generar un flujo turbulento y mayor cuidado del operario. Durante el ciclo CIP, la solución cáustica se recircula varias veces optimizando el proceso de limpieza.
3. ENJUAGUE con agua para eliminar la solución cáustica.
4. LIMPIEZA QUÍMICA ÁCIDA en general utilizando ácido fosfórico al 1,5 % a temperatura ambiente durante 30 minutos de exposición. El objetivo principal de este lavado es desincrustar la acumulación de sales en las superficies del acero inoxidable (conocido como “piedra cervecera”). Este paso se recomienda siempre en zonas de agua dura o periódicamente en sitios de agua blanda
5. ENJUAGUE con agua hasta eliminar la solución ácida.
6. SANITIZACIÓN en general química utilizando agentes oxidantes a base de ácido peracético y peróxido de hidrógeno. Este tipo de sanitizante es posiblemente el tipo de desinfectante más popular entre los cerveceros ya que tiene gran eficacia sobre un amplio espectro de microorganismos a baja concentración (75-300ppm), se utiliza a temperatura ambiente, no requiere enjuague y se descompone en oxígeno y ácido acético por lo que, además, es respetuoso del medio ambiente. La solución de sanitización debe tener contacto directo con todas las superficies que estarán en contacto con el mosto frío o cerveza y se puede hacer por inundación o utilizando bocha de limpieza CIP.

La legislación argentina contempla la incorporación de procedimientos específicos para la limpieza y sanitización que garanticen inocuidad en los alimentos (CAA, 2014). Por su parte el *Codex Alimentarium* (CODEX, 2020) expresa que “*se debería vigilar la eficacia de la aplicación de los procedimientos de limpieza y desinfección y verificar periódicamente, mediante inspecciones visuales y auditorías, que se han aplicado adecuadamente*”. Continúa señalando que “*el tipo de vigilancia dependerá de la naturaleza de los procedimientos, pero podría incluir el pH, la temperatura del agua, la conductividad, la concentración de los agentes de limpieza, la concentración de los*

desinfectantes y otros parámetros de importancia para garantizar que el programa de limpieza y desinfección se aplica tal como fue concebido y verificar su eficacia". En cuanto la validación de los procesos expone lo siguiente: *"aunque la eficacia de la limpieza y de los agentes desinfectantes y las instrucciones de empleo estén validadas por sus fabricantes, se deberían tomar medidas para tomar muestras y hacer pruebas del medio ambiente y de las superficies que entran en contacto con los alimentos (por ejemplo, pruebas de proteínas, hisopos de alérgenos o pruebas microbiológicas de indicadores) para contribuir a verificar que los programas de limpieza y desinfección son eficaces y se aplican de forma adecuada"*. El apartado finaliza señalando que es probable que la toma de muestras y la realización de pruebas microbiológicas no se adecue a todos los casos y, como alternativa, se puede utilizar la observación de los procedimientos de limpieza y desinfección, incluida la concentración correcta de desinfectante, para alcanzar los resultados necesarios y asegurarse de que se siguen los protocolos de forma adecuada. La información disponible en estos documentos es útil, pero no proporcionan datos precisos en cuanto al abordaje sistemático del diseño, control, verificación y validación de los procesos asequibles para las cervecerías. De hecho, en el *Appendix 1* del Código Internacional Recomendado Revisado de Prácticas-Principios Generales de Higiene de los Alimentos (CODEX, 2020) se encuentran listados los desinfectantes utilizados en la industria de los alimentos y sus recomendaciones de uso, pero este listado no incluye desinfectantes a base de ácido peracético, uno de los desinfectantes más utilizado por las cervecerías (Dalmasso, 2020). Asimismo, la diversidad de marcas con distintas concentraciones de compuestos activos de las soluciones de limpieza y sanitización en muchas ocasiones confunde a los productores respecto del uso óptimo de los productos. Esta situación plantea un problema cotidiano en la industria cervecera cuando las operaciones de limpieza y sanitización deben diseñarse o validarse.

La detección de ATP por bioluminiscencia es uno de los métodos más aceptado por la industria de los alimentos para validar los protocolos de limpieza, por su simpleza en el modo de empleo y por la rapidez para obtener resultados. El método se basa en la medida de ATP total por bioluminiscencia como indicador de la presencia de microorganismos y residuos orgánicos. Aunque este método es altamente eficiente, y

capaz de medir ATP en todas las superficies involucradas en el proceso cervecero, muy pocas microcervecerías lo utilizan, por el alto costo del equipo y sus fungibles.

Existe un método de bajo costo y de fácil procedimiento para validar los procesos de limpieza que se conoce como “test de mosto forzado”. Este método sirve solo para superficies del lado caliente y etapa de enfriado. Consiste en tomar muestras de mosto en distintos puntos del proceso en etapas anteriores a la inoculación de la levadura (después del proceso de enfriado, mosto frío que circula por mangueras, mosto colocado en el fermentador). Una vez colectadas las muestras en recipientes estériles, se incuban para forzar el desarrollo de potenciales microorganismos contaminantes presentes (Brewing Science Institute, 2021; White & Zainasheff, 2010). A sí mismo, se puede tomar una muestra de mosto caliente (preferiblemente en la etapa de whirlpool, para que el mosto esté menos turbio). Esta muestra puede considerarse un control negativo ya que el mosto fue sometido a un hervor vigoroso durante al menos una hora, matando los microorganismos que podrían provenir de las materias primas. La observación de acumulación de gas, la presencia de turbidez, la detección de reducción de pH y/o acumulación de aromas y sabores indeseados una vez iniciada la incubación de las muestras, sirve como evidencia de la presencia de microorganismos contaminantes en ese mosto. El tiempo que le requiere a la muestra desarrollar alguna de estas características indicadoras de actividad microbiana está directamente relacionado con la carga microbiana presente, lo cual se utiliza como variable para determinar la gravedad del problema y tomar decisiones al respecto (Brewing Science Institute, 2021; White & Zainasheff, 2010).

Otro punto importante a considerar en un programa de control de calidad, es el manejo correcto de la levadura cervecera para su inoculación. Esto implica el recuento de células, la evaluación de su viabilidad, y asegurar de incorporación de los nutrientes fundamentales para su desarrollo (al menos oxígeno, calcio y zinc) y que éstos se encuentren en la proporción justa (Bamforth & Lentini, 2008; White & Zainasheff, 2010). En la etapa de fermentación, es importante medir diariamente la temperatura, la densidad y el pH (Waldrom, 2020). En el producto terminado, los puntos de control de calidad microbiológica pueden realizarse utilizando los métodos de detección de contaminantes descriptos en el Capítulo I (Métodos de detección de contaminantes).

El siguiente punto a considerar cuando de calidad se trata, es la estabilidad de los productos terminados a mediano/largo plazo. Durante el período 2020 - 2021 las prácticas de envasado de latas y botellas se han incrementado significativamente en nuestro país atribuido a las medidas de confinamiento y cierre de bares y restaurantes que obligaron a los cerveceros a buscar nuevas oportunidades comerciales (Comunicación personal, Federico Villa - Director de Comunicación y Prensa de la CCAA, 2022). Este nuevo cambio a latas y botellas destaca la necesidad de implementar sistemas de control de calidad y procesos de estabilización del producto en la fábrica para evitar incidentes de contaminación y prolongar la vida útil de la cerveza en el mercado.

El método más utilizado para garantizar la estabilidad microbiológica de la cerveza a largo plazo es la pasteurización. Este método descubierto por Luis Pasteur en 1864, y continúa siendo el método más utilizado para extender la vida útil de la cerveza. A grandes rasgos, el proceso consiste en calentar la cerveza (en línea o envasada) para bajar la carga de microorganismos y proporcionar una cerveza más estable durante el almacenamiento. Este proceso térmico puede afectar el sabor y la calidad sensorial del producto, por lo que los productores de cerveza artesanal se resisten a realizarlo. Para que la pasteurización tenga el menor impacto a nivel sensorial, se debe monitorear con cuidado calculando las unidades de pasteurización utilizando como dato las curvas de tiempo-temperatura dentro de la lata en el punto más frío. La información sobre los procedimientos operativos para la pasteurización en las cervecerías artesanales es escasa y la cerveza sobrepasteurizada es común (Rachon et al., 2018; Cao et al., 2011). El conocimiento de las unidades mínimas de pasteurización para garantizar la estabilidad y maximizar el sabor de la cerveza es de vital importancia, especialmente en las cervezas lupuladas, que sufren mayores cambios de sabor y aroma. La *European Brewing Convention* (EBC) ha establecido recomendaciones de PU que se encuentran entre 15 y 35 PU para cervezas de estilos tradicionales y de 40 a 120 PU para cervezas de bajo y sin alcohol. Cao et al. (2011) ha sugerido que estos valores están sobreestimados, lo que resulta en un sobreprocesamiento de la bebida, que afecta directamente los compuestos de aroma y sabor (Cao et al., 2011). De hecho, un trabajo publicado por Rachon et al. (2018) concluyó que la pasteurización en botellas con 1.6 PU resultó en una reducción de más de 8 log en células viables, lo que resultó en

“esterilidad comercial” y la pasteurización efectiva de microorganismos se logró a valores de PU significativamente más bajos que los recomendados por el EBC (Rachon et al., 2018).

Para determinar el grado de inactivación microbiana y poder comparar entre distintos procesos térmicos se deben establecer cuantas unidades de pasteurización se aplican durante el proceso. Una unidad de pasteurización equivale a 1 minuto a 60 °C y las ecuaciones que permiten conocer las unidades de pasteurización (Eq. 1) y los valores de tiempos de inactivación microbiana requeridos (Eq. 2) son las siguientes:

$$PU_{\text{proceso}} = \text{Letalidad} = \int_0^t 10^{\frac{(T(x,y,z,t)-T_{\text{ref}})}{z}} dt \quad \text{Eq. 1}$$

$$F = D_{\text{ref}} \log \left(\frac{N_0}{N} \right) \quad \text{Eq. 2}$$

donde la Letalidad o PU_{proceso} representa en minutos el tiempo de pasteurización equivalente a 60 °C. Para comparar distintos procesos no isotérmicos como pasteurización de latas y botellas es necesario en primer lugar calcular el tiempo equivalente considerando que todo el proceso ocurre de manera isotérmica a una $T_{\text{ref}}=60$ °C. $T(x,y,z,t)$ es la temperatura versus tiempo en el punto crítico del envase en un punto fijo, y t es tiempo. El tiempo de muerte térmica o F del proceso es el tiempo total requerido para alcanzar una cantidad determinada de reducciones logarítmicas en la población microbiana inicial (ya sea esporas o células vegetativas). Este valor de F se expresa como un múltiplo del tiempo del parámetro de letalidad denominado tiempo de reducción decimal D (min). D representa el tiempo requerido para reducir un 90 % la población microbiana a una temperatura determinada. Si se grafica en una escala semilogarítmica la disminución en la población microbiana versus tiempo se puede observar que el parámetro D representa el tiempo necesario para lograr una disminución de un ciclo logarítmico en la población microbiana. La constante de resistencia térmica Z (°C) es el incremento de temperatura necesario para disminuir D en un 90 %. El D y Z dependen del tipo de microorganismo y características del medio (pH, % alcohol, concentración de compuestos lupulados, entre otros.) y juegan un rol importante en el diseño de procesos térmicos como el pasteurizado.

En este capítulo se evaluó la eficiencia del test de mosto forzado como método asequible de validación de los protocolos de limpieza y se determinaron los parámetros de letalidad para una cepa de *S. cerevisiae* var *diastaticus* a fin de brindar herramientas para la optimización de la pasteurización y minimizar el impacto de las contaminaciones microbiológicas de cerveza en proceso y cerveza terminada, respectivamente.

Materiales y métodos

Para evaluar herramientas que garanticen la calidad de la cerveza aplicables al sector cervecero, se plantearon 2 estrategias: por un lado, hacer énfasis en la prevención de contaminantes, mediante la evaluación de la higiene de las superficies como método de validación de los protocolos de limpieza y sanitización en fábrica. Por otro lado, se propone que las condiciones de pasteurización pueden ser optimizadas para alargar la vida útil a mediano/largo plazo manteniendo la frescura del producto.

Validación de protocolos de limpieza y sanitización: test de mosto forzado.

Durante los años 2017 al 2019 se colectaron 20 muestras de mosto (50 mL) en envases estériles provenientes de 13 cervecerías oriundas de Bariloche y El Bolsón (Tabla 5.1). Las muestras fueron colectadas inmediatamente después de llenar el fermentador (previamente limpiados y sanitizados según los protocolos propios de cada fábrica), es decir luego del proceso de enfriado, y antes de inocular la levadura.

La toma de muestras en fábrica se realizó de la siguiente manera: el puerto de muestreo (conocido por los cerveceros como tomamuestras) se abrió al máximo y se descartó mosto por 5-10 s. Se cerró nuevamente el tomamuestras y se limpió utilizando algodón con alcohol 70 % (v/v) todas las superficies del puerto de muestreo. Se roció con alcohol 96 % (v/v) el puerto de muestreo en su interior y exterior y se flameó la superficie rociada con alcohol hasta que se consumió la llama. Se abrió el tomamuestras y se purgó nuevamente durante 5-10 s para que el puerto de muestreo vuelva a enfriarse. Con la válvula abierta, se colectó $\frac{3}{4}$ del volumen total del recipiente estéril (Tubos Falcon/frascos de orina) (Brewing Science Institute, 2019). A modo de control negativo se tomó

también una muestra de mosto después de realizar el Whirlpool. Todas las muestras fueron incubadas a 30 °C durante 7 días (White & Zainasheff, 2010) y fueron evaluadas diariamente durante este período.

Una muestra se consideró positiva cuando se registró la presencia de gas, turbidez y/o sedimentos en comparación con su control negativo. Durante el período de incubación se registró además el tiempo (en días) que las muestras tardaron en desarrollar alguna de las mencionadas características indicadoras de actividad microbiana.

Tabla 5.1. Muestras de mosto tomadas de fermentadores en 13 cervecerías Patagónicas.

Cervecería	Muestras (año)
BRY 1	MF4 (2017); MF15 (2019)
BRY 2	MF2 (2017); MF19 (2019)
BRY 3	MF7 (2017); MF16 (2019)
BRY 6	MF6 (2017); MF18 (2019)
BRY 8	MF20 (2019)
BRY 9	MF3 (2017); MF13(2019)
BRY 19	MF1(2017); MF17(2019)
BRY 23	MF14 (2019)
BRY 55	MF11 (2019)
BRY 56	MF5 (2017); MF12 (2019)
BRY 57	MF8 (2017)
BRY 58	MF9 (2017)
BRY 59	MF10 (2018)

*Crecimiento y resistencia térmica de *S. cerevisiae* var. *diastaticus* en IPA*

medio de cultivo y selección de cepas

Para medir la capacidad de crecimiento y resistencia térmica de levaduras *S. cerevisiae* var. *diastaticus* identificadas en el Capítulo 4, se utilizó como medio de cultivo una cerveza de estilo IPA (Densidad 1,010 g/mL; pH 4,52; Alcohol 4,31 % v/v; Color 18 SRM; Amargor 54 IBUs). La cerveza se esterilizó utilizando un filtro estéril de 0,22 µm.

Para realizar los experimentos, se seleccionaron 4 levaduras *S. cerevisiae* var. *diastaticus*. En la Tabla 5.2 se encuentra información relevante de cada cepa. Para la selección de las cepas de estudio se priorizó aquellas aisladas de cerveza IPA y se incluyó la cepa PAC LC023 que fue identificada como *S. uvarum* *Sta1* + por tratarse de un caso único de condición *Sta1*.

Tabla 5.2. Aislamientos seleccionados según estilo de origen, capacidad de producir fenoles, porcentaje de esporulación y de consumo de almidón.

# Cepa	Origen	Producción de fenoles (POF)	Esporulación	Poder diastático
PAC LC021	IPA	+	17,8 %	14 %
PAC LC023	Old Ale	+	13,9 %	23 %
LC42	IPA	+	23,7 %	73 %
LC54	IPA	+	15,8 %	52 %

Crecimiento de cepas en cerveza estilo IPA

Se realizó el seguimiento de crecimiento de las levaduras en cerveza IPA a 28 °C cuantificando UFC/mL a distintos tiempos. Para la evaluación de crecimiento en cerveza IPA, las cepas se incubaron inicialmente en 10 mL de caldo YM durante 48hs. Se tomó una alícuota de 100 µL del tubo y se colocó en 10 mL 50:50 caldo YM: cerveza y se incubó por 48 hs. Luego, se centrifugó y se resuspendió en 10 mL cerveza IPA 100 % por 48 hs. Transcurrido este tiempo de adaptación se centrifugó y se resuspendió en 100 % cerveza IPA nuevamente (a partir de ahora referido como medio IPA). Esta instancia se tomó como t=0 y se sembró en placas de YM para realizar el recuento inicial de UFC/mL. El tubo se mantuvo en la incubadora a 28 °C por al menos 30 días, tomando muestras semanalmente para registrar el número de UFC/mL.

Transcurrido el tiempo de incubación y luego del último recuento realizado se midieron los cambios de pH (pHmetro Sartorius PR15) y densidad (densímetro Easydens, Anton Paar) producidos por las cepas sobre la cerveza IPA utilizada como medio de cultivo.

Cabe mencionar que los tiempos en que se realizaron los recuentos fueron diferentes para cada cepa dado que esta parte del trabajo se realizó durante la pandemia COVID-19 con las dificultades que ésta presentó para asistir al laboratorio. Por ejemplo, el

tiempo máximo de recuento de la cepa PAC LC021 fue de 14 días dado que no se pudo realizar el recuento correspondiente al día 30.

Resistencia térmica

Se realizó un ensayo de tolerancia térmica a 60 °C durante 30 s (equivalente a 0,5 Unidades de Pasteurización = UP) para conocer la reducción de ciclos logaritmos que se producen al aplicar el tratamiento térmico (TT). Para esto se tomaron alícuotas de los cultivos utilizados para el ensayo de crecimiento en medio IPA en fase estacionaria (5-7 días) y se cargaron asépticamente 8 capilares (1,4 mm de diámetro, 75mm de largo, 80 µL de volumen) por replicado biológico con un volumen de 25 µL de cada cultivo (100 µL en total). Una vez cargados, los capilares fueron sellados con calor. Luego, 4 capilares fueron colocados inmediatamente en un baño de agua con temperatura controlada a 60°C por 30 segundos y enfriados en baño agua-hielo inmediatamente al finalizar este tiempo. La temperatura alcanzada por los capilares se registró mediante termocuplas tipo T (Cobre-Constantán) conectadas a un equipo de adquisición de datos (TESTO, Alemania).

Los capilares que pasaron por el tratamiento térmico se los llamó “con TT”, mientras que los 4 capilares restantes, que no sufrieron el tratamiento térmico fueron denominados “sin TT”. Posteriormente, los capilares de ambos tratamientos fueron triturados en tubos con agua peptonada (dilución 1:10) para realizar diluciones seriadas y sembrar en placas de YM para registrar el número de UFC/mL con y sin TT. Para analizar estadísticamente las diferencias entre el número inicial de UFC/mL del cultivo (sin TT) y el número de UFC/mL supervivientes al tratamiento térmico (con TT) se realizó un test de Student utilizando el software Graph Pad Prism 8.

Las cepas que lograron sobrevivir a 0,5 PU en una concentración mayor a 10^3 UFC/mL (reducción de 3-4 ciclos logarítmicos) se consideraron resistentes al proceso térmico y se seleccionaron para realizar el ensayo completo de determinación de parámetros de letalidad D (tiempo de reducción decimal, unidades en minutos) y Z constante de resistencia térmica (°C).

Parámetros de letalidad D y Z

La cepa *S. cerevisiae* var. *diastaticus* LC42 fue seleccionada para la obtención de los parámetros D y Z y los experimentos se realizaron mediante la metodología del capilar mencionada en el inciso anterior. Para conocer los parámetros D y Z es requisito que la cinética de inactivación microbiana siga una reacción de primer orden según la siguiente ecuación:

$$\text{Log}10 \left(\frac{N}{N_0} \right) = -t/D$$

Donde N es el número de recuentos a tiempo de tratamiento t y N₀ corresponde a los recuentos iniciales en UFC/mL (t = 0) (Singh y Heldman, 1993). Como dicha ecuación es válida a una temperatura constante, las temperaturas seleccionadas fueron 54 °C (por 15, 30, 40 y 60 segundos), 57 °C (durante 15, 30, 35 y 40 segundos) y 60 °C (por 10, 15, 20, 25 y 30 segundos). A cada temperatura se realizaron regresiones con los valores de Log₁₀(N/N₀) versus tiempo (min) utilizando el software MATLAB y de la pendiente pudo obtenerse el parámetro D (min) para cada temperatura.

El valor de Z se estimó utilizando una regresión no lineal multivariable utilizando todos los resultados experimentales a la vez utilizando el software MATLAB. Los resultados se regresionaron utilizando el mismo programa en una función z=f(x, y) siendo las variables independientes x=tiempo, y=temperatura y la variable dependiente z=Log₁₀(N/N₀) como muestra la siguiente ecuación:

$$\text{Log}10 \left(\frac{N}{N_0} \right) = - \left(\frac{t}{D_{ref}} \right) 10^{\frac{T-T_{ref}}{Z}}$$

El tiempo de muerte térmica (F) del proceso es el tiempo total requerido para alcanzar una cantidad determinada de reducciones logarítmicas en la población microbiana inicial (ya sea esporas o células vegetativas). Este valor de F se expresa como un múltiplo del tiempo del parámetro de letalidad denominado tiempo de reducción decimal D (min) y se calculó utilizando la siguiente ecuación.

$$F = D_{ref} \cdot \text{Log}10 \left(\frac{N}{N_0} \right)$$

Resultados

Validación de los protocolos de limpieza

De los 20 mostos colectados de fermentadores (previos a la inoculación de la levadura), 8 de ellos (40 %) mostraron evidencias de crecimiento microbiano durante la semana de incubación a 30 °C. Estas evidencias de contaminación, fueron detectadas por la presencia de gas, turbidez y/o sedimentos. En la Figura 5.1 se puede ver un ejemplo de un resultado positivo del test de mosto forzado, comparado con su control negativo (muestra tomada en la etapa de whirlpool). En 5 de los casos positivos, las evidencias de crecimiento aparecieron al segundo día de incubación, mientras que 2 casos mostraron crecimiento microbiano al tercer día y 1 caso presentó evidencias de crecimiento al sexto día de incubación (Tabla 5.3).

Por último, se encontró que 6 de las 13 fábricas involucradas en este análisis (46 %), presentó una limpieza deficiente de los fermentadores muestreados. Es interesante notar que 2 cervecerías que no tuvieron problemas de limpieza en el año 2017, si los tuvieron en el muestreo realizado en 2019 (BRY 1, BRY 56) mientras que la cervecería BRY 3 presentó problemas de limpieza en los dos muestreos realizados. Por el contrario, las cervecerías BRY 2, BRY 9, BRY 6 y BRY 19 no se detectaron fallas en la limpieza de fermentadores mediante las técnicas empleadas y en los años muestreados. Para el resto de las cervecerías solo se colectó una muestra, por lo que este análisis a través del tiempo no puedo aplicarse.

Tabla 5.3. Resultados de los Test de mosto forzado obtenidos durante los años 2017 y 2019 en cervecerías Patagónicas. Cuando el resultado fue positivo (+) se anotó el día en que aparecieron las evidencias de crecimiento microbiano. N.a significa no aplica ya que las muestras resultaron negativas (-) para el análisis

# Mosto Forzado	Cervecería	Año	Resultado	Día
MF1	BRY 19	2017	(-)	n.a
MF2	BRY 2	2017	(-)	n.a
MF3	BRY 9	2017	(-)	n.a
MF4	BRY 1	2017	(-)	n.a
MF5	BRY 56	2017	(-)	n.a

MF6	BRY 6	2017	(-)	n.a
MF7	BRY 3	2017	(+)	2
MF8	BRY 57	2017	(+)	2
MF9	BRY 58	2017	(-)	n.a
MF10	BRY 59	2018	(+)	2
MF11	BRY 55	2019	(+)	6
MF12	BRY 56	2019	(+)	3
MF13	BRY 9	2019	(-)	n.a
MF14	BRY 23	2019	(-)	n.a
MF15	BRY 1	2019	(+)	2
MF16	BRY 3	2019	(+)	2
MF17	BRY 19	2019	(-)	n.a
MF18	BRY 6	2019	(-)	n.a
MF19	BRY 2	2019	(-)	n.a
MF20	BRY 8	2019	(+)	3



Figura 5.1. Test de mosto forzado positivo (derecha) detectado por la presencia de gas, turbidez y sedimentos en comparación con su control negativo (izquierda) en la que sólo se observa la presencia de proteínas coaguladas (trub).

Crecimiento y resistencia térmica de *S. cerevisiae* contaminantes en cerveza IPA

Las cepas *S. cerevisiae* var. *diastaticus* seleccionadas para este análisis por provenir de cerveza IPA (LC42, LC54, PAC LC021) y la cepa *S. uvarum* (con presencia del *Sta1*), no solo fueron capaces de sobrevivir en cerveza IPA durante al menos un mes, sino que en todos los casos fueron capaces de crecer en estas condiciones en más de un ciclo logarítmico encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0009$) entre la concentración celular del cultivo en el tiempo 0 y 30 días de incubación a 28 °C (Figura 5.2).

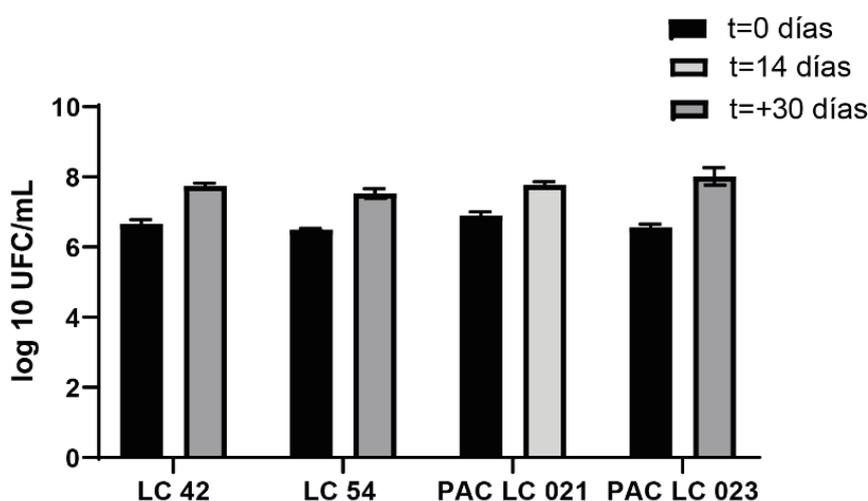


Figura 5.2. Capacidad de crecimiento de los aislamientos de *Saccharomyces* diastáticas en cerveza IPA.

Por otro lado, como consecuencia del crecimiento microbiano en la cerveza IPA, se observó una disminución en la densidad y pH en la cerveza de cultivo después de más de un mes de incubación. Estos cambios pueden verse en la Tabla 5.4. No se incluyó la cepa PAC LC021 ya que no fue posible medir este cultivo a los 30 días de incubación. Además, se puede observar la baja densidad final generada por la cepa *S. uvarum* PAC LC023, confirmando así su capacidad de superatenuar la cerveza.

Tabla 5.4. Densidad y pH de la cerveza original utilizada como medio de cultivo para el crecimiento de *Saccharomyces* diastáticas y luego de 30 días de incubación con cepas de *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastáticus*.

	IPA original	LC42	LC54	PAC LC023
Densidad	1,011	1,004	1,001	1,002
pH	4,523	4,214	4,169	4,339

Todas las cepas a las que se aplicó un tratamiento térmico de 0,5 PU para evaluar la termorresistencia, mostraron diferencias significativas con respecto a los cultivos a los que no se les aplicó el tratamiento (Figura 5.3), bajando la concentración celular entre 2 y 4 ciclos logarítmicos luego de aplicar tratamiento térmico (LC42 $p = 0,008833$; LC54 $p = 0,004488$; PAC LC21 $p = 0,005386$; PAC LC023 $p = 0,001263$). Las cepas estudiadas, fueron capaces de tolerar una temperatura de 60°C por 30 segundos y de sobrevivir en una escala mayor a 4 log 10 UFC/mL, exceptuando la cepa PAC LC 023 que fue la levadura más afectada por el tratamiento térmico (alcanzando apenas los 3 ciclos logarítmicos luego de aplicar tratamiento térmico). Estos resultados indicaron que las cepas LC42, LC54 y PAC LC021 ameritaban ser estudiadas para evaluar los parámetros de letalidad (D y Z). En el presente trabajo se seleccionó la cepa LC42 para continuar los estudios de inactivación térmica dada su alta capacidad de consumo de dextrinas, de esporulación y producción de fenoles (ver Tabla 5.2).

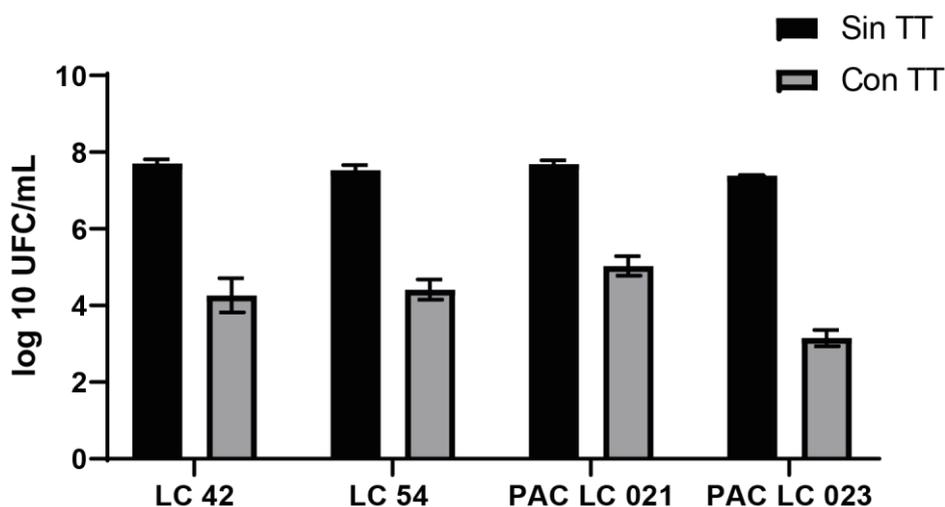


Figura 5.3 Tolerancia térmica de *S. cerevisiae* var. *diastaticus* a un tratamiento térmico de 0,5 PU (60°C, 30s). Las barras negras muestran la concentración del cultivo antes de aplicar tratamiento térmico (sin TT) y las barras grises muestran la concentración del cultivo luego de aplicar el tratamiento (Con TT).

Parámetros de letalidad D y Z de la cepa S. cerevisiae var. *diastaticus* LC 42

Como puede observarse en la Figura 5.4, se encontró una relación lineal de decrecimiento microbiano (en ciclos logarítmicos) con el tiempo de tratamiento en cada una de las tres temperaturas evaluadas (54 °C, 57 °C y 60 °C), por lo cual es válida la

aplicación de una cinética de primer orden para la obtención del parámetro D a las tres temperaturas.

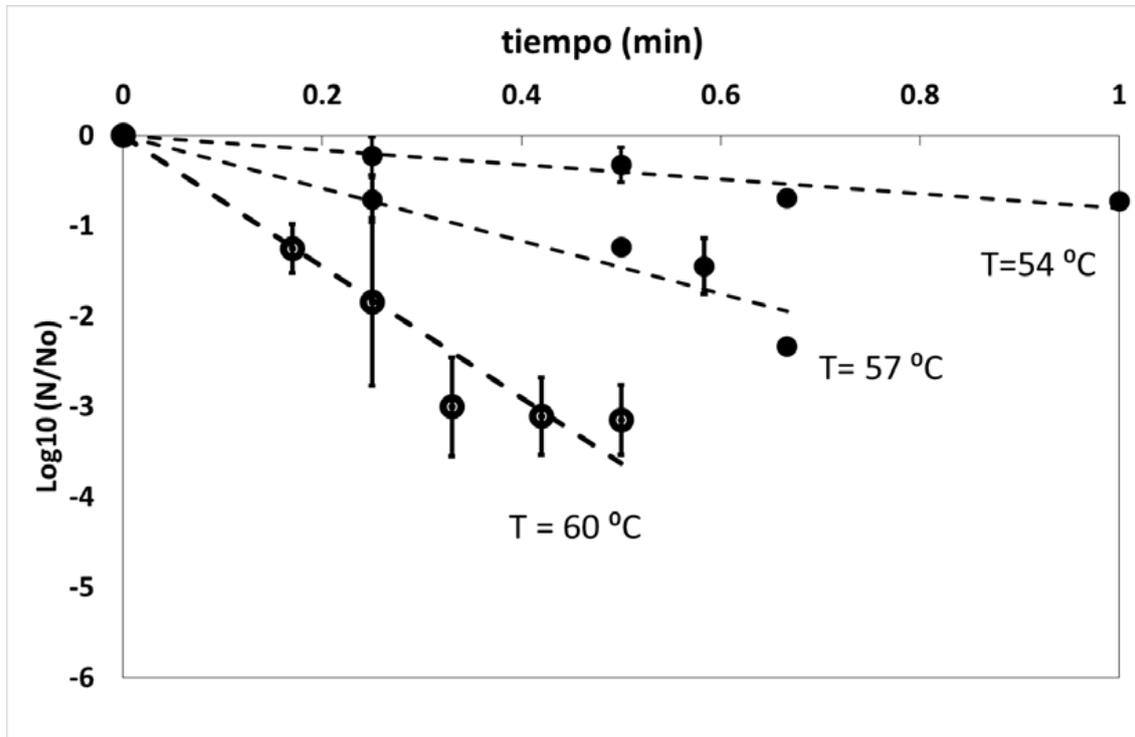


Figura 5.4. Curvas de inactivación microbiana de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* var. diastáticus LC42 a diferentes tiempos (54 °C, 57 °C y 60 °C) en cerveza IPA.

En todos los casos estudiados, puede observarse que los valores de D disminuyeron al aumentar la temperatura (Tabla 5.5). Los coeficientes de correlación oscilaron entre 0,90 y 0,93 para los ensayos realizados, por lo cual fue posible realizar el cálculo del valor Z. Este valor fue de $6,9 \pm 1,1$ indicando que es necesario aumentar 6,9 °C la temperatura para disminuir D al 10 %.

Tabla 5.5. Valores D y Z y sus intervalos de confianza, coeficientes de correlación (R) de las regresiones obtenidas a partir de las curvas de supervivencia para LC 42 en cerveza IPA y la ecuación $\text{Log}_{10}(N/N_0) = (T/D_{ref}) - 10^{((T-T_{ref})/Z)}$.

D (Min)			Z (°C)
T ₁ = 54 °C	T ₂ = 57 °C	T ₃ = 60 °C	
D ₅₄ =1,24 ± 0,32	D ₅₇ =0,34 ± 0,08	D ₆₀ =0,14 ± 0,02	6,9 ± 1,1
R ² =0,904	R ² =0,912	R ² =0,925	R ² =0,947

Con los valores obtenidos fue posible calcular las unidades mínimas de pasteurización necesarias (F) para reducir 12 ciclos logarítmicos una hipotética contaminación con la cepa LC42. Suponiendo una contaminación de 100 UFC/mL y tomando como D_{ref} el valor de D_{60} , se requerirían 1,68 min a 60 °C para disminuir 12 ciclos logarítmicos la población inicial de la cepa LC42. En otras palabras, sería necesario aplicar como mínimo 1,68 PU para reducir la carga microbiana en 12 ciclos.

Discusión

La implementación de procedimientos efectivos de limpieza y sanitización pueden minimizar el riesgo de contaminaciones microbianas. Un control regular del estado higiénico de la planta es una herramienta útil para rastrear posibles puntos débiles y tomar acciones correctivas para evitar el crecimiento y dispersión de los contaminantes. El test de mosto forzado detectó ineficiencias en la limpieza y sanitización 8 muestras proveniente de fermentadores. Sin embargo, los microorganismos que causaron el deterioro del mosto colectado en el fermentador, también pudieron provenir del enfriador de placas o las mangueras que llevaron el mosto hacia el fermentador. Para dilucidar de que superficie vienen los microorganismos, es importante sumar puntos de muestreo (por ejemplo, mangueras y enfriador de placas) y así aumentar la sensibilidad del método. En cualquier caso, el crecimiento forzado de los microorganismos en los mostos colectados, denota problemas en la limpieza del equipamiento. Que la mayoría de los casos haya mostrado evidencias de crecimiento microbiano a las 48hs de incubación, denota problemas graves en los protocolos de limpieza que podrían terminar en una cerveza (y una levadura para reutilización) contaminada cuya consecuencia podría ser notoria a nivel sensorial (White & Zainasheff, 2010). Los resultados de los análisis de mosto forzado obtenidos en este capítulo son novedosos, aunque difíciles de comparar con otras regiones, ya que no se han encontrado antecedentes de este tipo de test en la bibliografía. Thompson (2022), mostró algunas vulnerabilidades en los protocolos de limpieza estándar utilizados por la mayoría de las cervecerías. En este estudio que tuvo como objetivo evaluar puntos críticos de control

en fábricas de cerveza utilizando métodos moleculares rápidos, se demostró que la válvula del brazo de la bomba utilizada para transferir mosto/cerveza, así como la válvula de escape de CO₂ (*Blow off*) de los fermentadores y el área de llenado de barriles, fueron las superficies con mayor acumulación de bacterias dentro de la fábrica (Thompson, 2022), poniendo en evidencia fallas en la limpieza y desinfección en esas superficies. Por su parte, Ismail et al., (1999) observaron acero inoxidable 304 mostró signos de corrosión por la presencia de *biofilms* bacterianos, dejando la superficie con pequeños poros que pueden afectar la eficacia los protocolos de limpieza. Se ha observado también, que el *krausen* generado durante la fermentación primaria en los fermentadores, genera residuos que, si no son removidos adecuadamente, además de ser un reservorio de nutrientes para el crecimiento de contaminantes microbianos, con el tiempo puede causar corrosión en el acero inoxidable 304 (Thompson, 2022), por lo que es importante que la parte superior de los fermentadores se examine periódicamente en busca de indicios de corrosión. Los ejemplos mencionados, denotan la importancia de un buen diseño del equipo de elaboración para que las prácticas de limpieza y sanitización sean efectivas y eficientes.

En cuanto a las cervecerías, se confirmó que la mitad de las fábricas requieren mejoras en sus protocolos de limpieza y sanitización y aunque se obtengan resultados negativos en un muestreo, estos protocolos deben ser continuamente revisados y evaluados. Un ejemplo de esta observación son las cervecerías BRY 1 y BRY 56 que en el año 2017 no presentaron problemas, pero si en el 2019. El test de mosto forzado es simple, económico, fácil y da una valiosa información sobre el estado higiénico de una parte importante del proceso productivo.

Por otro lado, se confirmó que todas las cepas diastáticas de *Saccharomyces* involucradas en el ensayo de crecimiento en cerveza IPA como medio de cultivo fueron capaces de desarrollarse notablemente y que las consecuencias de este crecimiento sobre la cerveza fue una disminución del pH y de la densidad. Este resultado resalta, además, la importancia de las mediciones de pH y densidad en cervezas terminadas para detectar posibles contaminaciones.

Una forma de asegurar la estabilidad de la cerveza una vez fuera de la fábrica, es mediante la pasteurización. La combinación de tiempo y temperatura para la pasteurización de la cerveza tiene un gran impacto en la calidad del producto, ya que

afecta las características de la cerveza en términos de sabor, color, amargor, turbidez, desnaturalización de proteínas, aceleración de procesos de oxidación, entre otras consecuencias (Buzrul et al., 2005). Por ello muchas cervecerías se resisten a la aplicación de tratamientos térmicos, aunque actualmente, esta práctica es cada vez más común por la necesidad de transportar la cerveza cada vez más lejos y de conquistar nuevos mercados.

La cinética de inactivación de los microorganismos que deterioran la cerveza determina el cálculo de PU a aplicar en el proceso de pasteurización (Zufall & Wackerbauer, 2000). Para evaluar la cinética de inactivación primero se comprobó que las cepas sean termorresistentes a un tratamiento térmico, es decir que sobrevivan significativamente al aplicar 0,5 PU (60 °C por 30 segundos) (Rachon et al., 2018). Las 4 cepas analizadas en este trabajo, fueron capaces de sobrevivir al tratamiento térmico aplicado, aunque la cepa PAC LC023 logró sobrevivir en menor medida. El resto de las cepas fueron altamente resistentes indicando que el ensayo completo de la cinética de inactivación a distintas temperaturas estaba debidamente justificado para llevarse a cabo. Se seleccionó la levadura LC42 para calcular los parámetros D y Z por ser considerada la cepa más peligrosa para el producto (cepa altamente diastática (73 %), productora de fenoles, esporuladora y termoresistente).

Los valores obtenidos del parámetro D a tres temperaturas (54 °C, 57 °C y 60 °C) permitieron calcular el valor Z de la cepa LC42 ($Z= 6,9$ °C). Este valor indica que se necesita aumentar la temperatura 6,9 °C para disminuir el tiempo requerido para la reducción del 90 % de la población microbiana (D), o sea bajar un ciclo logarítmico el tiempo de exposición a esa temperatura. El valor obtenido en este trabajo, es similar al calculado por Zufall y Wackerbauer (2000) en cerveza de trigo quienes obtuvieron un valor de $Z=6,94$ °C para *S. cerevisiae* y *S. cerevisiar* var. *diastaticus*. Por su parte, Reverón et al. (2003) encontraron en *S. cerevisiae* un valor de Z sobre cerveza Pilsen levemente más bajo ($Z=6,4$ °C) que el encontrado en este trabajo. Por su parte, Rachon et al. (2021) estudiaron los parámetros de letalidad térmica para las esporas de diferentes cepas de *S. cerevisiae* (inclusive *S. cerevisiae* var. *diastaticus*) y obtuvieron valores máximos de Z de 4,32 °C. Sin embargo, los valores de D a 60 °C obtenidos por estos autores fueron mayores ($D_{60}=0,62$ min en cerveza lager estilo alemán y $D_{60}=1,20$ min en cerveza lager estilo americano) a los encontrados en este trabajo para células vegetativas ($D_{60}=0,14$

min). En el trabajo de Milani et al. (2015) los valores de D y Z obtenidos para ascosporas de *S. cerevisiae* registraron valores más elevados (D_{60} entre 4,6 y 11,2 minutos y valores Z entre 11,7 y 14,3 °C). Sin embargo, estos últimos, utilizaron cerveza sin alcohol para los experimentos y por esa razón los valores de D y Z son más elevados (Rachon et al., 2021). Milani et al. (2015) también confirmaron que las levaduras en cervezas sin alcohol son más tolerantes a los procesos térmicos y requieren mayores UP en la pasteurización (Milani et al., 2015). Además, demostraron que las esporas de *S. cerevisiae* son mucho más termorresistentes que las células vegetativas, hecho que también fue demostrado por Put & de Jong, (1980) y Rachon et al. (2021).

El valor de Z obtenido para la cepa LC42 en este trabajo es similar al encontrado por Del Vecchio et al. (1951) ($Z=6,94$ °C) que se ha tomado de referencia para el cálculo de PU en cerveza por muchos años. Sin embargo, el estudio de Del Vecchio incluye varios aspectos metodológicos que difieren de la metodología empleada en este trabajo. Por ejemplo, los autores utilizaron una cerveza completamente fermentada, complementada con un 5% de mosto hervido, aumentando así la concentración total de azúcar en el producto. Además, los autores no muestran los valores de D obtenidos para el cálculo del parámetro Z y F y además, inocularon el producto con una mezcla de microorganismos (bacterias y levaduras) que deterioran la cerveza, basando la cinética de muerte en los más termotolerantes (Rachon et al., 2018). El trabajo de Del Vecchio nunca tuvo la intención de proporcionar un modelo general para la pasteurización. De hecho, los propios autores informaron en el estudio que "no se debe concluir que la resistencia encontrada para los organismos en estas pruebas es necesariamente el máximo existente en la industria cervecera" (Del Vecchio et al., 1951). Sin embargo, desde su publicación, el estudio de Del Vecchio ha sido ampliamente interpretado como un indicador de la pasteurización y sus hallazgos se han aplicado a una variedad de estilos de cerveza que contienen una amplia gama de parámetros químicos, sin los datos microbiológicos sólidos necesarios para garantizar la calidad microbiana y la integridad del producto (Rachon et al., 2018).

Los parámetros de letalidad térmica obtenidos en este trabajo, permitieron calcular las unidades mínimas de pasteurización necesarias (F) para reducir 12 ciclos logarítmicos una contaminación hipotética de 100 UFC/mL de la cepa LC42. Los resultados mostraron que sería necesario aplicar un tratamiento térmico de 1,68 min a 60 °C (1,68 PU) para

eliminar significativamente una contaminación causada por la cepa LC42 en una cerveza IPA. Las UP recomendadas por la EBC recientemente han sido cuestionadas por sus valores excesivos (entre 15 y 35 UP para este tipo de cerveza). Los resultados presentados en este trabajo están en concordancia con esta afirmación, lo que resalta la necesidad de optimizar los procesos de pasteurización para diferentes estilos de cerveza y para distintos microorganismos contaminantes ya que probablemente, resulte en una disminución de costos, menor utilización de energía y menor utilización de agua para las cervecerías.

En este trabajo se calcularon por primera vez los valores de D y Z para una levadura *S. cerevisiae* diastática de origen argentino que servirán para optimizar los procesos de pasteurización en fábrica, y podrían ser útiles para establecer nuevos criterios de pasteurización que garanticen la seguridad alimentaria y alarguen la vida útil de la cerveza, manteniendo la frescura y calidad sensorial de esta bebida.

Consideraciones finales

Esta tesis representa el primer trabajo que analiza con profundidad la incidencia de contaminantes de Argentina abarcando desde la detección de contaminaciones en la cerveza, hasta la identificación genética microorganismos contaminantes. En un análisis global, los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que las cervezas argentinas no son ajenas a la problemática que causan las contaminaciones microbianas a nivel internacional y los microorganismos, a nivel de especie/género, que contaminan las cervezas argentinas, son los mismos que lideran las contaminaciones en el mundo. Sin embargo, a nivel de cepa, el panorama podría ser diferente ya que la tipificación a nivel de cepas, tomando como ejemplo el estudio en cepas *Saccharomyces*, dio cuenta de una gran diversidad tanto genética como fenotípica. La tipificación genética de levaduras contaminantes del género *Saccharomyces* además arrojó resultados muy interesantes respecto a la especificidad y capacidad de permanencia de ciertas cepas contaminantes y por otro lado la ocurrencia de una misma cepa en diferentes fábricas. Por último, como resultado de los análisis genéticos de *Saccharomyces*, se obtuvo una levadura posiblemente nueva, que a pesar de haber sido identificada como *Saccharomyces uvarum*, contiene el gen *Sta1* involucrado en el consumo de dextrinas y almidones, cuestión que hasta la fecha no ha sido descrita.

Por otro lado, se ha podido establecer que el análisis sensorial, junto con mediciones de pH puede ser útil para detectar contaminaciones causadas por bacterias y una disminución de la densidad final de las cervezas puede indicar la presencia de levaduras diastáticas. Sin embargo, la manera más precisa de detectarlas es utilizando medios de cultivo específicos entre los cuales se destaca el medio HLP para bacterias lácticas y un medio con sulfato de cobre para levaduras salvajes. El medio HLP, detecta a las principales bacterias que contaminan la cerveza y resulta fácil de manipular para una persona sin formación microbiológica, además de que no requiere esterilización por autoclave. Por su parte, el empleo de medios de cultivo con sulfato de cobre (en una concentración de hasta 500ppm) permite la detección de levaduras sacaromícéticas así como el aislamiento de no sacaromícéticas.

Los resultados demostraron que las cervecerías deben ser muy cuidadosas con los protocolos de limpieza y sanitización para evitar de forma preventiva las contaminaciones. Nuestros resultados indican que la forma más fácil y barata de controlar este proceso es mediante la implementación de test de mosto forzado de manera rutinaria, sin embargo, los puntos de muestreo utilizando este método son limitados ya que solo se puede efectuar en superficies que tomen contacto con el mosto (previo a la inoculación de la levadura) y no con la cerveza terminada.

Por último, se pudo determinar las cepas de levaduras *S. cerevisiae* contaminantes con el conjunto de características más peligrosas para la producción cervecera y para una de ellas, se pudo calcular la cinética de letalidad térmica. Esto no tiene antecedentes para microorganismos contaminantes cerveceros de origen argentino y será de suma importancia para brindar parámetros de referencia a los productores más cercanos a la realidad local.

Durante el trabajo de esta tesis se realizaron múltiples interacciones con productores de cerveza y se capacitó a cerveceros y cerveceras en distintos eventos, muchos de ellos, enmarcados dentro de los encuentros “ciencia y cerveza” donde participaron más de 2500 Productores de Argentina y países limítrofes (<https://www.conicet.gov.ar/cienciaycerveza/>). Además, a lo largo del período de la tesis, se visitaron más de 20 fábricas de cerveza de diferentes localidades con distintos tamaños y volúmenes de producción, diferentes tecnologías productivas, y se conoció las distintas realidades económicas y tecnológicas que presentan los establecimientos cerveceros de Argentina. Esta interacción ayudó además, a dimensionar y entender las problemáticas comunes que estos afrontan, entre ellas las relacionadas a la contaminaciones microbianas.

Implicancias y perspectivas

Aunque los estilos de cerveza tradicionales todavía dominan el mercado, actualmente existe una tendencia que empuja a las cervecerías al desarrollo de productos novedosos. En este sentido la venta de cervezas no convencionales, cervezas ácidas, bajas en calorías y las cervezas sin alcohol aumentaron significativamente.

Los aislamientos obtenidos en este trabajo representan un gran recurso tanto para el diseño de estrategias de detección y control de microorganismos contaminantes y validación de procesos de pasteurización, como para el estudio de su fisiología, características genéticas y su potencial uso en innovación cervecera y otras bebidas. En la Tabla 6, se resumen las posibles aplicaciones de los principales microorganismos que conforman la colección aquí generada.

Tabla 6. Posibles aplicaciones científico-tecnológicas de los principales microorganismos aislados de cervezas contaminadas de Argentina depositados en la colección del grupo CRELTEC (IPATEC).

Microorganismo	Potencial aplicación en ciencia y/o biotecnología	Referencia
<i>L. brevis</i>	- Diseño y validación de nuevos medios de cultivo y técnicas de detección	(Hong et al., 2020; Schneiderbanger et al., 2020)
	- Cervezas ácidas	(Dysvik et al., 2020; White Labs, 2022)
	- Validación de proceso de pasteurización cerveza.	(Rachon et al., 2018)
	- Estudio de capacidad probiótica y su aplicación en cerveza y otros alimentos (kéfir, yogurt, etc).	(Calumba et al., 2021)
	- Evaluación de producción exopolisacaridos de interés biotecnológico	(Fraunhofer et al., 2017)
<i>Acetobacter</i> sp.	- Diseño y validación de medios de cultivo y técnicas de detección.	(Paradh & Hill, 2016)
	- Validación de proceso de pasteurización cerveza.	(Rachon et al., 2018)
<i>S. cerevisiae</i> (<i>Sta1 +</i>)	- Diseño y validación de nuevos medios de cultivo y técnicas de detección	(Burns et al., 2021; Matoulková et al., 2013; Meier-Dörnberg et al., 2018)
	- Cervezas innovadoras y de bajas calorías	(Hutzler et al., 2012; Krogerus et al., 2019a; Krogerus & Gibson, 2020)
	-Producción de bioetanol	(Kilonzo et al., 2007)
	- Validación de proceso de pasteurización cerveza.	(Milani et al., 2015; Rachon et al., 2021; Zufall &

		Wackerbauer, 2000)
<i>S. cerevisiae</i> (<i>Sta1</i> -)	- Diseño y validación de nuevos medios de cultivo y técnicas de detección - Cervezas innovadoras	(Kubizniaková et al., 2014; Matoulková et al., 2013; Meier-Dörnberg et al., 2018) (Hutzler et al., 2012, 2020; White Labs, 2022)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	-Cervezas innovadoras (<i>bioflavoring</i>)	(Kubizniaková et al., 2014; Matoulková et al., 2013) (Basso et al., 2016; Hutzler et al., 2012; Ravasio et al., 2018; Satora et al., 2014)
<i>Pichia membranofaciens</i> / <i>Pichia fermentans</i>	-Cervezas innovadoras (<i>bioflavoring</i> , bajo/sin alcohol)	(Hutzler et al., 2012; Ravasio et al., 2018; Vicente et al., 2021)
<i>Torulaspota delbruekii</i>	-Cervezas innovadoras y bajo alcohol	(Basso et al., 2016; Canonico et al., 2017; Hutzler et al., 2020; Toh et al., 2020)
<i>S. uvarum Sta1</i> +	Investigación de nuevos híbridos de <i>Saccharomyces</i>	-

Actualmente algunas líneas de investigación de estas posibles aplicaciones ya se han empezado a abordar. Por ejemplo, las Dras. Santos y Ranalli, pertenecientes al grupo de investigación del CRELTEC, han comenzado a aplicar los valores de D y Z generados en este trabajo para la cepa LC42, para calcular numéricamente las unidades mínimas de pasteurización (PU) necesarias para eliminar *S. cerevisiae* var. *diastaticus* y validar los cálculos experimentalmente en fábrica (Ranalli et al., 2022).

Por otra parte, durante la tesis se realizó un *screening* de 5 cepas de *L. brevis* para evaluar su potencialidad como microorganismo probiótico. Para comprobar esta capacidad, se realizó un ensayo de supervivencia al tracto gastrointestinal en el Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA, Tucumán) y se concluyó que 2 de las 5 lograron

sobrevivir en gran número ($> 1 \times 10^4$ UFC/ mL) a la simulación del tracto digestivo (trabajo no publicado). Este es uno de los requisitos necesarios para que un microorganismo sea utilizado como probiótico. El primero y más importante es que sea un microorganismo GRAS (generalmente reconocido como seguro) y que confieran algún beneficio a la salud del huésped al modular el sistema inmunológico. Aunque existe abundante información acerca de los beneficios de *L. brevis* para la salud (Calumba et al., 2021; Fang et al., 2018; Jang et al., 2019; Lee et al., 2015; Maekawa & Hajishengallis, 2014) estos atributos son cepa dependiente y se necesitan estudios adicionales para validar su utilidad como probiótico.

Por otro lado, la Lic. Macarena Romero Rojas becaria de CONICET en el grupo CRELTEC está realizando una bioprospección de levaduras no convencionales para innovación en la industria cervecera, que incluirá cepas del género *Pichia* y *Torulaspota* del presente trabajo para su análisis.

Con respecto al último ítem de la tabla, la cepa PAC LC023 identificada genéticamente como *S. uvarum* que presentó el gen *Sta1*, se encuentra en etapa de secuenciación del genoma completo en colaboración con el Dr. Sampaio en Portugal, especialista en genómica de levaduras. Los resultados de este análisis podrían tener importantes implicancias en lo que respecta a la transmisión interespecífica del gen *Sta1*, ya que hasta la fecha no se ha informado acerca de la presencia de este gen en *Saccharomyces* de especie diferente a *S. cerevisiae*.

Es importante mencionar que los microorganismos de la colección generada en esta tesis, están disponibles para el ámbito académico para cualquier instituto u organismo público de investigación del país.

Por último, durante esta tesis se realizó un Programa de Apoyo a la Competitividad (proyecto PAC) financiado por el Ministerio de Producción de la Nación para asesorar a las fábricas de cerveza artesanal en temas de calidad. Durante las visitas a las fábricas, se brindaron asesorías técnicas donde se revisaron los protocolos de limpieza, se buscaron los puntos débiles del equipo, se instruyó al personal en la toma de muestras para realizar el test de mostos forzado para incorporarlo como análisis de rutina. Además, como parte del proyecto se armaron y equiparon laboratorios básicos de calidad (el equipamiento otorgado fue: microscopio, pHmetro, cámara de Neubauer, estufa de cultivo, densímetro, pipeta automática, material de vidrio y fungibles) para

cada una de las cervecerías participantes y se instruyó al personal en el recuento de levaduras, y en la utilización del medio HLP para detectar bacterias lácticas.

Conclusiones

- La evaluación de la calidad microbiológica de cervezas artesanales en las regiones estudiadas, evidenció una elevada proporción de cervezas contaminadas cercana al 50 %.
- Las contaminaciones secundarias (cervezas en botella) fueron casi 3 veces más frecuentes que las primarias (cervezas en fermentadores/ BBT).
- Se destaca la utilidad del medio de cultivo HLP para bacterias lácticas y medios con sulfato de cobre para la detección de levaduras salvajes.
- Las cervezas contaminadas y con bajo pH se asociaron con la presencia de bacterias en general y las cervezas contaminadas bajas con IBUs se asociaron con la presencia de bacterias lácticas.
- Las cervezas ácidas a nivel sensorial, se encontraron contaminadas con bacterias ácido lácticas en un 86,6 %, mientras que los *off-flavors* como dimetil sulfuro (detectado como aroma a choclo), diacetilo (aroma a manteca) y sulfuros (aroma a huevo y compuestos sulfurados) se encontraron en cervezas contaminadas con levaduras.
- Las bacterias lácticas predominan en las contaminaciones bacterianas y las levaduras salvajes del género *Saccharomyces* en las contaminaciones causadas por levaduras.
- *L. brevis* fue la especie de bacteria más frecuente en los eventos de contaminación, mientras que *Saccharomyces cerevisiae* fue la especie de levadura más encontrada en las cervezas contaminadas.
- Las levaduras contaminantes del género *Saccharomyces* presentaron alta diversidad genética incluso en cepas una misma cervecería, lo cual sugiere distintos eventos de contaminación.
- Fue posible detectar los mismos patrones genéticos de *Saccharomyces cerevisiae* en cepas aisladas de una misma cervecería y esto podría deberse a contaminaciones cruzadas entre lotes.

- Se encontraron cepas *Saccharomyces cerevisiae* genéticamente iguales en diferentes cervecerías, lo cual habla de interacciones entre productores o utilización de las mismas materias primas.
- El 66 % de las levaduras *Saccharomyces* aisladas contienen el gen *Sta1* y se identificaron como *S. cerevisiae* var. *diastatucus*, de las cuales 52,4 % presentaron la capacidad de consumir más de la mitad del almidón disponible en el medio, demostrando su capacidad diastática.
- La mayoría de las levaduras contaminantes del género *Saccharomyces* (84 %) fueron capaces de producir fenoles, demostrando potencialidad de generar defectos sensoriales en la cerveza
- El 81 % de las levaduras *Saccharomyces* aisladas fueron capaces de esporular, y esta capacidad varió entre 1,9 y 46,5 %.
- El test de mosto forzado detectó ineficiencias en la limpieza y sanitización en el 40 % de las muestras tomadas de fermentadores y el 63 % de los casos positivos, evidenció el crecimiento microbiano a las 48hs de incubación, lo cual denota problemas graves que podrían terminar en cervezas contaminadas.
- Las 4 cepas diastáticas de *S. cerevisiae* estudiadas fueron termorresistentes y se obtuvieron por primera vez, para una levadura *S. cerevisiae* var. *diastatucus* de origen argentino, los parámetros de D y Z que representan un insumo clave para estudios enfocados en la optimización del proceso de pasteurización.

Bibliografía

- Abbet, M. (2019). Understanding the emerging beer spoilage yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*. Department of Biology and Biological Engineering. Chalmers University of Technology. PhD thesis.
- Adam, A. C., Latorre-García, L., & Polaina, J. (2004). Structural analysis of glucoamylase encoded by the *STA1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* (var. *diastaticus*). *Yeast*, 5;21(5):379-88. <https://doi.org/10.1002/yea.1102>. PMID: 15116339.
- Adams, M. R., Moss, M. O., & McClure, P. J. (2016). *Food microbiology*. 546 p. ISBN: 978-1-84973-960-3
- Albertin, W., Chassériaud, L., Comte, G., Panfili, A., Delcamp, A., Salin, F., Marullo, P., & Bely, M. (2014). Winemaking and bioprocesses strongly shaped the genetic diversity of the ubiquitous yeast *Torulaspora delbrueckii*. *PLoS ONE*, 9(4), e94246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094246>
- Asano, S., Suzuki, K., Iijima, K., Motoyama, Y., Kuriyama, H., & Kitagawa, Y. (2007). Effects of morphological changes in beer-spoilage lactic acid bacteria on membrane filtration in breweries. *Journal of bioscience and bioengineering*, 4(104), 334-338. <https://doi.org/DOI:10.1263/jbb.104.334>
- ASBC. (2011a). Microbiological control-1. Aseptic Sampling. En *Methods of Analysis* (14.^a ed.). *American Society of Brewing Chemists*. <https://doi.org/10.1094/ASBCMOA-MicrobiologicalControlIntro>
- ASBC. (2011b). Microbiological control-5. Differential culture media. En *Methods of Analysis* (14.^a ed.). *American Society of Brewing Chemists*. <https://doi.org/10.1094/ASBCMOA-MicrobiologicalControl-5>
- ASBC. (2011c). Beer-9. Hydrogen ion concentration. En *Method of analysis*(14.^a ed.). *American Society of Brewing Chemists*. <https://doi.org/10.1094/ASBCMOA-Beer-9>
- ASBC. (2011d). Beer-23. Beer Bitterness. En *ASBC Methods of Analysis* (14.^a ed.). *American Society of Brewing Chemists*. <https://doi.org/10.1094/ASBCMOA-Beer-23>
- ASBC. (2011e). Beer-10. Color. En *Methods of Analysis* (14.^a ed.). *American Society of Brewing Chemists*. doi: <https://10.1094/ASBCMOA-Beer-10>
- ASBC. (2011f). Sensory analysis: flavor database. En *Method of analysis*. *American Society of Brewing Chemists*. www.asbcnet.org. <https://www.asbcnet.org/Methods/SensoryAnalysis/Pages/default.aspx>

- Azzolini, M., Fedrizzi, B., Tosi, E., Finato, F., Vagnoli, P., Scrinzi, C., & Zapparoli, G. (2012). Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. *European Food Research and Technology*, 235(2), 303-313. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1762-3>
- Back, W. (2005). *Atlas and Handbook of Beverage Biology*. Hans Carl Verlag. Nürnberg, Alemania 10-112.
- Balogh, I., & Maráz, A. (1996). Presence of STA gene sequences in brewer's yeast genome. *Letters in Applied Microbiology*, 22(6), 400-404. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1996.tb01189.x>
- Bamforth, C y Lentini, A. (2008). *Beer: A quality perspective* (1st ed.). Academic Press. USA, 304. ISBN: 9780126692013
- Bamforth, C. (2011). 125th Anniversary Review: The non-biological instability of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(4). <https://doi.org/10.1002/j.2050-416.2011.tb00496.x>
- Basso, R. F., Alcarde, A. R., & Portugal, C. B. (2016). Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations? *Food Research International*, 86, 112-120. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.002>
- Beer Judge Certification Program. BJCP, (2015). *Beer Style Guidelines*. Gordon Strong y Kristen England. www.bjcp.org. <https://www.bjcp.org/bjcp-style-guidelines/>
- Beer Judge Certification Program, & The American Homebrewing Association. (2012). Beer fault list. www.bjcp.org. https://legacy.bjcp.org/docs/Beer_faults.pdf
- Begrow, W. (2017). Fighting quality threats: Notable microbiological contaminations of craft beer in the United States. *Brewing and Beverage Industry International*, 10-13.
- Behr, J. (2008). Mechanisms of hop inhibition, tolerance and adaptation in *Lactobacillus brevis*. Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt. Technische Universität München. PhD thesis
- Beltran, G., Torija, M., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamon, J., Rozès, N., & Mas, A. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six-year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology*, 25, 287-293.
- Bellut, K., Michel, M., Zarnkow, M., Hutzler, M., Jacob, F., De Schutter, D., Daenen, L., Lynch, K., Zannini, E., & Arendt, E. (2018). Application of Non-*Saccharomyces* Yeasts Isolated from Kombucha in the Production of Alcohol-Free Beer. *Fermentation*, 4(3), 66. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030066>

- Bernstein, J. (2017). Discover Second Runnings, Small Beers with Big Flavors. www.winemag.com. <https://www.winemag.com/2017/01/19/discover-second-runnings-small-beers-with-big-flavors/>
- Blättel, V., Petri, A., Rabenstein, A., Kuever, J., & König, H. (2013). Differentiation of species of the genus *Saccharomyces* using biomolecular fingerprinting methods. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(10), 4597-4606. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4823-z>
- Bohak, I., Thelen, K., & Beimfohr, C. (2006). Description of *Lactobacillus backi* sp. Nov., an obligate beer-spoiling bacterium. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, *60*, 78-82.
- Boontham W, Angchuan J, Boonmak C, Srisuk N.(2021). *Limtongozyma siamensis* gen. nov., sp. nov., a yeast species in the Saccharomycetales and reassignment of *Candida cylindracea* to the genus *Limtongozyma*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020 Jan;*70*(1):199-203. doi: 10.1099/ijsem.0.003735.
- Bokulich, N. A., Bergsveinson, J., Ziola, B., & Mills, D. A. (2015). Mapping microbial ecosystems and spoilage-gene flow in breweries highlights patterns of contamination and resistance. *ELife*, *4*, e04634. <https://doi.org/10.7554/eLife.04634>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *29*(8), 601-608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Boulton, C., & Quain, D. (2001). *Brewing yeast and fermentation* (1st. ed). Blackwell Science. USA, 159.
- Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Vancanneyt, M., Swings, J., & Coutinho, T. (2008). Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Systematic and Applied Microbiology*, *31*(6-8), 447-460. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.09.004>
- Brandl, A. (2006). Entwicklung und Optimierung von PCR-Methoden zur Detektion und Identifizierung von brauereirelevanten Mikroorganismen zur Routine-Anwendung in Brauereien. *119–133*.
- Brewing Science Institute (2021). *Brewers' Laboratory Handbook: brewing without the blindfold™*.1-19. <https://brewingscience.com/brewers-lab-handbook/>
- Briggs, D., Boulton, C., Brookes, P., & Stevens, R. (2004). *Brewing: Science and Practice*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203024195>
- Brown, C. A., Murray, A. W., & Verstrepen, K. J. (2010). Rapid Expansion and Functional Divergence of Subtelomeric Gene Families in Yeasts. *Current Biology*, *20*(10), 895-903. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.04.027>

- Bruker Daltonik GmbH. (2016). *MBT Compass User Manual*. www.bruker.com/care
- Büchl, N. R., Hutzler, M., Mietke-Hofmann, H., Wenning, M., & Scherer, S. (2010). Differentiation of probiotic and environmental *Saccharomyces cerevisiae* strains in animal feed. *Journal of Applied Microbiology*, 109(3), 783-791. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04705.x>
- Büchl, N. R., Wenning, M., Seiler, H., Mietke-Hofmann, H., & Scherer, S. (2008). Reliable identification of closely related *Issatchenkia* and *Pichia* species using artificial neural network analysis of Fourier-transform infrared spectra. *Yeast*, 25(11), 787-798. <https://doi.org/10.1002/yea.1633>
- Burini, J. A., Eizaguirre, J. I., Loviso, C., & Libkind, D. (2021). Levaduras no convencionales como herramientas de innovación y diferenciación en la producción de cerveza. *Revista Argentina de Microbiología*. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.01.003>
- Burns, L. T., Sislak, C. D., Gibbon, N. L., Saylor, N. R., Seymour, M. R., Shaner, L. M., & Gibney, P. A. (2021). Improved Functional Assays and Risk Assessment for *STA1+* Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 79(2), 167-180. <https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1796175>
- Buzrul, S., Alpas, H., & Bozoglu, F. (2005). Effect of high hydrostatic pressure on quality parameters of lager beer. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(10), 1672-1676. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2166>
- Calumba, K. F., Reyes, V., Bonilla, F., Villasmil, E., & Sathivel, S. (2021). Ale beer containing free and immobilized *Lactobacillus brevis*, a potential delivery system for probiotics. *Food Production, Processing and Nutrition*, 3(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s43014-021-00051-3>
- Canonica, L., Comitini, F., & Ciani, M. (2017). *Torulasporea delbrueckii* contribution in mixed brewing fermentations with different *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 259, 7-13. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.017>
- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., & Romano, P. (2018). Conventional and Non-Conventional Yeasts in Beer Production. *Fermentation*, 4(2), 38. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020038>
- Cendón Fernández, A. (2018). Estudio de la estabilidad de las cervezas artesanales de “les clandestines de montferri”: Análisis fisicoquímico, microbiológico y sensorial. Universitat Rovira i Virgili (URV). Master tesis. <http://hdl.handle.net/20.500.11797/TFM328>

- Cleenwerck, I., De Vos, P., & De Vuyst, L. (2010). Phylogeny and differentiation of species of the genus *Gluconacetobacter* and related taxa based on multilocus sequence analyses of housekeeping genes and reclassification of *Acetobacter xylinus* subsp. *Sucrofermentans* as *Gluconacetobacter sucrofermentans* (Toyosaki et al. 1996) sp. Nov., comb. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(10), 2277-2283. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.018465-0>
- Codex Alimentarius, Los Principios Generales de Higiene de los Alimentos. CAC/RCP 1-1969. 1969. Revisión 2020.
- Código Alimentario Argentino. (CAA). 2014
- Coghe, S., Benoot, K., Delvaux, F., Vanderhaegen, B., & Delvaux, F. R. (2004). Ferulic Acid Release and 4-Vinylguaiacol formation during brewing and fermentation: Indications for feruloyl esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(3), 602-608. <https://doi.org/10.1021/jf0346556>
- Colino, E., Civitaresi, H. M., Capuano, A., Quiroga, J. M., & Winkelman, B. (2017). *Análisis de la estructura y dinámica del complejo cervecero artesanal de Bariloche, Argentina*. 20, 14.
- Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999). Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, pp: 1318 1322.
- Cui, Y., Wang, A., Zhang, Z., & Speers, R. Alex. (2015). Enhancing the levels of 4-vinylguaiacol and 4-vinylphenol in pilot-scale top-fermented wheat beers by response surface methodology: Enhancing the levels of 4VG and 4VG in top-fermented wheat beers by RSM. *Journal of the Institute of Brewing*, 121(1), 129-136. <https://doi.org/10.1002/jib.189>
- Culver, C. A., & Wrolstad, R. E. (2008). *Color Quality of Fresh and Processed Foods*. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2008-0983>
- Dalgliesh, C. (1977). Flavour stability. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*, 623-659.
- D'Amore, T., & Stewart, G. G. (1987). Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, 9(6), 322–330. doi:10.1016/0141-0229(87)90053-6
- Davies, S., Sykes, T., Philips, M., & Hancock, J. (2015). Hygienic design and Cleaning-In-Place (CIP) systems in breweries. En *Brewing Microbiology*. Elsevier 221-239. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00010-1>
- Deák, T. (2008). *Handbook of food spoilage yeast* (2.^a ed.). CRC Press. Boca Raton, 352. ISBN 9781420044935

- Delvaux, F., Delvaux, F. R., & Delcour, J. A. (2000). Characterisation of the Colloidal Haze in Commercial and Pilot Scale Belgian White Beers. *Journal of the Institute of Brewing*, 106(4), 221-228. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2000.tb00061.x>
- Deng, Y., Zhao, J., Li, H., Xu, Z., Liu, J., Tu, J., & Xiong, T. (2016). Detection of culturable and viable but non-culturable cells of beer spoilage lactic acid bacteria by combined use of propidium monoazide and *horA* -specific polymerase chain reaction: *HorA* PMA-PCR for detection the LAB. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(1), 29-33. <https://doi.org/10.1002/jib.289>
- Donlan R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9), pp: 881-890.
- Duhourq, I., Eizaguirre, J. I., Bruzone, C., & Aguilar, P. (2021). Incidencia de microorganismos contaminantes en cervezas artesanales de la ciudad autónoma de buenos aires y gran buenos aires. International Workshop on Brewing Yeast. Bariloche, Argentina.
- Dysvik, A., La Rosa, S. L., Buffetto, F., Liland, K. H., Myhrer, K. S., Rukke, E.-O., Wicklund, T., & Westereng, B. (2020). Secondary Lactic Acid Bacteria Fermentation with Wood-Derived Xylooligosaccharides as a Tool To Expedite Sour Beer Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(1), 301-314. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05459>
- Dysvik, A., La Rosa, S. L., Liland, K. H., Myhrer, K. S., Østlie, H. M., De Rouck, G., Rukke, E.-O., Westereng, B., & Wicklund, T. (2020). Co-fermentation Involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* species tolerant to brewing-related stress factors for controlled and rapid production of sour beer. *Frontiers in Microbiology*, 11, 279. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00279>
- EBC Technology and Engineering Forum (1995). *Beer Pasteurisation: Manual of Good Practice*. Getränke-Fachverlag Hans Carl. Nürnberg.
- Esteve-Zarzoso, B., Peris-Torán, M. J., García-Maiquez, E., Uruburu, F., & Querol, A. (2001). Yeast Population Dynamics during the Fermentation and Biological Aging of Sherry Wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2056-2061. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.5.2056-2061.2001>
- Fang, F., Xu, J., Li, Q., Xia, X., & Du, G. (2018). Characterization of a *Lactobacillus brevis* strain with potential oral probiotic properties. *BMC Microbiology*, 18(1), 221. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1369-3>
- FAO. (2007). Fortalecimiento de los sistemas nacionales de control de los alimentos: Directrices para evaluar las necesidades de fortalecimiento de la capacidad. www.fao.org. <https://www.fao.org/documents/card/en/c/1d2b075b-6e4e-5168-8899-082f4762ff29/>

- Fell, J. W., & Blatt, G. M. (1999). Separation of strains of the yeasts *Xanthophyllomyces dendrorhous* and *Phaffia rhodozyma* based on rDNA IGS and ITS sequence analysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23(1), 677-681. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900681>
- Fernández-González, M., Úbeda, J. F., & Briones, A. I. (2015). Study of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains for breeding through fermentation efficiency and tetrad analysis. *Current Microbiology*, 70(3), 441-449. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0741-2>
- Fraunhofer, M. E., Geissler, A. J., Jakob, F., & Vogel, R. F. (2017). Multiple genome sequences of exopolysaccharide-producing, brewery-associated *Lactobacillus brevis* strains. *Genome Announcements*, 5(26). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00585-17>
- Gallone, B., Steensels, J., Prah, T., Soriaga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Merlevede, A., Roncoroni, M., Voordeckers, K., Miraglia, L., Teiling, C., Steffy, B., Taylor, M., Schwartz, A., Richardson, T., White, C., Baele, G., Maere, S., & Verstrepen, K. J. (2016). Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. *Cell*, 166(6), 1397-1410.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.020>
- García García, J. (2012). Detección molecular de *Lactobacillus spp.*, *Pediococcus spp.*, *Pectinatus spp.* y *Megasphaera spp.* En el proceso de elaboración de la cerveza. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. Instituto de Biotecnología. PhD tesis
- García López, M. (2020). Contaminant microbiota in craft beers. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(6), 1181-1186. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.9.6.1181-1186>
- Gibson, B., Geertman, J.-M. A., Hittinger, C. T., Krogerus, K., Libkind, D., Louis, E. J., Magalhães, F., & Sampaio, J. P. (2017). New yeasts—new brews: Modern approaches to brewing yeast design and development. *Yeast Research*, 17(4). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox038>
- Giovenzana, V., Beghi, R., & Guidetti, R. (2014). Rapid evaluation of craft beer quality during fermentation process by vis/NIR spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 142, 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.06.017>
- Goldenberg, O., Herrmann, S., Adam, T., Marjoram, G., Hong, G., Göbel, U. B., & Graf, B. (2005). Use of Denaturing High-Performance Liquid Chromatography for Rapid Detection and Identification of Seven *Candida* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), 5912-5915. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.12.5912-5915.2005>

- Gómez, S., Milena García, S., de Bedout, C., & María García, A. (2011). Análisis del perfil proteico de aislamientos clínicos de *Candida guilliermondii* sensibles y resistentes al fluconazol. *Infectio*, 15(1), 20-24. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(11\)70072-8](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70072-8)
- Gonçalves, M., Pontes, A., Almeida, P., Barbosa, R., Serra, M., Libkind, D., Hutzler, M., Gonçalves, P., & Sampaio, J. P. (2016). Distinct domestication trajectories in top-fermenting beer yeasts and wine yeasts. *Current Biology*, 26(20), 2750-2761. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.040>
- Green, S., & Gray, P. (1950). A differential procedure applicable to bacteriological investigation in brewing. *Wallerstein Laboratories Communications*, 13, 157-366.
- Haikara, A., & Helander, I. (2006). *Pectinatus*, *Megasphaera* and *Zymophilus*. *Prokaryotes*, 4, 965-981. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_32
- Hill, A. E. (2015). Traditional methods of detection and identification of brewery spoilage organisms. En *Brewing Microbiology* (pp. 271-286). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00013-7>
- Hofmann, R., & Fischer, J. (2015). Beer packaging. En *Brewing Microbiology* (pp. 319-334). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00015-0>
- Hong, L. S., Kim, J. H., & Kim, W. J. (2020). Rapid detection of beer-spoilage lactic acid bacteria: Modified hop-gradient agar with ethanol method. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 296-303. <https://doi.org/10.9721/KJFST.2020.52.3.296>
- Hornsey, I. (2003). *A history of beer and brewing*. The Royal Society of Chemistry, RSC Paperbacks. USA, 762p ISBN: 0854046305
- Hostinová, E., & Gašperík, J. (2010). Yeast glucoamylases: Molecular-genetic and structural characterization. *Biologia*, 65(4), 559-568. <https://doi.org/10.2478/s11756-010-0077-8>
- Hutzler, M. (2009). Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Identifizierung und Differenzierung von getränkerelevanten Hefen. Technische Universität München. PhD Thesis.
- Hutzler, M., Geiger, E., & Jacob, F. (2010). Use of PCR-DHPLC (Polymerase Chain Reaction-Denaturing High Performance Liquid Chromatography) for the rapid differentiation of industrial *Saccharomyces pastorianus* and *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(4), 464-474. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00798.x>
- Hutzler, M., Koob, J., Schneiderbanger, H., Mueller-Auffermann, K., & Jacob, F. (2015). Yeast identification and characterization. En *Brewing Microbiology Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste* (1 st ed.) Hill, A., Woodhead Publishing. pp. 65-104.

- Hutzler, M., Riedl, R., Koob, J., & Jacob, F. (2012). Fermentation and spoilage yeasts and their relevance for the beverage industry - A review. *BrewingScience*. 65. 33-52.
- Hutzler, M., Zarnkow, M., & Hans, S. (2020). *New yeasts—New beers*. 3, 16-23.
- Ingram, L.O. (1990) Ethanol tolerance in bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*. 9, 305–319
- Ingram, L.O. & Buttke, T.M. (1984) Effects of alcohols on micro-organisms. *Advances in Microbial Physiology*. 25, 253–300
- Jang, H. J., Lee, N.-K., & Paik, H.-D. (2019). Probiotic characterization of *Lactobacillus brevis* KU15153 showing antimicrobial and antioxidant effect isolated from kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 28(5), 1521-1528. <https://doi.org/10.1007/s10068-019-00576-x>
- Jespersen, L., & Jakobsen, M. (1996). Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 139-155. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01154-3](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01154-3)
- Jespersen, L., van der Aa Kühle, A., & Petersen, K. M. (2000). Phenotypic and genetic diversity of *Saccharomyces* contaminants isolated from lager breweries and their phylogenetic relationship with brewing yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 60(1), 43-53. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00326-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00326-3)
- Josepa, S., Guillamon, J. M., & Cano, J. (2000). PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus* / *Saccharomyces pastorianus* using specific primers. *FEMS Microbiology Letters*, 193(2), 255-259. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09433.x>
- Juvonen, R. (2015). Strictly anaerobic beer-spoilage bacteria. En *Brewing Microbiology* (pp. 195-218). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00009-5>
- Juvonen, R., Koivula, T., & Haikara, A. (2008). Group-specific PCR-RFLP and real-time PCR methods for detection and tentative discrimination of strictly anaerobic beer-spoilage bacteria of the class Clostridia. *International Journal of Food Microbiology*, 125(2), 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.042>
- Kaderian, S. M. (2018). Lo artesanal como mediación técnica y simbólica. Cultura, identidad local y aprendizaje en la cerveza artesanal de Bariloche, Argentina. *RIVAR* 5. 39-63.
- Kamimura, M., & Kaneda, H. (1992). Off-flavors in beer. En *Developments in Food Science* (Vol. 28, pp. 433-472). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-88558-6.50023-4>
- Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*, 1(3), 1-13.
- Kilonzo, P. M., Margaritis, A., Yu, J., & Ye, Q. (2007). Bioethanol production from starchy biomass by direct fermentation using *Saccharomyces diastaticus* in batch free and immobilized

- cell systems. *International Journal of Green Energy*, 4(1), 1-14.
<https://doi.org/10.1080/15435070601015379>
- King, A., & Richard Dickinson, J. (2000). Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspota delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, 16(6), 499-506. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(200004\)16:6<499::AID-YEA548>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(200004)16:6<499::AID-YEA548>3.0.CO;2-E)
- Kobi, D., Zugmeyer, S., Potier, S., & Jaquetgutfreund, L. (2004). Two-dimensional protein map of an ale-brewing yeast strain: Proteome dynamics during fermentation. *FEMS Yeast Research*, 5(3), 213-230. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.07.004>
- Kolbert, C., & Persing, D. (1999). Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, 2(4). [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80052-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80052-6)
- Krogerus, K., & Gibson, B. (2020). A re-evaluation of diastatic *Saccharomyces cerevisiae* strains and their role in brewing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(9), 3745-3756. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10531-0>
- Krogerus, K., Magalhães, F., Kuivanen, J., & Gibson, B. (2019). A deletion in the *STA1* promoter determines maltotriose and starch utilization in *STA1+* *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(18), 7597-7615. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10021-y>
- Kubizniaková, P., Kopecká, J., & Matoulková, D. (2014). Wild yeasts and methods for their detection—Part II. *Kvasny Prumysl*, 60(4), 78-87. <https://doi.org/10.18832/kp2014008>
- Kurtzman, C. P., Robnett, C. J., & Blackwell, M. (2016). Description of *Teunomyces* gen. nov. for the *Candida kruisii* clade, *Suhomyces* gen. nov. for the *Candida tanzawaensis* clade and *Suhomyces kilbournensis* sp. nov. *FEMS yeast research*, 16(5), fow041. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow041>
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). *The Yeast: A taxonomic study* (5th Ed). Elsevier. ISBN: 9780080931272
- Latorre, M. (2016). Incidencia de contaminantes microbianos en cervezas artesanales embotelladas de la Patagonia Andina. Universidad Nacional del Comahue. Tesis de grado.
- Lauterbach, A., Usbeck, J. C., Behr, J., & Vogel, R. F. (2017). MALDI-TOF MS typing enables the classification of brewing yeasts of the genus *Saccharomyces* to major beer styles. *PLOS ONE*, 12(8), e0181694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181694>
- Lee, J.-K., Kim, S.-J., Ko, S.-H., Ouwehand, A., & Ma, D. (2015). Modulation of the host response by probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 in experimental gingivitis. *Oral Diseases*, 21(6), 705-712. <https://doi.org/10.1111/odi.12332>

- Lehnhardt, F., Gastl, M., & Becker, T. (2019). Forced into aging: Analytical prediction of the flavor-stability of lager beer. A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(16), 2642-2653. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1462761>
- Li, Q., Wang, J., & Liu, C. (2017). Beers. En *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 305-351). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63666-9.00012-1>
- Libkind D., Brizzio S., Ruffini A., Gadanho M., van Broock M. y Sampaio J.P. (2003). Molecular characterization of carotenogenic yeasts from aquatic environments in Patagonia, Argentina. *Antonie van Leeuwenhoek*. 84 313–322.
- Libkind, D., Ruffini, A., van Broock, M., Alves, L., & Sampaio, J. P. (2007). Biogeography, host specificity, and molecular phylogeny of the basidiomycetous yeast *Phaffia rhodozyma* and its sexual form, *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4), 1120-1125. <https://doi.org/10.1128/AEM.01432-06>
- Lin, Y. (1981). Formulation and testing of cupric sulphate medium for wild yeast detection. *Journal of the Institute of Brewing*, 87, 151-154.
- Liu, S., & Qureshi, N. (2009). How microbes tolerate ethanol and butanol. *New Biotechnology*, 26(3-4), 117-121. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.06.984>
- Lugones, G., Britto, F., Carro, A., Lugones, M., Quiroga, J., Reinoso, L., Monasterios, C., & Serovic, L. B. (2019). *Asociación ciencia-empresa para la "domesticación" de la levadura andina y la introducción de mejoras en la producción de cerveza* (1a ed). Buenos aires, 65.
- Maekawa, T., & Hajishengallis, G. (2014). Topical treatment with probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 inhibits experimental periodontal inflammation and bone loss. *Journal of Periodontal Research*, 49(6), 785-791. <https://doi.org/10.1111/jre.12164>
- Mansilla, E. C., Moreno, R. C., & García, M. O. (2019). Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en Microbiología Clínica. En *Procedimiento de Microbiología Clínica: Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (p. 72).
- Manzano, M., Giusto, C., Bartolomeoli, I., Buiatti, S., & Comi, G. (2005). Microbiological analyses of dry and slurry yeasts for brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 111(2), 203-208. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2005.tb00667.x>
- Manzano, M., Iacumin, L., Vendrames, M., Cecchini, F., Comi, G., & Buiatti, S. (2011). Craft beer microflora identification before and after a cleaning process. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(3), 343-351. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00478.x>

- Marín-Navarro, J., Gurgu, L., Alamar, S., & Polaina, J. (2011). Structural and functional analysis of hybrid enzymes generated by domain shuffling between *Saccharomyces cerevisiae* (var. *diastaticus*) *Sta1* glucoamylase and *Saccharomycopsis fibuligera* Bgl1 β -glucosidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(1), 121-130. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2845-3>
- Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., De Vos, P., Gillis, M., & Willems, A. (2007). Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(3), 489-503. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64344-0>
- Martin, P. A., & Moll, M. (1984). EBC analytica microbiologica: PART III. *Journal of the Institute of Brewing*, 90(4), 272-276. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1984.tb04272.x>
- Matoulková, D., Kopecká, J., & Kubizniaková, P. (2013). Brewing microbiology—Wild yeasts and methods of their detection. *Kvasny Prumysl*, 59(9), 246-257. <https://doi.org/10.18832/kp2013025>
- Medina de Salcedo, Z., Sulbaran de Ferrer, B., Ferrer Ocando, A., & Ojeda de Rodriguez, G. (2001). Resistencia térmica de levaduras en jugo de naranja a diferentes concentraciones de sólidos solubles. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 51, 167-172.
- Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Michel, M., & Hutzler, M. (2017). Incidence of *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* in the beverage industry: cases of contamination, 2008–2017. *Master Brewers Association of the Americas*, 54(4), 140-148.
- Meier-Dörnberg, T., Kory, O. I., Jacob, F., Michel, M., & Hutzler, M. (2018). *Saccharomyces cerevisiae* variety *diastaticus* friend or foe?—Spoilage potential and brewing ability of different *Saccharomyces cerevisiae* variety *diastaticus* yeast isolates by genetic, phenotypic and physiological characterization. *FEMS Yeast Research*, 18(4). <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy023>
- Menz, G., Aldred, P., & Vriesekoop, F. (2011). Growth and Survival of Foodborne Pathogens in Beer. *Journal of Food Protection*, 74(10), 1670-1675. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-546>
- Menz, G., Andrighetto, C., Lombardi, A., Corich, V., Aldred, P., & Vriesekoop, F. (2010). Isolation, identification, and characterisation of beer-spoilage lactic acid bacteria from microbrewed beer from Victoria, Australia. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(1), 14-22. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00393.x>
- Mazieres, J (2004). *Gestión de la Calidad en el diseño, control, verificación y validación de la higiene en la industria de los alimentos*. Pontifica Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Master tesis

- Milani, E. A., Gardner, R. C., & Silva, F. V. M. (2015). Thermal resistance of *Saccharomyces* yeast ascospores in beers. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.002>
- Moretti, E. (2013). *Development of guidelines for microbiological control in microbrewery*. University of Perugia. PhD thesis
- Mukai, N., Masaki, K., Fujii, T., & Iefuji, H. (2014). Single nucleotide polymorphisms of PAD1 and FDC1 show a positive relationship with ferulic acid decarboxylation ability among industrial yeasts used in alcoholic beverage production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(1), 50-55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.12.017>
- Nediani, M., García, L., Saavedra, L., Martínez, S., López Alzogaray, S., & Fadda, S. (2017). Adding value to goat meat: biochemical and technological characterization of autochthonous lactic acid bacteria to achieve high-quality fermented sausages. *Microorganisms*, 5(2), 26. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020026>
- Oliver, G., & Colocchio. (2012). *The Oxford companion to beer*. Oxford University Press. USA,
- Palmer, J. (2006). *How to Brew. Everything you need to know to brew beer right the first time* (3.^a ed.). Brewers Pubn. USA, 500p
- Palmer, J., & Kaminski, K. (2013). *Water: A comprehensive guide for brewers*. Brewers Publications. USA, 300p
- Paradh, A. (2015). Gram-negative spoilage bacteria in brewing. En *Brewing Microbiology* (1.^a ed., pp. 175-194). Woodhead Publishing.. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00008-3>
- Paradh, A., & Hill, A. (2016). Review: Gram Negative Bacteria in Brewing. *Advances in Microbiology*, 06(03), 195-209. <https://doi.org/10.4236/aim.2016.63020>
- Parra Huertas, R. (2010). Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8 (1).
- Pasteur, L. (1857). Mémoire sur la fermentation appelée lactique. Mémoire sur la fermentation alcoolique. *Mallet-Bachelier*.
- Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Gibbs, D. L., Newell, V. A., Ellis, D., Tullio, V., Rodloff, A., Fu, W., & Ling, T. A. (2010). Results from the artemis disk global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by standardized disk diffusion. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1366-1377. <https://doi.org/10.1128/JCM.02117-09>
- Pittet, V., Morrow, K., & 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. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2011-0124-01>

- Powell, C., & Kerruish, D. (2017). Beer-spoiling yeasts: genomics, detection, and control. En *Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology* (pp. 289-328.). Caister Academic Press.
- Priest, F. G. (2006). Microbiology and Microbiological Control in the Brewery. En *Handbook of brewing* (2nd ed., pp. 607-619). CRC Press.
- Priest, F. G., & Campbell, I. (Eds.). (2003). *Brewing Microbiology*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9250-5>
- Put, H., & de Jong, J. (1980). The heat resistance of selected yeasts causing spoilage of canned soft drinks and fruit products. En *Biology and Activities of Yeasts*. (pp. 181-223). Academic Press.
- Quain, D., & Storgårds, E. (2009). The extraordinary world of biofilms. *Brewer & Distiller International*, 31-33.
- R Core Team. (2013). *R: A language and environment for statistical computing*. <http://www.R-project.org/>.
- Rachon, G., Raleigh, C. P., & Pawlowsky, K. (2021). Heat resistance of yeast ascospores and their utilisation for the validation of pasteurisation processes for beers. *Journal of the Institute of Brewing*, 127(2), 149-159. <https://doi.org/10.1002/jib.646>
- Rachon, G., Rice, C. J., Pawlowsky, K., & Raleigh, C. P. (2018). Challenging the assumptions around the pasteurisation requirements of beer spoilage bacteria: Challenging the assumptions around the pasteurisation requirements of beer spoilage bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(4), 443-449. <https://doi.org/10.1002/jib.520>
- Ranalli, N., Latorre, M., Ducos, M., Libkind, D., & Santos, V. (2022). Parámetros de letalidad microbiana aplicados al proceso de pasteurización de cerveza artesanal, del laboratorio a la fábrica. 1er Congreso Colombiano de Micología - VII Jornadas sudamericanas de biología y biotecnología de levaduras, Bogotá, Colombia.
- Ravasio, D., Carlin, S., Boekhout, T., Groenewald, M., Vrhovsek, U., Walther, A., & Wendland, J. (2018). Adding flavor to beverages with non-conventional yeasts. *Fermentation*, 4(1), 15. <https://doi.org/10.3390/fermentation4010015>
- Rees, R. (2014). 10 Barrel recalls Swill; Bend brewery cooking up a secret replacement beer, partner says. *The Bulletin*. <http://www.bendbulletin.com/business/2282468-151/10-barrel-recalls-swill>.
- Reveron, I. M., Barreiro, J. A., & Sandoval, A. J. (2003). Thermal resistance of *Saccharomyces cerevisiae* in Pilsen beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 109(2), 120-123. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2003.tb00140.x>
- García López, M. (2020).

- Contaminant microbiota in craft beers. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(6), 1181-1186. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.9.6.1181-1186>
- Rodríguez-Saavedra, M., González de Llano, D., & Moreno-Arribas, M. V. (2020). Beer spoilage lactic acid bacteria from craft brewery microbiota: Microbiological quality and food safety. *Food Research International*, 138, 109762. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109762>
- Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2000). Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6), 1981-1987. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-6-1981>
- Sakamoto, K., & Konings, W. N. (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*, 89(2-3), 105-124. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00153-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00153-3)
- Salinas, F., Garrido, D., Ganga, A., Veliz, G., & Martínez, C. (2009). Taqman real-time PCR for the detection and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* in wine. *Food Microbiology*, 26(3), 328-332. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.12.001>
- Sampaio, J. P., Pontes, A., Libkind, D., & Hutzler, M. (2017). Taxonomy, diversity, and typing of brewing yeasts. En *Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology* (Bokulich and Bamforth, pp. 85-118).
- Sannino C, Mezzasoma A, Buzzini P, Turchetti B. Non-conventional Yeasts for Producing Alternative Beers. En: Sibirny A, editor. Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application. Switzerland AG: Springer Nature; 2019. p.361---88.
- Satora, P., Tarko, T., Sroka, P., & Blaszczyk, U. (2014). The influence of *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast on the fermentation and chemical composition of apple wines. *FEMS Yeast Research*, 14(5), 729-740. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12159>
- Schlöter, M., Aßmus, B., & Hartmann, A. (1995). The use of immunological methods to detect and identify bacteria in the environment. *Biotechnology Advances*, 13(1), 75-90. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(94\)00023-6](https://doi.org/10.1016/0734-9750(94)00023-6)
- Schneiderbanger, J. (2019). Occurrence, detection, characterization and description of selected beer-spoilage lactic acid bacteria. Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität. Technische Universität München. PhD T hesis <http://mediatum.ub.tum.de/doc/1483912/document.pdf>
- Schneiderbanger, J., Grammer, M., Jacob, F., & Hutzler, M. (2018). Statistical evaluation of beer spoilage bacteria by real-time PCR analyses from 2010 to 2016. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(2), 173-181. <https://doi.org/10.1002/jib.486>

- Schneiderbanger, J., Jacob, F., & Hutzler, M. (2020). Mini-Review: The current role of lactic acid bacteria in beer spoilage. *BrewingScience*, Volume 73, 01-05. <https://doi.org/10.23763/BrSc19-28schneiderbanger>
- Seidell, S. (2013). *The Wide World of Beer*. <https://seidell.wordpress.com/infographic-gallery/>
- Sipiczki, M. T. S., Csoma, H., Antunovics, Z., & Pfliegler, W. (2010). Biodiversity in yeast populations associated with bo- trytised wine making. *Mitteilungen Klosterneuburg*, 8.
- Stewart, G. G. (2017). *Brewing and Distilling Yeasts*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-69126-8>
- Stewart, G., & Priest, F. (2006). *Handbook of brewing* (2nd ed.). CRC Press.
- Storgårds, E., Tapani, K., Hartwall, P., Saleva, R., & Suihko, M.-L. (2006). Microbial attachment and biofilm formation in brewery bottling plants. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 64(1), 8-15. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-64-0008>
- Štulíková, K., Vrzal, T., Kubizniaková, P., Enge, J., Matoulková, D., & Brányik, T. (2021). Spoilage of bottled lager beer contaminated with *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*. *Journal of the Institute of Brewing*, 127(3), 256-261. <https://doi.org/10.1002/jib.653>
- Suiker, I. M., Arkesteijn, G. J. A., Zeegers, P. J., & Wösten, H. A. B. (2021). Presence of *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *diastaticus* in industry and nature and spoilage capacity of its vegetative cells and ascospores. *International Journal of Food Microbiology*, 347, 109173. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109173>
- Suzuki, K. (2015). Gram-positive spoilage bacteria in brewing. En *Brewing Microbiology* (pp. 141-173). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00007-1>
- Suzuki, K. (2020). Emergence of new spoilage microorganisms in the brewing industry and development of microbiological quality control methods to cope with this phenomenon: a review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 78(4), 245-259. <https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1782101>
- Suzuki, K., Iijima, K., Sakamoto, K., Sami, M., & Yamashita, H. (2006). A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, 112(2), 173-191. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2006.tb00247.x>
- Tamaki, H. (1978). Genetic studies of ability to ferment starch in *Saccharomyces*: gene polymorphism. *Molecular and General Genetics MGG*, 164(2), 205-209. <https://doi.org/10.1007/BF00267385>
- The Brilliant Beer Company. (2010). Beer quality – microbiological contamination. *Brilliant Beer Company*. www.brilliantbeer.com.

- Timke, M., Wang-Lieu, N. Q., Altendorf, K., & Lipski, A. (2005a). Community structure and diversity of biofilms from a beer bottling plant as revealed using 16s rRNA gene clone libraries. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6446-6452. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.10.6446-6452.2005>
- Timke, M., Wang-Lieu, N. Q., Altendorf, K., & Lipski, A. (2005b). Fatty acid analysis and spoilage potential of biofilms from two breweries. *Journal of Applied Microbiology*, 99(5), 1108-1122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02714.x>
- Toh, D. W. K., Chua, J. Y., Lu, Y., & Liu, S. Q. (2020). Evaluation of the potential of commercial non- *Saccharomyces* yeast strains of *Torulaspora delbrueckii* and *Lachancea thermotolerans* in beer fermentation. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(5), 2049-2059. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14399>
- Thompson, A. R. (2022). Identification of Critical Points for Bacterial Contamination in the Microbrewery Environment. PhD thesis. https://tigerprints.clemson.edu/all_theses/3817
- Trochine, A., Bellora, N., Nizovoy, P., Duran, R., Greif, G., de García, V., Batthyany, C., Robello, C., & Libkind, D. (2022). Genomic and proteomic analysis of *Tausonia pullulans* reveals a key role for a GH15 glucoamylase in starch hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12025-7>
- Uchida, K. (1974). Occurrence of saturated and mono-unsaturated fatty acids with unusually-long-chains (C20-C30) in *Lactobacillus heterohiochii*, an alcoholophilic bacterium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 348(1), 86-93.
- Usbeck, J. C., Kern, C. C., Vogel, R. F., & Behr, J. (2013). Optimization of experimental and modelling parameters for the differentiation of beverage spoiling yeasts by Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI–TOF MS) in response to varying growth conditions. *Food Microbiology*, 36(2), 379-387. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.07.004>
- Vamvakas, S.S., Kapolos, J. Factors affecting yeast ethanol tolerance and fermentation efficiency. *World J Microbiol Biotechnol* 36, 114 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02881-8>
- van der Aa Kühle. (1998). Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. *International Journal of Food Microbiology*, 43(3), 205-213. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00113-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00113-5)
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., & Derdelinckx, G. (2006). The chemistry of beer aging a critical review. *Food Chemistry*, 95, 357-381. <https://doi.org/doi:10.1016/j.foodchem.2005.01.006>

- Vaughan, A., O'Sullivan, T., & Sinderen, D. (2005). Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer—A Review. *Journal of the Institute of Brewing*, 111(4), 355-371. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2005.tb00221.x>
- Vecchio, H. W. D., Dayharsh, C. A., & Baselt, F. C. (1951). Thermal Death Time Studies on Beer Spoilage Organisms—I. *Proceedings. Annual Meeting - American Society of Brewing Chemists*, 9(1), 45-50. <https://doi.org/10.1080/00960845.1951.12006391>
- Vega Perez, A. (2010). Aplicación de métodos moleculares para el estudio de las bacterias acéticas implicadas en la elaboración de vinagre de vino tradicional. Universitat Rovira i Virgili (URV). PhD Thesis
- Vicente, J., Calderón, F., Santos, A., Marquina, D., & Benito, S. (2021). High potential of pichia kluveri and other pichia species in wine technology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1196. <https://doi.org/10.3390/ijms22031196>
- Villacreces, S., Blanco, C. A., & Caballero, I. (2022). Developments and characteristics of craft beer production processes. *Food Bioscience*, 45, 101495. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101495>
- Vriesekoop, F., Krahl, M., Hucker, B., & Menz, G. (2012). 125th Anniversary review: bacteria in brewing: the good, the bad and the ugly: bacteria in brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 118(4), 335-345. <https://doi.org/10.1002/jib.49>
- Waldrom, M. (2020). *Quality Labs Small Brewers*. Brewers Publications. USA, 277p. ISBN: 1938469631
- White, C. (2008). Analysis of the first large-scale testing of craft beer. *Master Brewers Association of the Americas: Technical Quarterly*, 45, 13-16.
- White, C., & Zainasheff, J. (2010). *Yeast: The practical guide to beer fermentation*. Brewers Publications. USA, 300p. ISBN: 0937381969
- White Labs. (2022). *Product Catalog*. <https://www.whitelabs.com/>. <https://whitelabs.com/public/uploads/ckeditor/5f8914dc7a8c71602819292.pdf>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En *PCR Protocols* (pp. 315-322). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Winkelman, B. I. (2018). Análisis del sector cervecero artesanal en San Carlos de Bariloche, bajo el enfoque de sistemas agroalimentarios localizados. Universidad Nacional de Rio Negro. Master Tesis
- Xufre, A., Albergaria, H., Inacio, J., Spencermartins, I., & Girio, F. (2006). Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in

- winery and laboratory grape must fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, S0168160506000493. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.025>
- Zarnkow, M. (2021). Microbiological status of yeast propagation plants and wort acidification plants. International Workshop on brewing yeas, Bariloche, Argentina.
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782-2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zufall, C., & Wackerbauer, K. (2000). The biological impact of flash pasteurization over a wide temperature interval. *Journal of the Institute of Brewing*, 106(3), 163-168. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2000.tb00053.x>

Anexos

ANEXO I. Medios de Cultivo

Medio Hsu's para Lactobacillous y Pediococcus (HLP) (Siebel Institute)

3,0 g/L acetato de sodio anhidro	1,25 g/L ácido cítrico
1, g/L ácido pantoténico	0,01 g/L cicloheximida
19,0 g/L jugo de tomate	1,6 g/L extracto de levadura
5,0 g/L jarabe de maíz	29,2 g/L extracto de malta
4,4 g/L sulfato de sodio	0,55 g/L ácido mercaptoacético
20 g/L agar	

Medio Diferencial de Wallerstein (WLD) (Sigma) (g/L)

5,0 g/L caseína hidrolizada	4,0 g/L extracto de levadura
50,0 g/L dextrosa	0,55 g/L fosfato monopotásico
0,425 g/L cloruro de potasio	0,125 g/L cloruro de calcio
0,125 g/L sulfato de magnesio	0,0025 g/L cloruro férrico
0,0025 g/L sulfato de magnesio	0,0022 g/L verde de bromocresol
0,004 g/L Cicloheximida	20,0 g/L agar

Medio de sulfato de cobre de Lin (LCSM) (Sigma)

4,0 g/L extracto de levadura	2,0 g/L extracto de malta
2,0 g/L peptona	10,0 g/L dextrosa
1,1 g/L dipotasioortofosfato	0,5 g/L cloruro de amonio
0,55 g/L sulfato de cobre	20,0 g/L agar

YM agar con CuSO4

3,0 g/L extracto de levadura	3,0 g/L extracto de malta
5,0 g/L peptona	10,0 g/L glucosa

0,5 g/L sulfato de cobre

15,0 g/L agar

YM agar

3,0 g/L extracto de levadura

3,0 g/L extracto de malta

5,0 g/L peptona

10,0 g/L glucosa

0,5 g/L sulfato de cobre

15,0 g/L agar

Agar Mc. Clary

2,5 g/L extracto de Levadura

1,8 g/L Cloruro de Potasio

8,2 g/L cetato de Sodio

1,0 g/L lucosa

15,0 g/L agar

Caldo almidón

Almidón de papa 15 g/L

Yeast nitrogen base 6,78 g/L

H₂O destilada 1 L

ANEXO II. Aislamientos

a) Conformación de la colección de bacterias contaminantes (BC) de cerveza

# CEPA	Identidad	Método ID	Cervecería	Estilo cerveza	Año	Grupo geográfico	Aislado de
BC15	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Sec.16S	BRY 18	Rubia Fuerte	2016	Grupo 1	Botella
BC16	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Sec.16S	BRY 15	Doppel Bock	2016	Grupo 1	Botella
BC60	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Sec.16S	BRY 15	Pilsen	2016	Grupo 1	Botella
BC19	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Sec.16S	BRY 21	Kolsch	2016	Grupo 1	Botella
BC28	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Sec.16S	BRY 23	Stout	2016	Grupo 1	Botella
BC32	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Sec.16S	BRY 3	Bock	2016	Grupo 1	Botella
BC36	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Sec.16S	BRY 3	Scotch	2016	Grupo 1	Botella
BC48	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Sec.16S	BRY 16	Stout	2016	Grupo 1	Botella
BC64	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Sec.16S	BRY 16	Stout	2016	Grupo 1	Botella
BC49	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Sec.16S	BRY 30	Pale Ale	2016	Grupo 1	Botella
BC51	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Sec.16S	BRY 31	Stout	2016	Grupo 1	Botella
BC53	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Sec.16S	BRY 31	Scotch	2016	Grupo 1	Botella
BC55	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Sec.16S	BRY 20	Araucana	2016	Grupo 1	Botella
BC58	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Sec.16S	BRY 33	Dubbel	2016	Grupo 1	Botella
BC59	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Sec.16S	BRY 33	Weizenbier	2016	Grupo 1	Botella
BC67	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Sec.16S	BRY 37	Golden	2016	Grupo 1	Botella
BC103	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Sec.16S	BRY 17	lpa	2017	Grupo 2	Botella
BC62	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Sec.16S	BRY 31	n.d	2016	Grupo 1	Botella
BC65	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Sec.16S	BRY 36	n.d	2016	Grupo 1	Botella
BC104	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Sec.16S	BRY 17	Golden	2017	Grupo 2	Botella

BC105	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Maldi-TOF	BRY 44	n.d	2018	Grupo 2	Botella
PAC BC 001	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Maldi-TOF	BRY 55	n.d	2018	Grupo 1	Tanque
PAC BC 002	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Maldi-TOF	BRY 55	n.d	2018	Grupo 1	Tanque
PAC BC 003	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Maldi-TOF	BRY 55	n.d	2018	Grupo 1	Tanque
PAC BC 010	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Maldi-TOF	BRY 55	n.d	2018	Grupo 1	Tanque
BC17	<i>Levilactobacillus brevis</i>	Sec.16S	BRY 15	Doppel Bock	2016	Grupo 2	Botella
BC29	<i>Acetobacter malorum/cerevisiae</i>	Sec.16S	BRY 5	Dorada	2016	Grupo 1	Botella
BC35	<i>Acetobacter malorum/cerevisiae</i>	Sec.16S	BRY 3	Scotch	2016	Grupo 1	Botella
BC45	<i>Acetobacter malorum/cerevisiae</i>	Sec.16S	BRY 6	Dorada pampeana	2016	Grupo 1	Botella
BC69	<i>Acetobacter malorum/cerevisiae</i>	Sec.16S	BRY 38	Pale Ale	2016	Grupo 1	Botella
BC39	<i>Acetobacter malorum/cerevisiae</i>	Sec.16S	BRY 10	Pale Ale	2016	Grupo 1	Botella
BC42	<i>Acetobacter malorum/cerevisiae</i>	Sec.16S	BRY 27	Golden	2016	Grupo 1	Botella
BC43	<i>Acetobacter faborum/lovaniensis</i>	Sec.16S	BRY 28	IPA	2016	Grupo 1	Botella
BC50	<i>Acetobacter faborum/lovaniensis</i>	Sec.16S	BRY 31	Stout	2016	Grupo 1	Botella
BC31	<i>Acetobacter aceti/sicerae</i>	Sec.16S	BRY 3	Bock	2016	Grupo 1	Botella
BC38	<i>Acetobacter aceti/sicerae</i>	Sec.16S	BRY 3	Scotch	2016	Grupo 1	Botella
BC41	<i>Asaia bogorensis/lannensis</i>	Sec.16S	BRY 3	pilsen	2016	Grupo 1	Botella
BC23	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Sec.16S	BRY 21	Kolsch	2016	Grupo 1	Botella
BC25	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Sec.16S	BRY 22	Golden	2016	Grupo 1	Botella
BC26	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Sec.16S	BRY 23	Porter	2016	Grupo 1	Botella
BC81	<i>Cronobacter dublinensis</i>	Sec.16S	BRY 42	lpa	2016	Grupo 1	Botella
BC82	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Sec.16S	BRY 7	Stout	2016	Grupo 1	Botella
BC63	<i>Staphylococcus epidermis</i>	Sec.16S	BRY 35	Strong red ale	2016	Grupo 1	Botella
BC18	<i>Pseudomonas hunanensis</i>	Sec.16S	BRY 15	Octoberfest	2016	Grupo 1	Botella

n.d: sin datos. Grupo 1: cervecerías provenientes de localidades de la Patagonia Andina; Grupo 2: cervecerías provenientes de Córdoba, Santa fé y Costra atlántica de la provincia de Buenos Aires.

b) Conformación de la colección de levaduras contaminantes (LC) de cerveza

# CEPA	Identidad	Método ID	Gen Sta1	Cervecería	Estilo Cerveza	Año	Grupo geográfico	Aislado de
LC21	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	no	BRY 12	Golden	2016	Grupo 1	Botella
LC23	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	si	BRY 14	Dorada	2016	Grupo 1	Botella
LC24	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	no	BRY 14	Dorada	2016	Grupo 1	Botella
LC25 A	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	no	BRY 14	Dorada	2016	Grupo 1	Botella
LC25 B	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	no	BRY 14	Dorada	2016	Grupo 1	Botella
LC 26	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	si	BRY 5	Trigo	2016	Grupo 1	Botella
LC 34	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	no	BRY 3	Scotch Ale	2016	Grupo 1	Botella
LC35	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	si	BRY 13	Kolsch	2016	Grupo 1	Botella
LC38	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	si	BRY 10	Pale Ale	2016	Grupo 1	Botella
LC42	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	si	BRY 6	IPA	2016	Grupo 1	Botella
LC43	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	si	BRY 6	Porter	2016	Grupo 1	Botella
LC45	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	si	BRY 16	Rubia	2016	Grupo 1	Botella
LC47	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	si	BRY 4	Africana	2016	Grupo 1	Botella
LC50	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	si	BRY 15	Pilsen	2016	Grupo 1	Botella
LC54	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	si	BRY 7	IPA	2016	Grupo 1	Botella
LC100	<i>S. cerevisiae</i>	Sec. ITS	n.d	BRY 43	Rubia	2017	Grupo 2	Botella
LC104	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	no	BRY 17	Porter	2017	Grupo 2	Botella
LC105	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	no	BRY 17	Golden	2017	Grupo 2	Botella
LC109	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	si	BRY 11	n.d	2016	Grupo 1	Botella
LC110	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	no	BRY 11	n.d	2016	Grupo 1	Tanque
LC339	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	si	BRY 9	n.d	2016	Grupo 1	Tanque
PAC LC002	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	si	BRY 8	n.d	2018	Grupo 1	Tanque
PAC LC007	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	si	BRY 8	Kolsch	2018	Grupo 1	Tanque
PAC LC010	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	si	BRY 8	Porter	2018	Grupo 1	Tanque
PAC LC012	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	no	BRY 1	Kolsch	2018	Grupo 1	Tanque
PAC LC013	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	no	BRY 1	Amber	2018	Grupo 1	Tanque
PAC LC014	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	no	BRY 1	APA	2018	Grupo 1	Tanque
PAC LC015	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	no	BRY 1	APA	2018	Grupo 1	Tanque
PAC LC016	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	si	BRY 9	Irish Red	2018	Grupo 1	Tanque
PAC LC017	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	si	BRY 9	Honey	2018	Grupo 1	Tanque
PAC LC021	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	si	BRY 3	Scotch Ale	2018	Grupo 1	Tanque
PAC LC022	<i>S. cerevisiae</i>	PCR rt	si	BRY 6	Porter	2018	Grupo 1	Tanque
PAC LC023	<i>S. uvarum</i>	PCR rt/Sec. ITS	si	BRY 2	Old Ale	2018	Grupo 1	Tanque
LC19	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Sec. ITS	n.a	BRY 21	Porter	2016	Grupo 1	Botella
LC32	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Sec. ITS	n.a	BRY 23	Stout	2016	Grupo 1	Botella

LC40	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Sec. ITS	n.a	BRY 28	IPA	2016	Grupo 1	Botella
LC44	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Sec. ITS	n.a	BRY 6	Dorada	2016	Grupo 1	Botella
LC103	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Sec. ITS	n.a	BRY 17	Golden	2018	Grupo 2	Botella
LC107	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Sec. ITS	n.a	BRY 44	Dorada	2018	Grupo 2	Botella
PAC LC006	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Maldi TOF	n.a	BRY 8	Kolsch	2018	Grupo 1	Tanque
PAC LC019	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Maldi TOF	n.a	BRY 3	Honey	2018	Grupo 1	Tanque
LC102	<i>Pichia sp.</i>	Seq. ITS	n.a	BRY 17	Rubia	2016	Grupo 2	Botella
LC106	<i>Pichia sp.</i>	Seq. ITS	n.a	BRY 17	Roja	2016	Grupo 2	Botella
LC108	<i>Pichia sp.</i>	Seq. ITS	n.a	BRY 46	American IPA	2016	Grupo 2	Botella
PAC LC001	<i>Pichia sp.</i>	Maldi TOF	n.a	BRY 8	n.d	2018	Grupo 1	Tanque
PAC LC003	<i>Pichia sp.</i>	Maldi TOF	n.a	BRY 23	n.d	2018	Grupo 1	Tanque
PAC LC005	<i>Pichia sp.</i>	Maldi TOF	n.a	BRY 8	Kolsch	2018	Grupo 1	Tanque
PAC LC009 A	<i>Pichia sp.</i>	Maldi TOF	n.a	BRY 8	Porter	2018	Grupo 1	Tanque
PAC LC011	<i>Pichia sp.</i>	Maldi TOF	n.a	BRY 8	Porter	2018	Grupo 1	Tanque
PAC LC18	<i>Candida</i>	Maldi TOF	n.a	BRY 56	Scotch Ale	2018	Grupo 1	Tanque
PAC LC20	<i>Candida</i>	Maldi TOF	n.a	BRY 3	Pilsen	2018	Grupo 1	Tanque
PAC LC24	<i>Candida</i>	Maldi TOF	n.a	BRY 3	Scotch Ale	2018	Grupo 1	Tanque
PAC LC009 B	<i>Torulospora delbrueckii</i>	Maldi TOF	n.a	BRY 8	Porter	2018	Grupo 1	Tanque
LC18	<i>Clavidospora lusitaniae</i>	Seq. ITS	n.a	BRY 21	Golden Ale	2016	Grupo 1	Botella
LC33	<i>Wickerhamiella pararrugosa</i>	Seq. ITS	n.a	BRY 3	Scotch Ale	2016	Grupo 1	Botella
LC31	<i>Trichosporon ovoides</i>	Seq. ITS	n.a	BRY 3	Bock	2016	Grupo 1	Botella
LC52	<i>Naganishia adeliensis</i>	Seq. ITS	n.a	BRY 7	Pale Ale	2016	Grupo 1	Botella

n.a: no aplica; n.d: sin datos; Grupo 1: cervecerías provenientes de localidades de la Patagonia Andina; Grupo 2: cervecerías provenientes de Córdoba, Santa fé y Costra atlántica de la provincia de Buenos Aires.

Publicaciones

M. Latorre, M. Hutzler, M. Michel, M. Zarnkow, F. Jacob and D. Libkind

Genotypic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* spoilers in a community of craft microbreweries

In brewing, the yeast chosen to conduct the fermentation is one of the key factors that influences the flavor profile. Yeasts that are deliberately not under the control of the brewer are referred to as “wild yeasts”. The growth of wild yeasts at any stage of beer production process can cause defects that negatively impact beer quality. Wild yeasts belonging to the *Saccharomyces* genus present the greatest risk, given their physiological and morphological similarity to the inoculated yeast. The production of craft beer in Andean Patagonia of Argentina has grown considerably and a large community of microbreweries co-exist. Most of these have strong interactions and share many raw material suppliers. They have not yet installed proper microbial quality control strategies and wild yeast contamination is challenging. The aim of this article was to genetically characterize for the first time a high number of *S. cerevisiae* wild yeasts isolated from craft beer that originated from Andean Patagonia, and to study the incidence of *S. cerevisiae* var. *diastaticus* contamination. The genetic distinctiveness of 32 wild *Saccharomyces* was determined using multiple real-time PCR systems and PCR-amplicon capillary electrophoresis of IGS2 region. All isolates were positive for *Saccharomyces cerevisiae*, and 66 % were var. *diastaticus* (*STA1* positive). Intriguingly, a single *STA1* positive isolate was also positive for *Saccharomyces bayanus/pastorianus/uvarum* and deserves further investigation. Strain level typification showed a large diversity even in isolates from the same brewery and also permitted the detection of well-established strains within single breweries. It also evidenced possible cross contaminations among breweries. This study provides the first insight into the genetic diversity and distribution of a large set of *S. cerevisiae* var. *diastaticus* in a community of microbreweries and provides important information on how to tackle this problem in the most efficient way and thereby help improve the quality of craft beer.

Keywords: craft beer, Patagonia, spoiler yeast, *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*

1 Introduction

Recently, the consumption and production of craft beer has grown rapidly worldwide and in some regions the growth of this industry has reached 20–35 % annually during the past few years [1]. As a result, it is common to see multiple independent but considerably interconnected microbreweries coexist in certain geographical regions, however, these possess limited microbial quality control strategies. One example is the Andean region of Argentinean Patagonia where by 2018 there were more than 200 microbreweries and more than 40 only in the city of Bariloche (with a local population of 108,000 people). [1 and unpublished data]. Patagonia has unique conditions for brewing as it offers all the ingredients needed for brewing: I) Fresh meltwater from

Patagonian glaciers offer exceptional quality for brewing [3]; II) Barley is largely produced in La Pampa province and small-scale plantations (and posterior malting) are also being developed in Patagonia with promising results; III) Argentina is the only producer of hops in Latin America and the principal South-American region of cultivation is El Bolsón (near Bariloche) [2]; IV) The discovery and identification of the *Saccharomyces eubayanus* yeast species, missing parent of the Lager hybrid [4, 5] in that geographic region, generated great interest in the study and characterization of its fermentative aptitude and its potential application in the beer industry as a tool for productive diversification and added value. Fast growth in volume and the number of craft breweries as well as the increased consumer demand for quality beers force brewers to constantly search for efficient and affordable quality control strategies. Microbial contamination has proven to be one of the most important limiting factors for quality improvement in beer in general and in craft beers in particular [6–8]. The most frequent microbial spoilers are some specific bacteria and wild yeasts [9]. Growth of wild yeasts during fermentation and/or in the packaged product may lead to multiple defects, including the formation of phenolic, acidic, fatty acid and estery off-flavors, excess of attenuation as well as haze and turbidity [10]. Wild yeasts can be divided into two groups: those belonging to the *Saccharomyces* genus and those that are not, the former represent the greatest risk and

<https://doi.org/10.23763/BrSc20-06latorre>

Authors

Mailen Latorre, Diego Libkind, Centro de Referencia en Levaduras y Tecnología Cervecera (CRELTEC). Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC), CONICET – Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Argentina; Mathias Hutzler, Maximilian Michel, Martin Zarnkow, Fritz Jacob, Technical University of Munich, Research Center Weihenstephan for Brewing and Food Quality, Freising, Germany; corresponding author: libkindfd@comahue-conicet.gob.ar

Table 1 *Saccharomyces* isolates from Patagonian craft beer during 2016-2019 from 17 microbreweries using traditional methods of cultivation

# Isolate	Sample format	Brewery	Location	Year	Isolation culture medium
1	BBT	BRY 1	Bariloche	2019	YM+CuSO ₄ 500ppm
2	BBT	BRY 1	Bariloche	2019	YM+CuSO ₄ 500ppm
3	BBT	BRY 1	Bariloche	2019	YM+CuSO ₄ 500ppm
4	BBT	BRY 1	Bariloche	2019	YM+CuSO ₄ 500ppm
5	BBT	BRY 2	Bariloche	2019	YM+CuSO ₄ 500ppm
6	BBT	BRY 3	Bariloche	2019	LCSM
7	Bottle	BRY 3	Bariloche	2016	LCSM
8	Bottle	BRY 4	Bariloche	2016	LCSM
9	Bottle	BRY 5	Bariloche	2016	LCSM
10	BBT	BRY 6	Bariloche	2019	YM+CuSO ₄ 500ppm
11	Bottle	BRY 6	Bariloche	2016	LCSM
12	Bottle	BRY 6	Bariloche	2016	LCSM
13	Bottle	BRY 7	Bariloche	2016	LCSM
14	BBT	BRY 8	Bariloche	2019	LCSM
15	BBT	BRY 8	Bariloche	2019	YM+CuSO ₄ 500ppm
16	BBT	BRY 8	Bariloche	2019	YM+CuSO ₄ 500ppm
17	BBT	BRY 9	Bariloche	2019	LCSM
18	BBT	BRY 9	Bariloche	2019	LCSM
19	BBT	BRY 9	Bariloche	2018	LCSM
20	Bottle	BRY 10	Bariloche	2016	LCSM
21	BBT	BRY 11	Bariloche	2017	LCSM
22	BBT	BRY 11	Bariloche	2017	LCSM
23	Bottle	BRY 12	El Bolson	2016	LCSM
24	Bottle	BRY 13	El Bolson	2016	LCSM
25	Bottle	BRY 14	El Bolson	2016	LCSM
26	Bottle	BRY 14	El Bolsón	2016	LCSM
27	Bottle	BRY 14	El Bolsón	2016	LCSM
28	Bottle	BRY 14	El Bolsón	2016	LCSM
29	Bottle	BRY 15	Epuyen	2016	LCSM
30	Bottle	BRY 15	Epuyen	2016	LCSM
31	Bottle	BRY 16	Epuyen	2016	LCSM
32	Bottle	BRY 17	Córdoba	2017	LCSM

its detection and control is challenging due to their physiological and morphological similarity to the inoculated yeast. In particular, diastatic strains of *Saccharomyces cerevisiae* [11], also referred as *S. cerevisiae* var. *diastaticus* in many publications for super-attenuating/highly fermentative yeasts [12, 13]. These strains are able to metabolize residual carbohydrates in naturally conditioned beers such as complex dextrins and starches due to the presence of *STA* genes encoding for the enzyme glucoamylase [14]. As the *STA* genes are not present in *S. cerevisiae* brewing strains, these genes can be used for specific identification of *S. cerevisiae* var. *diastaticus* [15]. Recently, it was demonstrated that the sole detection of the *STA* gene is not diagnostic of diastatic activity [17] given that alleles with certain deletions might affect the synthesis of the enzyme [16]. *S. cerevisiae* var. *diastaticus* occurs as a primary contaminant in yeast/fermentations and as a secondary contaminant

in the filling process. A primary contamination can lead to a competition with the applied culture yeast during main fermentation and to a strong increase in the spoilage yeast cell counts in the fermentation substrate. Usually occurring as secondary contaminants derived from residues in bottles or in the formation of biofilms, this super-attenuating yeast can contaminate the finished product directly via contact with the product through beer lines, by air circulation in the area of the filling machine and the capper [17]. In contrast to most brewing strains, *S. cerevisiae* var. *diastaticus* frequently sporulates [17], providing opportunities for an efficient spread within and between breweries. To the best of our knowledge, there are no previous works dealing with the incidence and distribution of different strains of *S. cerevisiae* var. *diastaticus* in microbrewery communities. As a case study, we selected the region of Andean Patagonia constituted by a heterogeneous group of small-scale microbreweries with very different levels of experience and size, but with a certain level of relationship due to common raw materials and suppliers, sharing of materials (including yeast slurries), and collaborative joint projects. Previous studies showed a high incidence of microbial contamination in this community as 69.3 % of the beers analyzed showed significant growth of bacteria and/or wild yeasts [18]. The aim of this study was to genetically characterize suspected *Saccharomyces* wild yeasts at the strain level, isolated from craft beers of Andean Patagonia in Argentina with a special focus on *S. cerevisiae* var. *diastaticus* diversity and distribution.

2 Materials and methods

2.1 Yeast isolates and strains

From 2016–2019, a total of 32 *Saccharomyces* spoilage yeast isolates were obtained from 120 samples of finished beer taken from bright beer tanks (BBT) and bottles (Table 1). All of them were isolated from ale type beers brewed in 17 craft microbreweries from different locations in Andean Patagonia (Argentina) with the exception of one strain from the province of Córdoba (Argentina). Lin's Cupric Sulfate Medium (LCSM) [19] or YM with 500 ppm of cupric sulfate was used for detection and isolation. These were preliminarily identified as members of the *Saccharomyces* genus using MALDI-TOF according to previous reports [20, 21].

2.2 Genetic identification and typification of isolates

The genetic distinctiveness of each isolate was studied using qualitative real-time PCR according to Hutzler et al. [22]. For strain

Table 2 Qualitative real-time PCR systems for differentiation of brewing-related yeast species [22–24]

System name	Real-time PCR systems, primer and probe sequences (5'-->3')	Reference	<i>S. cer.</i>	<i>S. past.</i>	<i>S. cer. var. dia.</i>
Sce	Sc-f CAAACGGTGAGAGATTTCTGTGC Sc-r GATAAAATTGTTTGTGTTTGTACCTCTG Sc FAM-ACACTGTGGAATTTTCATATCTTTGCAACTT-BHQ1	[25, 26]	+	+	+
TF-COXII	TF-f TTCGTTGTAACAGCTGCTGATGT TF-r ACCAGGAGTAGCATCAACTTTAATACC TF-MGB FAM-ATGATTTTGTCTATCCCAAGTT-BHQ1	[23]	+	–	+
BF-300	BF300E CTCCTTGGCTTGTGCGAA BF300M GGTTGTTGCTGAAGTTGAGA BF300 FAM-TGCTCCACATTTGATCAGCGCCA-BHQ1	[25]	–	+	–
Sbp	Sbp-r1 TTGTTACCTCTGGGCGTCA Sbp-r2 GTTTGTACCTCTGGGCTCG Sbp ACTTTTGAACCTTTTCTTTGGGTTTCGAGCA	[25, 26]	–	+	–
Sdia	Sd-f TTCCAACCTGCACTAGTTCCTAGAGG Sd-r GAGCTGAATGGAGTTGAAGATGG Sdia FAM-CCTCCTCTAGCAACATCACTTCTCCG-BHQ1	[25]	–	–	+

typification, a method based on a PCR-amplicon capillary electrophoresis of partial intergenic spacer 2 (IGS2) fragment (IGS2-314 PCR-capillary electrophoresis) was employed [17].

2.2.1 DNA extraction

To extract the DNA from each investigated yeast isolate these were cultured in YM agar slants for 48 hrs and an inoculation loop was used to transfer this to a 1.5 mL tube. It was mixed with an aliquot of 200 µL InstaGene™ Matrix solution (Biorad, Munich, Germany). Each tube was vortexed for ten seconds and incubated at 56 °C for 30 minutes, followed by another ten seconds of vortexing and incubation at 96 °C for eight minutes. The incubation steps occurred in a Thermomix 5436 (Eppendorf, Hamburg, Germany). After incubation, the tubes were centrifuged at 13,000 g for two minutes then a 100 µL aliquot of the supernatant containing the DNA was transferred to a new 1.5 mL tube [17].

2.2.2 Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

Real-time PCR (Light Cycler® 480 II. Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Germany) was used to taxonomically classify the isolates. The primer and TaqMan® probe sequences used are listed in Table 2 and the RT-PCR procedure followed that of Hutzler [23]. All RT-PCR systems listed in Table 2 are compatible and were performed with 10 µL 2x Mastermix (Light Cycler® 480 Probe Master, Roche, Germany), 1.4 µL ddH₂O PCR water, 0.8 µL (400 nM) of each primer (Biomers, Ulm, Germany), 0.4 µL (200 nM) probe (Biomers, Ulm, Germany; MGB probe from ThermoFisher scientific, Applied Biosystems®, USA), 0.5 µL IAC135-f (250 nM), 0.5 µL IAC135-r (250 nM), 0.4 µL IAC135-S (HEX) (200 nM), 0.1 µL IAC135 (dilution 1: 10–13), 0.1 µL IAC135 rev (dilution 1: 10–13) and 5 µL template DNA with a total reaction volume of 20 µL, using the same temperature protocol: 95 °C / 10 min; 40 cycles of 95 °C / 10 s, 60 °C / 55 s; 20 °C. IAC135 was developed by Riedl at the Research Center Weihenstephan for Brewing and Food Quality of the Technical University Munich. IAC (internal amplification control) is a control to confirm that the PCR reaction itself took place. The yeast strains *S. cerevisiae* (LeoBavaricus - TUM 68®) and *S. pastorianus* (Frisinga - TUM 34/70®) were used as a positive and negative control according to the RT-PCR system tested. The signal

was considered to be positive when the Ct value (cycle threshold), defined as the number of cycles required for the fluorescent signal to cross the threshold, was less than 30.

2.2.3 PCR-DNA sequencing (D1/D2 26S rRNA gene and ITS)

The identity of isolates with ambiguous results obtained by RT-PCR were confirmed by sequence analysis of the D1/D2 26S and ITS1-5.8S-ITS2 ribosomal DNA according to previous reports [27].

2.2.4 DNA fingerprinting (PCR-capillary electrophoresis of the IGS2-314 fragment)

For strain typification, genetic fingerprints were generated, based on the study of the IGS2 spacer region within the ribosomal gene cluster, using the IGS2-314 method [23]. For partial sequencing of the intergenic spacer 2 (IGS2-314) the specific primers IGS2-314f(5'-CGGGTAACCCAGTTCCTCACT-3') and IGS2-314r(5'-TAGCATATATTTCTTGTGTGAGAAAGGT-3') [28] were used at a concentration of 600 nM as described by Hutzler, Geiger and Jacob [23]. PCR was performed with 22.5 µL RedTaq Mastermix (2x) (Genaxxon, Ulm, Germany) and 2.5 µL template DNA with a total reaction volume of 25 µL. The Mastermix contained 12.5 µL buffer solution (RedTaq Mastermix), 7.0 µL DNA-free PCR water and 1.5 µL of each primer (Biomers, Munich, Germany). Cycling parameters were: A pre-denaturing step at 95 °C for 300 s, then 35 cycles for denaturing at 95 °C for 30 s, for annealing and elongation at 54 °C for 30 s and 72 °C for 40 s and for final elongation at 72 °C for 300 s. PCR was performed using a SensoQuest LabCycler48s (SensoQuest GmbH, Gottingen, Germany). Amplified fragments were analyzed using a capillary electrophoresis system (Agilent DNA 1000 kit) following the manufacturer's recommendations (lab on a chip, Bioanalyzer Agilent 2100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

2.2.5 Dendrogram analysis of the IGS2-314 fingerprint patterns

Based on the specific capillary electrophoresis IGS2-314 rDNA patterns, a dendrogram was built using the Bionumerics program 7.6 (Applied Maths, Belgium) to show the relationship between

Table 3 Qualitative real-time PCR systems for *Saccharomyces* spp. differentiation [22–24]

Strain #	Sce (Ct value)	BF300 (Ct value)	TF (Ct value)	Sbp (Ct value)	Sdia (Ct value)
1	+ (20.82)	–	+ (24.16)	–	–
2	+ (18.50)	–	+ (21.95)	–	–
3	+ (20.49)	–	+ (22.18)	–	–
4	+ (20.59)	–	–	–	–
5	+ (26.41)*	– *	– *	+ (22.22)*	+ (27.04)*
6	+ (20.38)	–	+ (23.62)	–	+ (25.30)
7	+ (18.98)	–	+ (21.11)	–	–
8	+ (19.84)	–	+ (21.59)	–	+ (26.44)
9	+ (18.55)	–	+ (18.85)	–	+ (23.35)
10	+ (19.07)	–	–	–	+ (26.06)
11	+ (18.98)	–	+ (21.89)	–	+ (26.54)
12	+ (21.31)	–	+ (24.98)	–	+ (26.84)
13	+ (19.58)	–	+ (22.44)	–	+ (26.23)
14	+ (19.43)	–	+ (23.88)	–	+ (24.92)
15	+ (17.62)	–	–	–	+ (22.16)
16	+ (18.76)	–	+ (23.22)	–	+ (23.69)
17	+ (18.11)	–	+ (23.02)	–	+ (27.88)
18	+ (19.07)	–	+ (22.24)	–	+ (25.57)
19	+ (22.09)	–	–	–	+ (27.97)
20	+ (20.07)	–	+ (23.26)	–	+ (25.57)
21	+ (20.94)	–	+ (22.04)	–	+ (25.70)
22	+ (18.78)	–	+ (20.09)	–	–
23	+ (20.88)	–	+ (23.55)	–	–
24	+ (20.08)	–	+ (22.99)	–	+ (25.61)
25	+ (20.51)	–	+ (22.06)	–	+ (25.45)
26	+ (17.38)	–	+ (18.34)	–	–
27	+ (18.04)	–	+ (19.23)	–	–
28	+ (17.82)	–	+ (19.80)	–	–
29	+ (19.68)	–	+ (22.94)	–	+ (24.46)
30	+ (20.11)	–	–	–	+ (26.43)
31	+ (21.14)	–	+ (23.88)	–	+ (26.80)
32	+ (19.93)	–	+ (24.06)	–	–

(*) Average results of two replicates

the investigated yeast isolates and reference top-fermenting strain *Saccharomyces cerevisiae* SafAle S-04 and SafAle US-05 of Fermentis®. The clustering was built using a Dice similarity coefficient and the methodology applied was UPGMA. The patterns were optimized using an optimization degree of 0.3 % and a tolerance set of 1 % with a tolerance change of 0.2 %.

3 Results and discussion

All 32 yeast isolates that were confirmed as belonging to the genus *Saccharomyces* by the MALDI-TOF approach were analyzed using five specific *Saccharomyces* real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) systems (Table 2) and the results are shown in table 3. The RT-PCR results showed that all isolates were positive for Sce locus which detects ITS1-5.8S-ITS rDNA

present in *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus* and *S. cariocanus* [26], in line with MALDI-TOF data. Unsurprisingly, all isolates were negative for *Saccharomyces pastorianus* BF 300 system (BF = bottom fermenting). The BF300 Primer system was generated via subtractive hybridization and subsequent design of a real-time PCR system and is also a marker for *S. pastorianus* and some *S. bayanus* strains [25]. Twenty-eight isolates were positive for the PCR system TF-COXII based on the mitochondrial COXII genetic marker. This primer system is used to differentiate *Saccharomyces cerevisiae* from *S. pastorianus*, *S. uvarum* and *S. bayanus* [23]. Isolate 5 represented a unique case given it was the only positive yeast for the Sbp system (located on the ITS1-5.8S-ITS2) which detects species belonging to either *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. uvarum* or *S. eubayanus*. Twenty-one isolates were positive for the *STA1* gene marker which was designed to specifically detect *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, given this gene is responsible for the synthesis of glucoamylase enzyme that allows dextrin assimilation leading to super-attenuated beers. The remaining 11 isolates that were negative for Sdia were positive for TF-COXII system, suggesting that they could be a brewing ale strain or a *STA1* negative *Saccharomyces cerevisiae* spoiler.

The isolates 4, 5, 10, 15, 19 and 30 showed ambiguous RT-PCR results. For this reason, one additional system was used according to Salinas et. al. [22, 29] to detect *S. cerevisiae* top-fermenting yeast. With the exception of isolate 5 all the isolates had positive signals confirming their *S. cerevisiae* identity: 4 (Ct value = 27.01), 10 (Ct value = 25.26), 15 (Ct value = 23.26), 19 (Ct value = 27.99), and 30 (Ct value = 27.14). It is probable that these isolates have nucleotide differences at the

COXII target sequences of the TF Real-Time PCR system, given a considerable variability in this sequence for *S. cerevisiae* has been reported previously [5, 30]. Due to the Sdia system (*STA1* +) positive result these 5 isolates were considered to be *S. cerevisiae* var. *diastaticus*. Taking into account all the positive results for Sdia loci, 66 % of the total isolates can be assigned to *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, representing 17.5 % of the beer samples analyzed (N=120) and 47 % of the breweries studied (N=45). Thus, this species becomes the most relevant yeast contaminant of the southern Argentina craft beer industry. Given that there not many studies focusing on the incidence of *S. cerevisiae* var. *diastaticus* in brewing, these values are hard to compare and discuss. For example, Meier-Dörnberg et al. [11] found higher values given that between 2008 and 2017, 56 % of the 100 samples of beer tested contained *S. cerevisiae* var. *diastaticus*. Isolate 5 represents a salient case given it was positive for the Salinas et al. system (Ct

value = 26.74) and *Sdia* system but was also positive for *Sbp*. Consequently, the ITS and D1/D2 regions were sequenced. The results showed 100 % identity with *Saccharomyces uvarum* CBS 395 (accession number NR153310.1). Further studies are needed to clarify the situation of this particular strain, including WGS in order to detect a possible hybrid scenario.

The PCR amplification of the IGS2-314 locus was used to typify the isolates and the two main top-fermenting yeasts used by craft breweries in Argentina were included in the analysis as references (Fig. 1). The results show a great genetic diversity among the isolates for the IGS2-314 locus and all isolates had different banding patterns to the reference strains, strain 27 being the most similar to strain S-04 (81.8% of similarity). The reference strain US-05 had very low similarity (< 21 %) with the rest of the studied isolates. Eight of the 17 breweries from which isolates were studied here had multiple isolates and for 75 % of these cases (6 out of 8 breweries) the isolates from the same brewery did not share similar banding patterns (e. g BRY 1, BRY 3, BRY 6, BRY 11, BRY 14 and BRY 15). For example, breweries 6 and 14 had three isolates each and based on our typification approach all belong to distinct strains. The genetic heterogeneity found between strains from the same brewery suggest diversity of spoiler yeasts possibly associated with different contamination events and sources. On the other hand, for breweries with multiple isolates such as BRY 1, 8 and 9 identical (100 % similarity) or almost identical (88.9 % for BRY 1) it was also possible to detect genetic fingerprints for 3 isolates in each case (Fig. 1). This is an indication that those strains are well established in one particular brewery and is spread to the different batches by contaminated re-pitching brewing yeast, other process pathways or improperly sanitized equipment and surfaces. An interesting case is that of BRY 9 where *STA*-positive isolate 19 was obtained almost one year before the genetically identical isolates 18 and 17. The brewery moved their facilities to a new location in between the collection of the isolates, which suggests that this strain is strongly established in the brewery equipment.

Another interesting finding is the high number of cases (5) in which similar genetic patterns (> 89.0 % of similarity) and *STA* condition were obtained for isolates of different breweries. For example, isolates 14, 15 and 16 (BRY 8) are identical to isolate 23 (BRY 12), also isolates 8 (BRY 4) and 21 (BRY 11); 6 (BRY 3) and 29 (BRY 15); 12 (BRY 6) and 30 (BRY 15); and isolates 11 (BRY 6), 25 (BRY 10) and 20 (BRY 14). These results suggest potential cases of cross contamination between breweries due to some kind of interaction like contract filling, beer or yeast slurry exchange, or even collaborative beer projects. Another explanation could be that the breweries share the same provider for raw materials or equipment. The possible connection of contamination pathways is

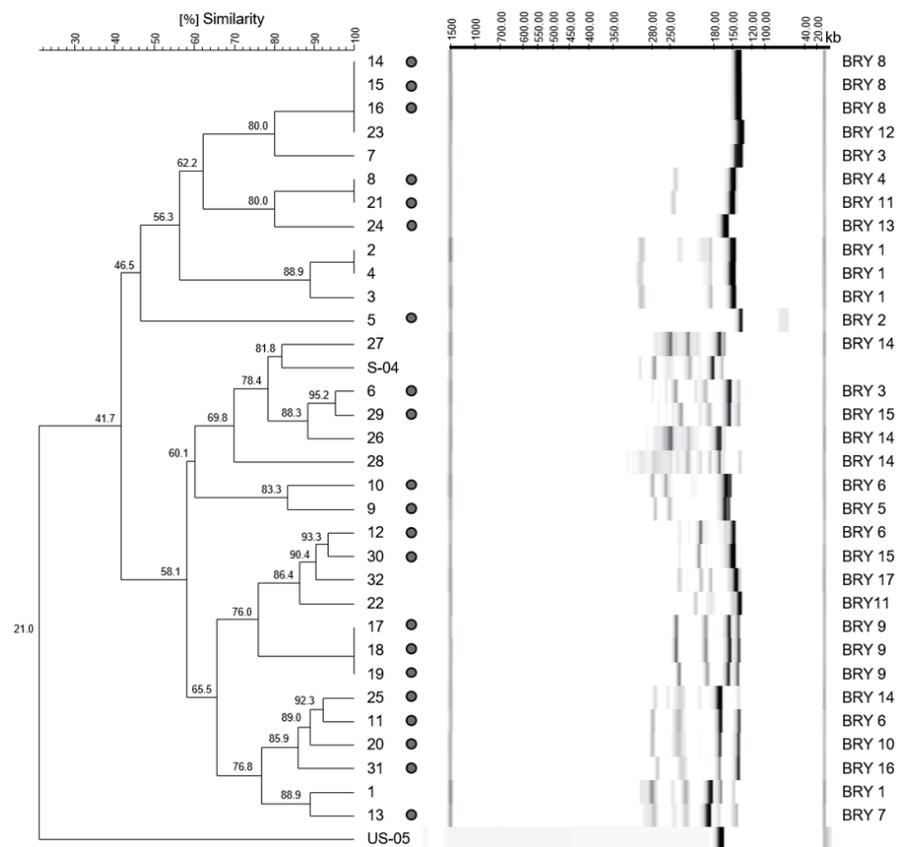


Fig. 1 IGS2-314 rDNA band-based genetic relationship between *Saccharomyces cerevisiae* spoiler isolates (dendrogram built with Bionumerics 7.6). The dots indicate *STA1*-positive strains thus *S. cerevisiae* var. *diastolicus* identity. The code of the brewery (BRY) is in the right side of the figure

indeed an important and interesting aspect. The craft beer industry in this region has only started in the last few years, before that there were almost no small local breweries. Nevertheless, similar beer spoilers have settled in the breweries, which are also located in different geographic areas. This shows that the substrate and the respective environments are very similar. As far as the substrate is concerned, it is obvious that water, malt (probably mainly pale barley malt), were used in similar grist portions and similar hop products with similar hopping techniques. In any case, there are many possibilities that beer-spoiling yeasts can find niches. In addition, the breweries certainly have connection points and likely help each other out with raw materials. One alternative reason for the similar wild yeasts found in different breweries could be the use of the same dry yeast strains and suppliers given contaminated dry yeast and more likely re-pitched dry yeast can be a potential source of wild yeast contaminations.

In terms of the distribution of *STA*+ condition and thus var. *diastolicus* identity among the dendrogram, we observed that this trait is considerably widespread among most of the groups with a few exceptions of clusters of isolates that have either positive and negative *STA* cases. Probably the most notable case is that of the cluster of isolates 14, 15, 16 and 23 with 100 % similarity (Fig. 1), the latter being *STA*- and the rest positive. It should be noted that isolate 23 comes from a different brewery and a close inspection of the banding patterns suggests the existence of a slight difference in the size of the unique diagnostic band that should be further

studied to confirm if it belongs to the same strain as the other 3 isolates. It was observed that 4 of the 8 breweries with more than 1 isolate analyzed, showed strains that were positive for *STA1* and negative to this gene. Given the lack of information of how the *STA* gene is spread among brewing-related *S. cerevisiae* strains and within the brewery environment, it is difficult to draw more conclusions from the correlation of the presence of the *STA* gene and the isolates genetic typification.

The genetic typification again showed isolate 5 as a unique case, given it displays a banding pattern very different from the others (only 46.5 % similarity) confirming that it is a very interesting strain that requires a deeper analysis.

4 Conclusions

The identity and genetic distinctiveness of 32 suspected *S. cerevisiae* isolates regarded as beer contaminants from craft beers produced in Argentinian Patagonia was determined using a combination of methodologies including MALDI-TOF, real-time PCR and PCR-amplicon capillary electrophoresis. The real-time PCR approach proved useful for a rapid confirmation of *S. cerevisiae* identity and the detection of *STA*-positive isolates hence assignment to *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, which was the majority of the isolates (66 %). The IGS2-314 analysis provided the right level of genetic variability among the isolates to allow finding very interesting cases such as 3 different breweries with multiple isolates of the same strain, and also several different breweries with putative identical contaminant strains. Both studies agreed on the genetic uniqueness of isolate 5, which deserves further attention. A working hypothesis could be that it represents a hybrid of *S. uvarum* and a *STA+* *S. cerevisiae* strain, for which genome sequencing analysis will be applied in the future. The large genetic diversity of strains (and *STA* gene condition) found even among isolates of some breweries suggests that craft breweries in Patagonia, Argentina, are in contact with a large diversity of *S. cerevisiae* beer spoilers possibly associated with distinct contamination events/sources. It is worth mentioning that is almost impossible to find wild *S. cerevisiae* strains in the natural environment of Andean Patagonia [4, 31]. Thus, most probably these contaminants arrive to the brewery with raw material and establish there when possible, as seen in a few breweries in this study where the same strain appears several times, even after moving to a different location. In addition, more than a few breweries shared contaminant strains, which is indicative of cross contamination maybe arising from several type of interactions and exchanges that are common to the craft industry. *Saccharomyces* var. *diastaticus* (*STA1*-positive) was the most relevant case in this study and showed a large genetic heterogeneity, indicating the existence of multiple strains for this yeast. Hopefully, additional WGS studies will allow us to gain a better understanding of genomic basis of this strain differentiation and the mechanisms by which *STA* genes spread among spoiling strains. Overall, the data shows that *S. cerevisiae* var. *diastaticus* is an important contaminant in the brewing industry and is clearly one of the most frequent yeast spoilers in the craft industry based in the south of Argentina. Despite the rapid growth of the craft breweries in Patagonia, Argentina, our findings indicate that more attention should be paid to the microbiological quality of the beers

produced, and the need to eliminate non-sanitary equipment or accessories, implement proper cleaning and sanitizing protocols and microbial quality control strategies in the breweries. This is the first study that provides source tracking profiles at a strain level of a high number of *S. cerevisiae* var. *diastaticus* isolates that show strain distribution within one specific brewery and across different breweries in one geographical region. There are some recent *S. cerevisiae* var. *diastaticus* studies but their focus is more on strain characterization and statistical distribution than strain tracking across different connected breweries [16]. The applied methods in this article and the data collected have the potential to assess different contamination sources and routes in order to improve the quality of Argentine craft beers. The strains studied in this work were cryo-preserved and incorporated into the IPATEC microbial collection given that they will be useful as a reference for designing strategies for the detection and control of spoilage microorganisms in micro-breweries, the study of their physiological and genetic characteristics, as well as their potential application in brewing innovation.

Acknowledgements

The present work was financially supported by Universidad Nacional del Comanue (B199), CONICET (PIP11220130100392CO) and Ministerio de Educación (SPU) with projects funded to DL. ML is a CONICET PhD fellow.

5 References

1. Libkind, D. and Bruzone, C.: La madre estaba en la Patagonia, Alimentos Argentinos. Ministerio de Agroindustria de la Nación., (2018), p. 82.
2. Lugones, G.; Britto, F.; Carro, A.; Lugones, M.; Quiroga, J.; Reinoso, L.; Monasterios, C. and Serovic, L.B.: Asociación ciencia-empresa para la "domesticación" de la levadura andina y la introducción de mejoras en la producción de cerveza, (2019), p. 65.
3. Toncek, A.: Cervezas de los Andes, Caleuche, Río Negro, Argentina, 2016.
4. Libkind, D.; Hittinger, C.T.; Valerio, E.; Goncalves, C.; Dover, J.; Johnston, M.; Goncalves, P. and Sampaio, J.P.: Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast, Proceedings of the National Academy of Sciences, **108** (2011), no. 35, pp. 14539-14544.
5. Peris, D.; Sylvester, K.; Libkind, D.; Gonçalves, P.; Sampaio, J.P.; Alexander, W.G. and Hittinger, C.T.: Population structure and reticulate evolution of *Saccharomyces eubayanus* and its lager-brewing hybrids, Molecular Ecology, **23** (2014), no. 8, pp. 2031-2045.
6. Manzano, M.; Iacumin, L.; Vendrames, M.; Cecchini, F.; Comi, G. and Buiatti, S.: Craft Beer Microflora Identification Before and After a Cleaning Process, Journal of the Institute of Brewing, **117** (2011), no. 3, pp. 343-351.
7. Giovenzana, V.; Beghi, R. and Guidetti, R.: Rapid evaluation of craft beer quality during fermentation process by vis/NIR spectroscopy, Journal of Food Engineering, **142** (2014), pp. 80-86.
8. Back, W.: Atlas and Handbook of Beverage Biology, Hans Carl Verlag, Nuremberg, Germany, 2006.
9. Deak, T.: Handbook of Food Spoilage Yeasts, CRC Press, 2007.
10. Moretti, E.: Development of guidelines for microbiological control in microbrewery, Department Of Economical and Food Science. University

- of Perugia, (2013), p. 72.
11. Meier-Dörnberg, T.; Jacob, F.; Michel, M. and Hutzler, M.: Incidence of *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* in the Beverage Industry: Cases of Contamination, 2008–2017, Master Brewers Association of the Americas TQ, **54** (2017), no. 4, pp. 140-148.
 12. Jespersen, L.; van der Aa Kühle, A. and Petersen, K.M.: Phenotypic and genetic diversity of *Saccharomyces* contaminants isolated from lager breweries and their phylogenetic relationship with brewing yeasts, International Journal of Food Microbiology, **60** (2000), no. 1, pp. 43-53.
 13. Marín-Navarro, J.; Gurgu, L.; Alamar, S. and Polaina, J.: Structural and functional analysis of hybrid enzymes generated by domain shuffling between *Saccharomyces cerevisiae* (var. *diastaticus*) Sta1 glucoamylase and *Saccharomycopsis fibuligera* Bgl1 β -glucosidase, Applied Microbiology and Biotechnology, **89** (2011), no. 1, pp. 121-130.
 14. Adam, A.C.; Latorre-García, L. and Polaina, J.: Structural analysis of glucoamylase encoded by the *STA1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* (var. *diastaticus*), Yeast, **21** (2004), no. 5, pp. 379-388.
 15. Balogh, I. and Maráz, A.: Presence of *STA* gene sequences in brewer's yeast genome, Letters in Applied Microbiology, **22** (1996), no. 6, pp. 400-404.
 16. Krogerus, K.; Magalhães, F.; Kuivanen, J. and Gibson, B.: A deletion in the *STA1* promoter determines maltotriose and starch utilization in *STA1+* *Saccharomyces cerevisiae* strains, Applied Microbiology and Biotechnology, **103** (2019), no. 18, pp. 7597-7615.
 17. Meier-Dörnberg, T.; Kory, O.I.; Jacob, F.; Michel, M. and Hutzler, M.: *Saccharomyces cerevisiae* variety *diastaticus* friend or foe? – spoilage potential and brewing ability of different *Saccharomyces cerevisiae* variety *diastaticus* yeast isolates by genetic, phenotypic and physiological characterization, FEMS Yeast Research, **18** (2018), no. 4.
 18. Latorre, M.: Contaminantes microbianos en cervezas artesanales embotelladas de la Patagonia Andina, Licenciata Thesis, Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Argentina, 2016.
 19. Lin, Y.: formulation and testing of cupric sulphate medium for wild yeast detection, Journal of the Institute of Brewing, **87** (1981), no. 3, pp. 151-154.
 20. Lauterbach, A.; Usbeck, J.C.; Behr, J. and Vogel, R.F.: MALDI-TOF MS typing enables the classification of brewing yeasts of the genus *Saccharomyces* to major beer styles, Plos One, **12** (2017), no. 8, p. e0181694.
 21. Usbeck, J.C.; Kern, C.C.; Vogel, R.F. and Behr, J.: Optimization of experimental and modelling parameters for the differentiation of beverage spoiling yeasts by Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization –Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in response to varying growth conditions, Food Microbiology, **36** (2013), no. 2, pp. 379-387.
 22. Hutzler, M.; Koob, J.; Schneiderbanger, H.; Mueller-Auffermann, K. and Jacob, F.: Yeast identification and characterization, Brewing Microbiology Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste, 1st ed. Hill, A. ed., Woodhead Publishing, London, (2015), pp. 65-104.
 23. Hutzler, M.; Geiger, E. and Jacob, F.: Use of PCR-DHPLC (Polymerase Chain Reaction-Denaturing High Performance Liquid Chromatography) for the Rapid Differentiation of Industrial *Saccharomyces pastorianus* and *Saccharomyces cerevisiae* Strains, Journal of the Institute of Brewing, **116** (2010), no. 4, pp. 464-474.
 24. Sampaio, J.P.; Pontes, A.; Libkind, D. and Hutzler, M.: Taxonomy, diversity, and typing of brewing yeasts, Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology, Bokulich and Bamforth ed., (2017), Caister Academic Press Norfolk, UK, pp. 85-118.
 25. Brandl, A.: Entwicklung und Optimierung von PCR-Methoden zur Detektion und Identifizierung von brauereirelevanten Mikroorganismen zur Routine-Anwendung in Brauereien, **119-133** (2006).
 26. Josepa, S.; Guillamon, J.M. and Cano, J.: PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus*/*Saccharomyces pastorianus* using specific primers, FEMS Microbiology Letters, **193** (2000), no. 2, pp. 255-259.
 27. Hutzler, M.: Entwicklung und Optimierung von Methoden zur Identifizierung und Differenzierung von getränkerelevanten Hefen, Dissertation, TU München. (2009), p. 283.
 28. Büchl, N.R.; Hutzler, M.; Mietke-Hofmann, H.; Wenning, M. and Scherer, S.: Differentiation of probiotic and environmental *Saccharomyces cerevisiae* strains in animal feed, Journal of Applied Microbiology, **109** (2010), no. 3, pp. 783-791.
 29. Salinas, F.; Garrido, D.; Ganga, A.; Veliz, G. and Martínez, C.: Taqman real-time PCR for the detection and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* in wine, Food Microbiology, **26** (2009), no. 3, pp. 328-332.
 30. Peris, D.; Langdon, Q.K.; Moriarty, R.V.; Sylvester, K.; Bontrager, M.; Charron, G.; Leducq, J.-B.; Landry, C.R.; Libkind, D. and Hittinger, C.T.: Complex Ancestries of Ager-Brewing Hybrids Were Shaped by Standing Variation in the Wild Yeast *Saccharomyces eubayanus*, PLOS Genetics, **12** (2016), no. 7, p. e1006155.
 31. Eizaguirre, J.I.; Peris, D.; Rodríguez, M.E.; Lopes, C.A.; De Los Ríos, P.; Hittinger, C.T. and Libkind, D.: Phylogeography of the wild Lager-brewing ancestor (*Saccharomyces eubayanus*) in Patagonia: *Saccharomyces eubayanus* in Patagonia, Environmental Microbiology, **20** (2018), no. 10, pp. 3732-3743.

Received 29 January 2020, accepted 25 March 2020



REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

www.elsevier.es/ram



ORIGINAL

Contaminantes microbianos en cervezas artesanales embotelladas de la Patagonia andina argentina

Mailen Latorre^a, M. Clara Bruzone^a, Virginia de Garcia^b y Diego Libkind^{a,*}

^a Centro de Referencia en Levaduras y Tecnología Cervecera (CRELTEC), Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC) – CONICET / Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Río Negro, Argentina

^b Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas (PROBIEN), CONICET - Universidad Nacional del Comahue, Neuquén, Buenos Aires, Argentina

Recibido el 13 de mayo de 2021; aceptado el 2 de mayo de 2022

KEYWORDS

Craft beer;
Beer spoilers;
Patagonia;
Argentina

Resumen La actividad cervecera en la Patagonia andina argentina tiene un rol muy importante en la economía de la región; una de las problemáticas que enfrenta, en términos de calidad, son las contaminaciones microbianas. La presencia de bacterias y levaduras contaminantes en la cerveza produce cambios microbiológicos, físicos y químicos, que impactan en sus atributos sensoriales. No obstante, pocas cervecías establecen criterios y políticas que garanticen la calidad microbiológica de sus productos. El propósito de este trabajo fue estudiar por primera vez la incidencia de contaminantes microbianos en cervezas artesanales embotelladas producidas en la Patagonia andina argentina, además de identificar los principales microorganismos involucrados y determinar posibles relaciones entre los eventos de contaminación y variables fisicoquímicas de la cerveza. Para ello se analizaron 75 cervezas provenientes de 37 cervecías de 12 localidades andinas. El 69,3% de las muestras analizadas evidenció crecimiento de microorganismos en los medios de cultivo empleados para la detección de contaminantes cerveceros. La bacteria *Levilactobacillus brevis* y levaduras del género *Saccharomyces* fueron los principales contaminantes identificados. Se comprobó que las contaminaciones microbianas impactaron sobre el perfil sensorial de la cerveza y que el cambio de pH fue un indicador de contaminación por bacterias lácticas. De cada 10 fábricas estudiadas, 8 presentaron problemas de contaminación, lo que pone en evidencia la necesidad de diseñar estrategias de prevención y control de contaminaciones en microcervecías.

© 2022 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: libkindfd@comahue-conicet.gob.ar (D. Libkind).

<https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.05.006>

0325-7541/© 2022 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Cómo citar este artículo: M. Latorre, M.C. Bruzone, V. de Garcia et al., Contaminantes microbianos en cervezas artesanales embotelladas de la Patagonia andina argentina, Revista Argentina de Microbiología, <https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.05.006>

PALABRAS CLAVE

Cerveza artesanal;
Microorganismos
contaminantes;
Patagonia;
Argentina

Microbial contaminants in bottled craft beer of Andean Patagonia, Argentina

Abstract The brewing activity in Andean Patagonia plays a very important role in the region's economy, being microbial contamination one of the main problems in terms of quality. The presence of contaminant bacteria and wild yeasts in beer generate microbiological, physical and chemical changes that impact on its sensory attributes. However, few breweries establish criteria and policies to guarantee the quality of their products in a microbiological sense. The purpose of this work was to study for the first time the incidence of microbial contaminants in bottled craft beers from Andean Patagonia, identify the main microorganisms involved and establish relationships between contamination and the physicochemical variables of beer. We analyzed 75 beers from 37 breweries from 12 different Patagonian cities. Our results showed that 69.3% of the analyzed beer exhibited contaminant microorganism growth. Bacteria *Levilactobacillus brevis* and wild yeasts of *Saccharomyces* were the main microorganisms responsible for these contaminations. In addition, we found that microbial contamination had an impact on beer sensory profile and also that pH was correlated with the presence of lactic acid bacteria in beer, being an indicator of contamination for these bacteria. In conclusion, we observed that 8 out of 10 breweries studied showed contamination problems, highlighting the need to design prevention and control strategies in microbreweries.

© 2022 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La contaminación microbiana ha demostrado ser uno de los factores más importantes que afectan la calidad de la cerveza, en general, y de las cervezas artesanales, en particular^{7,14,26}. La producción de cerveza artesanal en Argentina es parte de un sector emergente y ha experimentado un continuo crecimiento durante los últimos 20 años^{53,54}. Este crecimiento significa un gran impacto en las bioeconomías regionales, ya que, además, genera múltiples puestos de trabajo, ayuda a diversificar las matrices productivas e impacta positivamente en otros sectores económicos, como el de servicios, metalúrgica, transporte, gastronomía, entre otros^{12,20}.

La región andina de la Patagonia se destaca en materia de antecedentes cerveceros y Bariloche es una de las localidades con mayor impacto y reconocimiento en cuanto a producción de cerveza artesanal en el país. San Carlos de Bariloche presenta la mayor densidad de microcervecías por habitante de Argentina (40 en el año 2018) y la mayor cantidad de litros de cerveza artesanal elaborada por habitante de todo el país (17 litros por persona)⁴⁹.

El sector productivo de Bariloche y su zona de influencia está integrado por actores que presentan fuertes asimetrías en relación con el tamaño de producción, tecnologías incorporadas y mercados en los que operan²⁵. El rápido crecimiento en el volumen y la cantidad de cervecías artesanales, así como la mayor demanda de cervezas de calidad por parte del consumidor, obligan a buscar constantemente estrategias de control de calidad eficientes y asequibles, que les garantice a los productores competitividad y permanencia en el mercado.

Aunque esta bebida presenta características que restringen el crecimiento microbiano (contiene etanol, iso- α -ácidos, alto contenido de dióxido de carbono, bajo

pH, bajo contenido de oxígeno y pocos nutrientes), existen bacterias y levaduras contaminantes capaces de tolerar dichas condiciones y producir cambios sensoriales, microbiológicos, químicos y físicos que alteran la calidad de la cerveza^{18,26,38,46}. La presencia de bacterias en la cerveza puede causar turbidez, sedimentos, exopolisacáridos, compuestos sulfurados, diacetilo y diversos ácidos orgánicos, entre otros compuestos. El 90% de las contaminaciones reportadas son causadas por bacterias ácido lácticas (BAL) de los géneros *Levilactobacillus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*^{30,40,41,48}; *Levilactobacillus brevis* —antes conocida como *Lactobacillus brevis*— es la especie de mayor incidencia^{40,41,47}. La contaminación con bacterias gram negativas, como *Acetobacter* y *Gluconobacter* (acetobacterias), también ha sido reportada, aunque en los últimos años, la incidencia de estas bacterias fue desplazada por bacterias anaerobias estrictas, como *Megasphaera* y *Pectinatus*^{15,19}. A su vez, se ha observado que algunos géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, como *Obesumbacterium*, *Hafnia*, *Klebsiella* y *Citrobacter*, son capaces de alterar el mosto y la cerveza en estadios tempranos de la fermentación^{33,35}.

En la elaboración de cerveza, la cepa de levadura utilizada para la fermentación es uno de los factores claves que influyen en el perfil de aromas y sabores. Las levaduras empleadas tradicionalmente en la elaboración de cerveza son cepas domesticadas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus*. Las primeras se emplean para fabricar cervezas de tipo Ale, ya que fermentan entre los 18 y 24 °C, y se suelen caracterizar por una mayor complejidad de aromas y sabores (*flavor*) frutales, florales o especiados. Por su parte, la especie híbrida *Saccharomyces pastorianus* (*S. cerevisiae* x *S. eubayanus*) se utiliza para producir cervezas de tipo Lager, que fermentan a bajas temperaturas (entre 5 y 15 °C) y resultan sensorialmente más

neutras⁴⁵. Dado el rol fundamental que tienen las levaduras en el perfil sensorial de la cerveza, es importante asegurar que la fermentación sea conducida solo por la levadura cervecera elegida⁴³.

La presencia de levaduras que no han sido inoculadas por el productor y que, por tanto, no están bajo su control, puede derivar en alteraciones de la cerveza; a estas se las considera «levaduras contaminantes». Las levaduras contaminantes se pueden dividir en dos grandes grupos: las del género *Saccharomyces* y las que pertenecen a otros géneros, como *Brettanomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Filobasidium*, *Zygosaccharomyces* y *Wickerhamomyces*, entre otros. Las contaminaciones causadas por levaduras pueden producir en la cerveza turbidez, fenoles, ésteres, alcoholes superiores, superatenuación y un exceso de carbonatación, entre otros efectos³⁶. En general, las contaminaciones causadas por levaduras pueden evidenciarse sensorialmente porque muchas de ellas (*Saccharomyces* y no *Saccharomyces*) producen compuestos fenólicos (POF+), como el 4-vinilguaiacol, 4-vinilfenol, 4-etilguaiacol y 4-etilfenol, a partir de la transformación de ácidos orgánicos como el cinámico, el ferúlico y el cumárico, presentes en la malta. Por el contrario, las levaduras cerveceras, salvo algunas excepciones, no son capaces de producir este tipo de compuestos (son POF-). Las levaduras contaminantes que pertenecen al género *Saccharomyces* representan el mayor riesgo debido a su similitud fisiológica y morfológica con la levadura inoculada, y su detección y control representan un gran desafío para las cerveceras⁴⁸. A diferencia de las levaduras cerveceras, muchas *S. cerevisiae* contaminantes (por ejemplo, las cepas diastáticas de *S. cerevisiae* previamente conocidas como variedad *diastaticus*) son capaces de metabolizar carbohidratos residuales de la cerveza, como dextrinas complejas y almidones, gracias a la enzima extracelular glucoamilasa, codificada por el gen *STA1*^{1,22,27}. Sin embargo, la presencia del gen *STA1* no siempre es indicativo de poder diastático, ya que se ha observado variabilidad en el metabolismo de estos azúcares e incluso incapacidad de consumir dextrinas, aun en presencia del citado gen^{1,22}.

Actualmente, el límite de tolerancia para la presencia de microorganismos contaminantes en cerveza es un tema en discusión. No existen especificaciones oficiales en el Código Alimentario Argentino respecto de criterios microbiológicos en cerveza, dado que se considera que estos influyen exclusivamente en la calidad del producto y no en su inocuidad, siempre que se cumplan los parámetros fisicoquímicos de alcohol y pH¹¹. Sin embargo, en la práctica, se considera que todo microorganismo contaminante presente en la cerveza representa un potencial riesgo para el producto¹⁸. Algunos autores proponen como límites de tolerancia para contaminantes microbianos en cerveza 0 a 50 UFC (unidades formadoras de colonias) por cada 100-200 ml de cerveza^{7,18}. Otros autores sugieren un límite de hasta 10 UFC/ml para bacterias ácido lácticas y acéticas y menor de 1 UFC/ml para levaduras contaminantes en la cerveza terminada^{16,34,50}.

En Argentina, pocas cerveceras establecen criterios microbiológicos y políticas que garanticen la calidad y estabilidad de sus productos. Además, la investigación en materia de ciencia y tecnología cervecera es muy reciente y la calidad microbiológica de la cerveza artesanal argentina está muy poco estudiada. En dicho contexto, y teniendo en cuenta que la Patagonia andina es uno de los principales

polos cerveceros del país, este trabajo tuvo como objetivo estudiar por primera vez la incidencia de contaminantes microbianos en las cervezas artesanales embotelladas producidas en la Patagonia andina. Para ello se planteó aislar e identificar los principales microorganismos involucrados y determinar posibles relaciones entre los eventos de contaminación y variables fisicoquímicas de la cerveza.

Materiales y métodos

Cervezas estudiadas

Se estudiaron 75 muestras de cervezas artesanales de múltiples estilos, producidas y embotelladas por 37 microcerveceras comerciales de 12 localidades andinas de la Patagonia. De norte a sur, las localidades y el número de muestras (entre paréntesis) fueron Caviahue (1), San Martín de los Andes (8), Villa La Angostura (4), Dina Huapi (3), San Carlos de Bariloche (27), El Bolsón (9), El Hoyo (3), Lago Puelo (3), Epuyén (6), Esquel (7), Trevelín (1) y Ushuaia (3), abarcando una distancia de 2.800 km entre las localidades más lejanas. Las cervezas estudiadas (no pasteurizadas) fueron elaboradas y analizadas durante la temporada primavera-verano de 2014-2015. Las muestras fueron obtenidas directamente de los productores o en locales de venta al público y conservadas a 4 °C hasta su análisis, por no más de un mes y antes de su fecha de caducidad.

Detección y cuantificación de microorganismos contaminantes

Se analizó la presencia de bacterias aeróbicas totales, bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras contaminantes en todas las muestras. La detección de bacterias totales se realizó en medio diferencial de Wallerstein (WLD) Sigma®. Se sembraron 100 µl de cerveza en superficie utilizando una espátula de Drigalski, y luego de 48-72 h a 30 °C, se realizó el recuento de UFC por ml de cerveza. Para la detección de BAL, se utilizó el medio de cultivo de Hsu semisólido para *Levilactobacillus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* (Siebel Institute's HLP)². Para esta determinación, se colocaron 14 ml del medio de cultivo y 1 ml de la muestra en tubos Falcon de 15 ml, la incubación fue a 30 °C durante 48-72 h. Transcurrido ese lapso, se determinó la presencia o ausencia de colonias dentro del tubo. Cabe mencionar que la detección de BAL utilizando HLP no permite el recuento de UFC, por lo que el recuento de bacterias se realizó únicamente sobre el medio de cultivo WLD.

Para la detección de levaduras contaminantes se inocularon 100 µl de la muestra mediante siembra en superficie en el medio de sulfato de cobre de Lin (LCSM)²⁴. Las placas se incubaron durante 48-72 h a 25 °C y luego se realizó el recuento de UFC/ml. Para descartar el posible crecimiento en LCSM de las principales levaduras cerveceras utilizadas en la región, se incluyeron como controles las cepas Safale s 04 (S-04) y Safale us 05 (US-05) de la marca Fermentis-Lesaffre y la cepa Nottingham de la marca Lallemand Brewing.

Se consideró que la muestra de cerveza estaba contaminada cuando el recuento de UFC fue mayor o igual a 10 UFC/ml en los medios sólidos o cuando se registró crecimiento de colonias en el medio semisólido HLP. Este límite

se eligió según lo sugerido por Hill¹⁶ para la detección de bacterias y se extrapoló para la detección de levaduras.

Análisis sensorial

Se realizó el análisis sensorial de las muestras de cerveza con el fin de detectar descriptores asociados a contaminación (presencia de fenoles, percibida como aroma a clavo de olor o establo, y de ácidos orgánicos, percibida como acidez), así como otros descriptores indeseados que reducen la tomabilidad de la cerveza, entre ellos diacetilo (aroma y sabor a manteca), compuestos sulfurados, como el dimetil sulfuro (DMS) (aroma y sabor a choclo, otras verduras hervidas y huevo) y acetaldehído (aroma y sabor a manzana verde), entre otros. Para esto se contó con personal entrenado en la cata de cerveza y se siguieron los lineamientos propuestos por la *American Society of Brewing Chemists*³.

Aislamiento y conservación de microorganismos contaminantes

Las bacterias y levaduras obtenidas a partir de los cultivos selectivos fueron conservadas a -80°C utilizando glicerol (20% v/v) como crioprotector. Estos microorganismos contaminantes fueron ingresados al cepario del Centro de Referencia en Levaduras y Tecnología Cervecera (CRELTEC), perteneciente al Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC), CONICET-UNComahue.

Identificación molecular

La identificación molecular de los microorganismos aislados se realizó mediante la secuenciación de genes ribosomales (ADNr). La extracción del ADN de bacterias y levaduras no sacaromícéticas se realizó a partir de un cultivo puro de 24-48 h, del cual se tomó una ansada de biomasa, que se resuspendió en 500 μl de EDTA 5 mM. Luego se centrifugó por 5 min a 8.000 rpm y se descartó el sobrenadante. El pellet obtenido se congeló a -80°C por 30 min y luego se colocó en baño termostático a 65°C . Se agregaron perlas de vidrio y 500 μl de buffer de lisis (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 2% Tritón X-100, 1% SDS) y 250 μl de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v). Se incubó en agitación durante 20 min y se separaron las fases mediante centrifugación (10 min a 13.000 rpm). Se recuperó la fase acuosa, se agregaron 2 vol de etanol al 70% (frío) y se incubó 30 min a -80°C para precipitar el ADN. Por último, se centrifugó durante 5 min a 13.000 rpm y se descartó el sobrenadante. El pellet de ADN se lavó con 500 μl de etanol absoluto frío y luego se resuspendió con 50 μl de agua libre de ADNasa/ARNasa.

Las bacterias fueron identificadas mediante la amplificación de la subunidad ribosomal 16S por PCR con los cebadores 27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1495r (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')²¹. La amplificación de 3 aislamientos bacterianos presentó resultados no concluyentes, por lo cual estos fueron identificados en el Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA, CONICET), según Nediani et al.³¹.

La identidad de las levaduras no sacaromícéticas se estudió mediante la amplificación de la región ITS del ARNr utilizando el cebador ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'), según White et al.⁵².

Los productos de amplificación de levaduras y bacterias fueron secuenciados por MacroGen Inc. (Corea). Las secuencias obtenidas se editaron manualmente y se compararon contra las secuencias tipo equivalentes en bases de datos públicas accesibles (GenBank) usando la herramienta computacional BLAST, disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>.

Las levaduras sacaromícéticas fueron identificadas genéticamente en un estudio previo, en el que se utilizó la técnica de *real time* PCR para la identificación a nivel de género y especie, seguida de la tipificación de la cepa por electroforesis capilar de amplicones del fragmento espaciador intergénico 2 (IGS2) del ARN ribosomal, según Latorre et al.²³.

Caracterización fisicoquímica

La caracterización fisicoquímica se realizó utilizando los métodos propuestos por la *American Society of Brewing Chemists* (ASBC). Para cada muestra, se determinó el pH⁴, las unidades internacionales de amargor (IBUs, por sus siglas en inglés)⁵ y el color⁶.

Se midió la concentración de los azúcares residuales en cada cerveza como medida indirecta del grado de atenuación (consumo de azúcares del mosto); este parámetro puede dar indicios de la eficiencia de la fermentación. La presencia de azúcares residuales (superior a 7 grados Brix) sugiere una fermentación deficiente, mientras que una superatenuación (por debajo de 4 grados Brix) puede sugerir la presencia de contaminantes, ya que las levaduras cerveceras no son capaces de fermentar, por ejemplo, las dextrinas (en general, 4% del extracto fermentable del mosto de cerveza). La concentración de azúcares residuales disueltos en la cerveza se midió utilizando un refractómetro de mano (Alla France-ATC), cuya unidad de medida son los grados Brix ($^{\circ}\text{Bx}$, g azúcar/100 g cerveza). En los casos en que se contaba con el dato de la densidad inicial, aportado por el productor, se realizó la corrección por presencia de alcohol del valor de lectura del refractómetro.

Se evaluó si existían correlaciones entre la presencia/ausencia de contaminación y las variables fisicoquímicas analizadas utilizando un modelo de regresión logística binomial y el paquete estadístico R-project³⁷. Se estableció el nivel de significación en valores de p inferiores a 0,01.

Resultados

De las 75 muestras analizadas, 52 (69,3%) evidenciaron crecimiento de microorganismos (> 10 UFC/ml de cerveza) en por lo menos uno de los medios de cultivo empleados para la detección de contaminantes cerveceros. Asimismo, 34 de las 75 cervezas estudiadas (45,3%) mostraron resultados positivos en el medio HLP, selectivo para BAL de los géneros *Levilactobacillus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Con la excepción de 2 muestras, todos los casos positivos en HLP también lo fueron en WLD, medio que permite la detección y

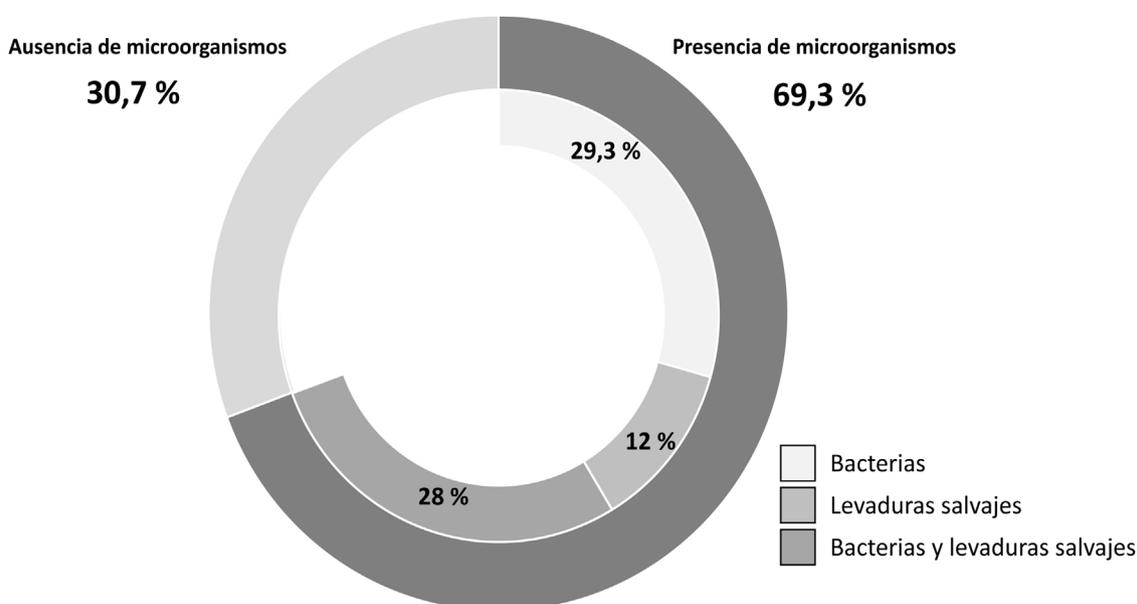


Figura 1 Incidencia de microorganismos contaminantes en 75 muestras de cerveza embotellada producidas por microcervecerías de la Patagonia andina, durante la primavera-verano de 2014-2015. Una cerveza se consideró contaminada cuando presentó > 10UFC/mL (en medio WLD para bacterias totales y LCSM para levaduras contaminantes) y/o cuando se detectó presencia de bacterias en el medio HLP.

el recuento de bacterias acéticas, de especies de *Flavobacterium*, *Proteus* y otras bacterias termofílicas, y de BAL. Se registraron 9 muestras positivas en el medio WLD que fueron negativas en el medio HLP, totalizando así 43 muestras con presencia de bacterias contaminantes (57,3%). En cuanto a la detección de levaduras contaminantes, se observó crecimiento de colonias en 31 cervezas (39,7%). En el 29,3% de las muestras se detectaron exclusivamente bacterias, mientras que el 12% presentó únicamente levaduras contaminantes y el 28% ambos tipos de microorganismos (fig. 1).

El número de colonias en las 41 muestras con crecimiento de bacterias en WLD varió desde 10UFC/ml hasta $2,1 \times 10^7$ UFC/ml. Por otro lado, las 31 muestras positivas para levaduras contaminantes presentaron valores de recuento que oscilaron desde 10UFC/ml hasta 1×10^4 UFC/ml (con un valor promedio de $1,2 \times 10^2$ UFC/ml).

Como análisis complementario a los estudios microbiológicos, las cervezas fueron evaluadas sensorialmente para detectar posibles defectos asociados a contaminaciones microbianas y luego agrupadas en 3 grupos, según los descriptores percibidos. Se detectó que el 54,7% de las cervezas catadas (41 de las 75) presentaban los descriptores básicos de contaminación que se consideran inaceptables para el estilo de cerveza definido por el productor y conformaron el grupo «acidez y/o fenoles» (fig. 2a), es decir, exhibían una acidez pronunciada (comúnmente asociada a la contaminación bacteriana) y/o aroma y sabor (*flavor*) a compuestos fenólicos (aromas especiados o a clavo de olor, normalmente atribuidos a contaminación por levaduras). El 25,3% de las cervezas (19 muestras) presentaron descriptores que podrían o no estar vinculados a eventos de contaminación («otros defectos»), pero que influyen de forma negativa en

la tomabilidad; estos fueron aroma y sabor a manteca (diacetilo), aroma y sabor a choclo (dimetil sulfuro) y huevo (compuestos sulfurados). El 20% (15/75) de las cervezas analizadas conformaron el grupo «sin defectos», ya que no se percibieron deméritos a nivel sensorial; sin embargo, se registró la presencia de contaminantes en 6 de las 15 muestras.

La figura 2b relaciona los resultados del análisis sensorial con el tipo de microorganismo encontrado. La presencia de acidez fue el principal descriptor que pudo asociarse con los casos de contaminación, ya que se percibió en el 75% de las muestras contaminadas solo con bacterias, en el 30% de las muestras contaminadas solo con levaduras y en el 50% de las muestras contaminadas con ambos tipos de microorganismos (fig. 2b). Por otro lado, la presencia del descriptor acidez no parece depender del número de UFC/ml registrado, ya que el valor promedio de UFC/ml en las muestras contaminadas exclusivamente con bacterias y que presentaron acidez no mostró diferencias significativas respecto del de las muestras contaminadas exclusivamente con bacterias que no presentaron dicho descriptor ($5,1 \times 10^5$ UFC/ml vs. $4,3 \times 10^6$ UFC/ml, respectivamente, $p=0,4145$). Tampoco se observaron diferencias entre las muestras con y sin acidez contaminadas únicamente con levaduras ($p=0,6112$). Sin embargo, la presencia de acidez parece estar vinculada con la presencia de BAL, ya que 13 de las 15 muestras con acidez registraron crecimiento de BAL (86,6%) en HLP, como se muestra en la figura 3. En el caso de las levaduras, la asociación con un descriptor particular no fue tan clara, ya que los deméritos asociados a cervezas contaminadas con levaduras exclusivamente pertenecen al grupo «otros defectos», entre los cuales los más destacados fueron DMS, diacetilo y sulfuros.

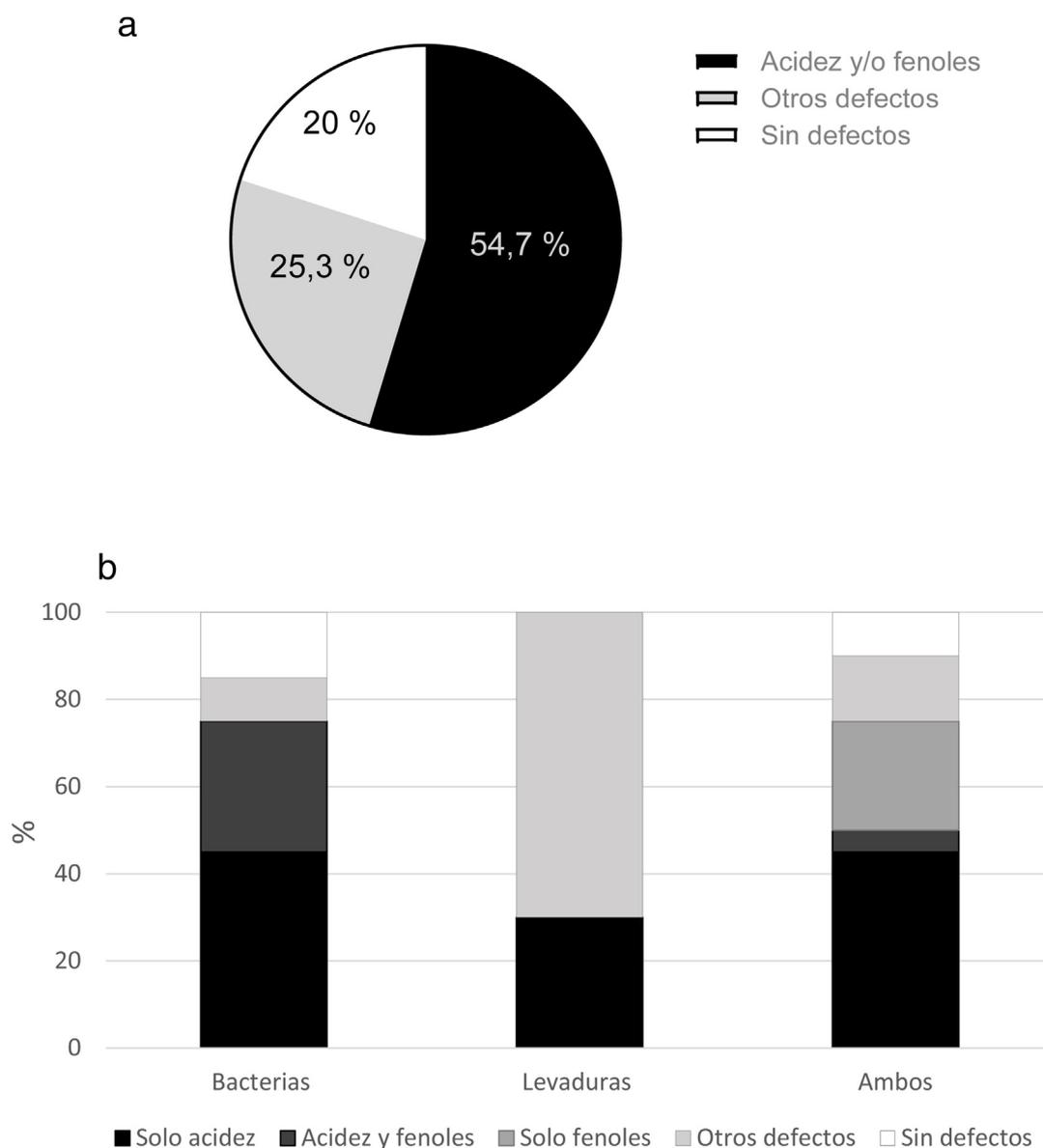


Figura 2 a) Resultados del análisis sensorial de 75 cervezas artesanales de la Patagonia andina. La categoría «acidez y/o fenoles» incluye las muestras que presentaron los descriptores comúnmente asociados a contaminación. La categoría «otros defectos» agrupa las muestras que presentaron defectos como DMS, diacetilo y sulfuros, y «sin defectos» hace referencia a las muestras que no presentaron deméritos sensoriales. b) Descriptores sensoriales hallados según el tipo de microorganismo contaminante encontrado en la cerveza.

Aislamiento e identificación molecular de bacterias

De las 43 cervezas que registraron crecimiento de bacterias fue posible obtener e identificar genéticamente 37 aislamientos bacterianos. Los resultados de identificación (tabla 1) mostraron que 18 aislamientos (48,6%) pertenecían a *Levilactobacillus brevis*, presente en el 24% de las muestras de cerveza analizadas. Un aislamiento adicional de bacteria ácido láctica (BC17) fue identificado como *Lactobacillus backii*.

El segundo grupo más representado correspondió al género de bacterias ácido acéticas *Acetobacter* sp., con 10 aislamientos (27%) presentes en el 13,3% de las muestras. En este género, no fue posible la identificación a

nivel de especie, ya que la comparación de las secuencias arrojó resultados ambiguos en 8 de los 10 aislamientos. Sin embargo, fue posible discriminar entre pares de especies. Así, los aislamientos BC29, BC35, BC45 y BC69 presentaron similitud con *Acetobacter malorum* y *A. cerevisiae*, los aislamientos BC31 y BC38 con *A. aceti* y *A. sicerae*, y los aislamientos BC43 y BC50 con *A. fabarum* y *A. lovaniensis*. El aislamiento BC41 presentó similitud con las especies *Asaia bogorensis* y *Asaia lannensis*, sin embargo, el porcentaje de identidad fue menor del 90%.

Un tercer grupo estuvo integrado por 5 enterobacterias, 3 de estos aislamientos fueron identificados como *Raoultella ornithinolytica* (BC23, BC25 y BC26) y provenían de la misma cervecería. Los otros dos correspondieron a dos cervecerías

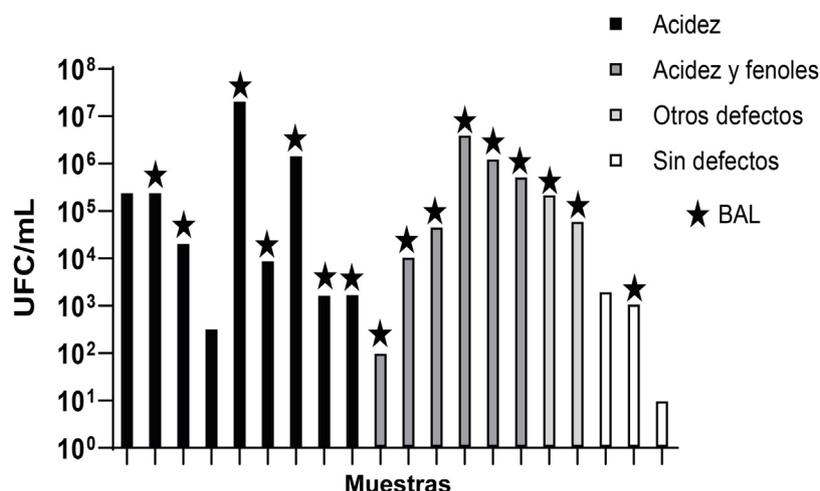


Figura 3 Recuentos de UFC/mL de muestras contaminadas únicamente con bacterias. El color de las barras revela los defectos percibidos sensorialmente y las estrellas indican la presencia de BAL en las muestras de cerveza.

distintas y se identificaron como *Cronobacter dublinensis* (BC81) y *Klebsiella oxytoca* (BC82). Las muestras de origen de estas enterobacterias se caracterizaron por poseer un pH elevado (4,42-4,89) en comparación con el promedio de cervezas analizadas ($4,42 \pm 0,27$). Por último, se obtuvieron aislamientos individuales pertenecientes a las especies *Pseudomonas hunanensis* y *Staphylococcus epidermidis*.

En la [tabla 1](#) se puede observar que algunas cervecerías presentaron diversidad de contaminantes en sus cervezas. Por ejemplo, de las 3 cervezas provenientes de la cervecería 14, se aislaron 3 especies bacterianas. Asimismo, se aisló el mismo microorganismo en diferentes muestras de la misma cervecería; por ejemplo, la cervecería 26 presentó contaminación con la misma bacteria en los 3 estilos de cerveza analizados.

Aislamiento e identificación molecular de levaduras contaminantes

De las 75 muestras analizadas, 31 registraron crecimiento de levaduras contaminantes, a partir de las cuales se aislaron e identificaron genéticamente 24. Dieciséis aislamientos (66,7%) provenientes de 10 cervecerías diferentes fueron identificados como *Saccharomyces* spp. sobre la base del análisis de las secuencias de la región ITS (LC16 cervecería 4, LC21 cervecería 8, LC23 cervecería 10, LC24 cervecería 10, LC25A cervecería 10, LC25B cervecería 10, LC26 cervecería 12, LC34 cervecería 12, LC35 cervecería 1, LC38 cervecería 15, LC42 cervecería 20, LC43 cervecería 20, LC45 cervecería 21, LC47 cervecería 23, LC50 cervecería 4, LC54 cervecería 33).

A su vez, se obtuvieron 8 levaduras no sacaromycéticas (33,3%) ([tabla 2](#)), 6 de ellas pertenecientes al filum Ascomycota, identificadas como *Wickerhamomyces anomalus*. Además, se identificaron aislamientos pertenecientes a las especies *Clavispora lusitaniae* y *Wickerhamiella pararugosa*, con un aislamiento cada una. Dos aislamientos pertenecieron al filum Basidiomycota y fueron identificados como *Trichosporon ovoides* y *Naganishia adeliensis*.

Como en el caso de las bacterias, se puede observar diversidad de levaduras contaminantes en una misma fábrica, como es el caso de la cervecería 14, que presentó 3 levaduras contaminantes de diferente especie, además de las 3 especies de bacterias mencionadas anteriormente.

Caracterización fisicoquímica de las cervezas y su relación con la presencia de contaminantes

Las cervezas estudiadas mostraron valores de pH entre 3,30 y 4,90, con un promedio de $4,42 \pm 0,27$. La presencia de contaminantes, en general (bacterias, levaduras o ambas), no mostró correlación con el pH ($p=0,0509$). Sin embargo, al analizar la relación entre el pH y la presencia de bacterias ácido lácticas (BAL), sí se observó correlación entre estos parámetros, con un nivel de significación de $p=0,003$ ([fig. 4](#)).

En cuanto a las unidades de amargor, las cervezas variaron entre 15 y 65 IBUs (en promedio, $23,41 \pm 10,55$ IBUs), y no se observó correlación entre la presencia de microorganismos contaminantes y el amargor de la cerveza ($p=0,5278$). En relación con el color, las muestras variaron entre 2 y 70 SRM (en promedio, $12,88 \pm 13,94$ SRM) y no se encontró correlación entre los eventos de contaminación y el color de la cerveza ($p=0,1570$). Tampoco se observó una correlación entre los solutos residuales medidos en grados Brix y la contaminación microbiana ($p=0,1224$).

Discusión

Este trabajo constituye el primer estudio formal que abarca la evaluación de la calidad microbiológica, fisicoquímica y sensorial de cervezas artesanales patagónicas, por lo que determina un punto de partida para entender y dimensionar la incidencia de esta problemática en las microcervecerías de la región.

La evaluación de la calidad microbiológica utilizando métodos tradicionales de cultivo evidenció la presencia de contaminantes en un gran número (ca. 70%) de las cervezas artesanales de la Patagonia andina producidas y envasadas durante la temporada 2014-2015. Esta incidencia de con-

Tabla 1 Identificación por secuenciación de la región 16S del ADN ribosomal de aislamientos bacterianos obtenidos de cervezas artesanales contaminadas

Grupo taxonómico	Especie	Cervecería de origen (n.º de aislamientos)	% identidad	Secuencia de comparación (GeneBank)	Código interno
Bacterias ácido lácticas (gram +)	<i>Levilactobacillus brevis</i>	2 (1), 4 (2), 6 (1), 9 (1), 14 (2), 21 (2), 22 (1), 24 (2), 25 (1), 26 (3), 29 (1), 30 (1)	> 99,28	LC062897.1 (JCM 1059T)	BC15, BC16, BC60, BC19, BC28, BC32, BC36, BC48, BC64, BC49, BC51, BC53, BC55, BC58, BC59, BC62, BC65, BC67 BC17
	<i>Lactobacillus backii</i>	4 (1)	99,91	NR_114385.1 (JCM 18665T)	
Bacterias ácido acéticas (gram -)	<i>Acetobacter malorum</i>	12 (1), 14 (1), 15 (1), 17 (1), 20 (1), 31 (1)	> 99,61	NR_113553.1 (JCM 17274T)	BC29, BC35, BC45, BC69, BC39, BC42
	<i>Acetobacter cerevisiae</i>			NR_113552.1 (JCM 17273T)	
	<i>Acetobacter fabarum</i>	18 (1), 24 (1)	> 99,71	NR_042678.1 (LMG 24244T)	BC43, BC50
	<i>Acetobacter lovaniensis</i>			NR_113551.1 (JCM 17121T)	
	<i>Acetobacter aceti</i>	14 (2)	> 99,25	NR_113673.1 (NBRC 14818T)	BC31, BC38
	<i>Acetobacter sicerae</i>			NR_133949.1 (LMG 1531T)	
	<i>Asaia bogorensis</i> <i>Asaia lannensis</i>	14 (1)	85,24	AP014690.1 (NBRC 16594T) NR_114144.1 (NBRC 102526T)	BC41
Otras bacterias	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	6 (3)	99,80	MH071137.1 (JCM 6096T)	BC23, BC25, BC26
	<i>Cronobacter dublinensis</i>	37 (1)	98,89	MF118668.1 (DSM 18707T)	BC81
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	33 (1)	99,89	NR_112010 (JCM 1665T)	BC82
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	28 (1)	99,89	KT989845.1 (ATCC 14990T)	BC63
	<i>Pseudomonas hunanensis</i>	4 (1)	99,51	JX545210.1 (LV 1247546 T)	BC18

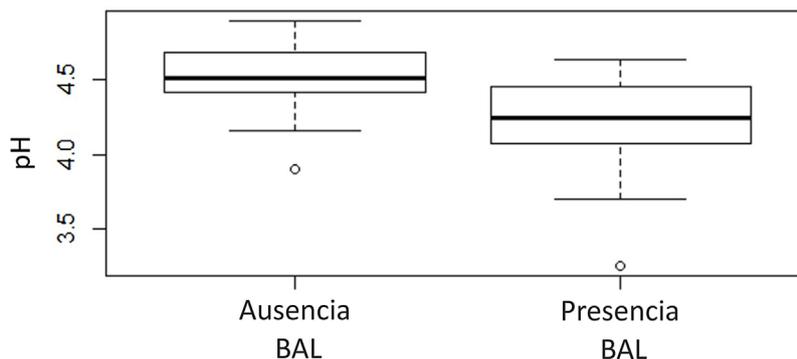


Figura 4 Relación entre el pH y la presencia/ausencia de bacterias ácido lácticas (BAL) en muestras de cerveza artesanal de la Patagonia andina.

Tabla 2 Identificación por secuenciación de la región ITS de levaduras no sacaromycéticas obtenidas de cervezas artesanales contaminadas

Grupo taxonómico	Especie	Cervecería de origen (n.º de aislamientos)	% identidad	Secuencia de comparación (GeneBank)	Código interno
Ascomycota	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	6 (1), 18 (1), 14 (1), 20 (1)	> 99,82	MH545921.1 (CBS 5759T)	LC 19, LC32, LC40, LC44
	<i>Clavispora lusitaniae</i>	6 (1)	100	MH545926.1 (CBS 6936T)	LC 18
	<i>Wickerhamiella pararugosa</i>	14 (1)	99,89	MH545932.1 (CBS 1010T)	LC 33
	<i>Trichosporon ovoides</i>	14 (1)	99	NR_073254.1 (CBS 7556T)	LC 31
Basidiomycota	<i>Naganishia adeliensis</i>	33 (1)	100	NR_111050.1 (CBS 8351T)	LC52

taminaciones es comparable con el valor del 73% informado recientemente para cervezas artesanales en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y Gran Buenos Aires¹³. La mayoría de las cervecerías implicadas en nuestro estudio presentaron al menos una cerveza con evidencias de contaminación, causada principalmente por bacterias (57,3%), aunque también se registró una elevada tasa de contaminaciones mixtas (bacterias y levaduras). Las cervezas contaminadas solo con levaduras fueron las minoritarias (12%). Los valores obtenidos, nuevamente, son comparables con los informados con anterioridad en Buenos Aires y denotan la importancia del control microbiológico y la falta de procedimientos adecuados para la limpieza y desinfección de las cervecerías artesanales argentinas.

Algunas cervecerías andino-patagónicas presentaron diversidad de contaminantes en sus cervezas, como es el caso de la cervecería 14. Ese resultado sugiere diversas fuentes o eventos de contaminación. Asimismo, se aisló el mismo microorganismo en diferentes muestras de una misma cervecería, por ejemplo, la cervecería 26 presentó contaminación con la misma bacteria en los 3 estilos de cerveza analizados. Esto indica que esas cepas se encuentran bien establecidas en la fábrica y se extienden a los diferentes lotes, posiblemente debido a la reutilización de levaduras cerveceras contaminadas o la mala sanitización de superficies en las líneas de circulación de mosto, cerveza o equipos de producción. Por otro lado, se constató que las cervezas contaminadas presentaron, en general, valores de carga microbiana muy superiores a los valores menos exigentes recomendados en cerveza (de hasta 10 UFC/ml), incluso excedieron ampliamente los límites más exigentes (< 1 UFC/ml)^{16,34}.

El análisis sensorial puso en evidencia que las contaminaciones microbianas tienen un impacto considerable a nivel organoléptico, ya que en más de la mitad de las cervezas estudiadas se detectaron descriptores negativos, como acidez y aromas y sabores fenólicos. Estos defectos estuvieron correlacionados con la presencia de bacterias y levaduras contaminantes. Asimismo, Moretti³⁰ confirmó que la presencia de BAL, aun en bajas

densidades celulares (< 1 UFC/ml), causa defectos sensorialmente notables.

El resto de los defectos sensoriales registrados en este trabajo correspondieron a descriptores que podrían o no estar vinculados a una contaminación, pero igualmente influyeron de forma negativa en la tomabilidad de la cerveza. Las cervezas que no presentaron defectos sensoriales, pero sí contaminantes (6 cervezas), pertenecían a estilos de cerveza con caracteres y sabores fuertes, que pudieron haber enmascarado los efectos causados por la contaminación. Por ejemplo, de las 6 muestras en esta situación, 3 cervezas pertenecían al estilo Indian Pale Ale (IPA), con alto grado de amargor (45-65 IBUs) y con elevada presencia de lúpulo en aroma; una al estilo Dubbel, de origen belga, con alta graduación alcohólica y fuertes notas frutales y especiadas; y las dos restantes al estilo Strong Ale. La aparición de indicadores sensoriales asociados a contaminantes en el producto terminado y su correlación con los resultados de los análisis microbiológicos demuestran la utilidad del análisis sensorial como herramienta complementaria para la detección de contaminaciones, aunque en el caso de los estilos con caracteres fuertes o con alta graduación alcohólica, los defectos pueden verse enmascarados.

La utilización de medios selectivos para la detección de bacterias contaminantes permitió el aislamiento de BAL en el 25,3% de las muestras, valor similar al encontrado por Menz et al.²⁹ en cervezas artesanales de Australia (27,5%). En Italia, se ha reportado la presencia de BAL en el 41% de las cervezas artesanales³⁰ y en el 15% en EE. UU.⁵¹. Estos datos, en su conjunto, confirman que las BAL dominan los eventos de contaminación a nivel mundial y que las cervezas de la Patagonia andina responden a ese mismo patrón.

La identificación molecular confirmó que *L. brevis* es la especie que predomina en las cervezas contaminadas con bacterias, en coincidencia con lo descrito por Suzuki⁴⁸. Dicho autor mostró que *L. brevis* fue y sigue siendo la principal bacteria que contamina la cerveza en Europa; esta se halló en el 26-51% de los incidentes de contaminación, según múltiples estudios realizados entre 1980 y 2016.

Lactobacillus backii también es una bacteria descrita frecuentemente en los incidentes de contaminación^{8,40}, aunque en este trabajo estuvo representada por un solo aislamiento.

El segundo grupo de bacterias halladas con alta frecuencia en este trabajo estuvo conformado por miembros del género *Acetobacter*. Esto indica que las microcervecías de la Patagonia andina no cuentan con el equipamiento adecuado para impedir el ingreso de oxígeno en el proceso de producción o en la etapa de envasado, a fin de reprimir el crecimiento de estos microorganismos, aerobios obligados. Este tipo de bacterias poseen un rol importante en la formación de biopelículas^{32,44}, los cuales, debido a su mayor resistencia a la limpieza mecánica y química¹⁹, actúan como reservorio de otros microorganismos contaminantes⁴². Con la información proporcionada por la secuenciación de la región 16S fue posible determinar al menos 3 tipos de *Acetobacter* diferentes que afectaron a las cervezas patagónicas. Su identificación a nivel de especie requiere del análisis de secuencias de otras regiones del ADN¹⁰.

En tercer lugar, se aislaron bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, las cuales funcionan como indicadores del nivel de higiene y sanitización en las plantas de producción, debido a que normalmente son sensibles al etanol y a pH bajos²⁸. Por esta razón, algunas enterobacterias como *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Escherichia* y *Klebsiella* normalmente no son capaces de desarrollarse en la cerveza terminada^{28,29,33}, pero en algunos casos pueden sobrevivir por tiempos prolongados en el producto si hubo reproducción en las etapas iniciales de la fermentación²⁸. Por ejemplo, enterobacterias patógenas como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* son capaces de sobrevivir hasta 30 días cuando se las conserva a 4°C, incluso en presencia de un 5% de alcohol, o hasta 20 días a un pH inferior a 4²⁸. Esto explicaría el aislamiento de enterobacterias en las cervezas analizadas en este trabajo, que presentaron densidades finales elevadas (y, por lo tanto, valores de alcohol menores de lo esperado) o pH relativamente altos (4,4-4,9), o ambos atributos, que son indicativos de fermentaciones ineficientes o inconclusas. Estas situaciones atentan contra la calidad y, sobre todo, contra la inocuidad de la cerveza artesanal, al no generarse las barreras fisicoquímicas normales de la cerveza, principalmente los niveles de alcohol y pH adecuados.

En relación con la identificación de levaduras, más de la mitad de los aislamientos obtenidos en medio LCSM correspondieron al género *Saccharomyces*, y todos ellos fueron confirmados como pertenecientes a la especie *S. cerevisiae* mediante métodos moleculares en un trabajo complementario, que incluyó su clasificación a nivel de cepa, lo que nos permitió verificar que no se trataba de cepas cerveceras comerciales²³. En consonancia con nuestros hallazgos, Suzuki⁴⁸ informó que en el período 1992-2002, el género *Saccharomyces* fue el dominante en los incidentes de contaminación en Europa. Por otro lado, se pudo determinar que muchas de esas cepas (68%) corresponden a cepas diastáticas de *S. cerevisiae*, ya que se comprobó la presencia del gen *STA1*, involucrado en el metabolismo de dextrinas²³.

La levadura *Wickerhamomyces anomalus* fue la levadura salvaje no sacaromícetica más frecuente en las muestras contaminadas. Esta levadura ascomícetica es comúnmente aislada de cerveza y otras bebidas^{17,39}. También se la ha observado como levadura dominante en las biopelículas de

superficies de acero de los equipos en las líneas de llenado de cerveza⁴². La importancia de las contaminaciones con *W. anomalus* radica en que se trata de una levadura que produce significativas cantidades de acetato de isoamilo (asociado con descriptores como banana), acetato de etilo (manzana roja) y ácido acético, lo que redundará en notorios defectos en las cervezas que contamina³⁹. Sin embargo, no fue posible correlacionar directamente estos descriptores con *W. anomalus*, ya que las muestras de origen contenían otros microorganismos que podrían haber enmascarado el *flavor* esperado para cervezas contaminadas con esta levadura. El resto de las levaduras no sacaromícéticas identificadas estuvieron representadas por un solo aislamiento, correspondiente a levaduras no frecuentes en eventos de contaminación cervecera.

Aunque los tipos de cerveza tradicionales todavía dominan el mercado, actualmente existe una tendencia que empuja a las cervecías al desarrollo de productos novedosos⁹. En este sentido, la venta de cervezas no convencionales, cervezas ácidas, cervezas bajas en calorías y cervezas sin alcohol aumentó significativamente. Los aislamientos obtenidos en este trabajo fueron incorporados a la colección microbiana del IPATEC y representan un gran recurso, tanto para el diseño de estrategias de detección y control de microorganismos contaminantes como para profundizar en el estudio de su fisiología, características genéticas y potencial para la innovación cervecera.

De los análisis fisicoquímicos realizados, solo el pH demostró ser un parámetro que se correlaciona con la presencia de BAL, lo que señala su relevancia como herramienta complementaria y accesible para el control de calidad frente a las principales bacterias contaminantes. El resto de los parámetros fisicoquímicos evaluados en este trabajo no se correlacionaron con los eventos de contaminación.

Conclusiones

Nuestros resultados muestran que 8 de cada 10 fábricas de cerveza artesanal de la Patagonia andina argentina presentaron problemas de contaminación, lo que sugiere que la presencia de bacterias y levaduras es una problemática común en estas microcervecías y pone en evidencia la necesidad de implementar o ajustar sus protocolos de calidad. Los aislamientos de bacterias y levaduras contaminantes obtenidos en este trabajo conforman la primera colección de microorganismos contaminantes de cerveza de la Patagonia andina y servirán como punto de partida para el diseño de estrategias de detección y control de contaminantes cerveceros. Asimismo, contribuirán a la optimización de los procesos de pasteurizado. Dado que actualmente existe una tendencia a elegir bacterias y levaduras «no convencionales» que aumenten el *bioflavoring*⁹, algunos de los géneros de levaduras y bacterias encontrados en este trabajo podrían ser de interés para producir nuevos estilos de cerveza, con el objetivo de fomentar la innovación y la diferenciación productiva.

Financiación

Este estudio fue financiado con fondos provenientes del CONICET (PIP 424), FONCyT (PICT 3677), UNComahue

(B199), SPU (proyecto Amilcar Herrera «Contaminaciones microbianas en la producción de cerveza artesanal: desarrollo de estrategias de control microbiológico y transferencia a micro-cervecerías», Ministerio de Educación, UNComahue 2014 y Diseño productivo «Contaminantes en Cerveza», Ministerio de Educación, UNComahue 2014.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Agradecimientos

Agradecemos a los productores de cerveza artesanal de la Patagonia andina, quienes aportaron muchas de las cervezas para realizar el estudio y a los colegas del CRELTEC, quienes siempre mostraron su predisposición para ayudar en la realización del trabajo.

Bibliografía

1. Abbet M. Understanding the emerging beer spoilage yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*. Master thesis in Biotechnology. Sweden: Department of Biology and Biological Engineering, Chalmers University of Technology in collaboration with Craft Labs HB Gothenburg; 2019.
2. American Society of Brewing Chemists. Microbiological control 5: Differential Culture Media. Methods of Analysis.; 14th edition, 2011; St. Paul, MN, EE.UU.
3. American Society of Brewing Chemists. Sensory analysis. Methods of Analysis; 14th edition, 2011; St. Paul, MN, EE.UU.
4. American Society of Brewing Chemists. Beer 9: Hydrogen ion concentration. Methods of Analysis; 14th edition, 2011; St. Paul, MN, EE.UU.
5. American Society of Brewing Chemists. Beer 23: Beer bitterness. Methods of Analysis; 14th edition, 2011; St. Paul, MN, EE.UU.
6. American Society of Brewing Chemists. Beer 10: Color. Methods of Analysis, 14th edition, 2011; St. Paul, MN, EE.UU.
7. Back W. Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology, Carl Fachverlag H, editor. Nuremberg, Germany, 2005, p. 317.
8. Bohak I, Thelen K, Beimfohr C. Description of *Lactobacillus backi* sp. nov., an Obligate Beer-Spoiling Bacterium. *Monatsschrift Brauwiss.* 2006;60:78–82.
9. Burini JA, Eizaguirre JI, Loviso C, Libkind D. Levaduras no convencionales como herramientas de innovación y diferenciación en la producción de cerveza. *Rev Argent Microbiol.* 2021;440:1–19, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2021.01.003>.
10. Cleenwerck I, De Vos P, De Vuyst L. Phylogeny and differentiation of species of the genus *Gluconacetobacter* and related taxa based on multilocus sequence analyses of housekeeping genes and reclassification of *Acetobacter xylinus* subsp. *sacrofermentans* as *Gluconacetobacter sacrofermentans* (Toyosaki et al., 1996) sp. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60:2277–83, <http://dx.doi.org/10.1099/ijms.0.018465-0>.
11. Código Alimentario Argentino. Artículo 1082 bis, expediente N.º 1-0047-2110-4317-13-2.
12. Colino E, Civitaresi HM, Capuano A, Quiroga JM, Winkelman B. Análisis de la estructura y dinámica del complejo cervecero artesanal de Bariloche, Argentina. *Rev Pilquen Univ Nac Comahue.* 2017;20:79–91.
13. Duhourq I, Eizaguirre JI, Bruzone C, Aguilar P. Incidencia de microorganismos contaminantes en cervezas artesanales de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y gran Buenos Aires. *Yeast contaminants: detection and control. International Workshop on Brewing Yeast.* p 43. Bariloche, Argentina. 2021.
14. Giovenzana V, Beghi R, Guidetti R. Rapid evaluation of craft beer quality during fermentation process by vis/NIR spectroscopy. *J Food Eng.* 2014;142:80–6, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.06.017>.
15. Haikara A, Helander I. *Pectinatus*, *Megasphaera* and *Zymophilus*. *Prokaryotes.* 2006;4:965–81.
16. Hill AE. Traditional methods of detection and identification of brewery spoilage organisms. En: Hill AE, editor. *Brewing microbiology: managing microbes. Ensuring quality and valorising waste.* Sawston, Cambridge: Woodhead Publishing; 2015. p. 271–286, <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00013-7>.
17. Hutzler M, Riedl R, Koob J, Jacob F. Fermentation and Spoilage Yeasts and their Relevance for the Beverage Industry – A Review. *Brew Sci.* 2012;65:21.
18. Jespersen L, Jakobsen M. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int J Food Microbiol.* 1996;33:139–55.
19. Juvonen R. Strictly anaerobic beer-spoilage bacteria. En: Hill AE, editor. *Brewing Microbiology: Managing Microbes. Ensuring Quality and Valorising Waste.* 1th edition. Woodhead. Publishing Series in Food Science. Technology and Nutrition. Elsevier; 2015. p. 195–218.
20. Kaderian SM. Lo artesanal como mediación técnica y simbólica. *Cultura, identidad local y aprendizaje en la cerveza artesanal de Bariloche, Argentina.* *Rivar.* 2018;5:39–63.
21. Kolbert C, Persing D. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol.* 1999;2:299–305, [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80052-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80052-6).
22. Krogerus K, Magalhães F, Kuivanen J, Gibson B. A deletion in the STA1 promoter determines maltotriose and starch utilization in STA1+ *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103:7597–615, <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-019-10021-y>.
23. Latorre M, Hutzler M, Michel M, Zarnkow M, Jacob F, Libkind D. Genotypic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* spoilers in a community of craft microbreweries - Yeast-Special. *Brew Sci.* 2020;73:51–7, <http://dx.doi.org/10.23763/BrSc20-06latorre>.
24. Lin Y. Formulation and testing of cupric sulphate medium for wild yeast detection. *J Inst Brew.* 1981;87:151–4.
25. Lugones G, Britto F, Carro A, Lugones M, Quiroga J, Reinoso L, Monasterios C, Serovic LB. Asociación ciencia-empresa para la “domesticación” de la levadura andina y la introducción de mejoras en la producción de cerveza. En: Lugones G, Ladenheim R, editores. *Estudio sobre casos exitosos de Vinculación y Transferencia entre grupos de investigación y el medio socioproductivo CASO 3.* 1.ª edición Ciudad Autónoma de Buenos Aires: CIECTI; 2019. p. 1–65.
26. Manzano M, Iacumin L, Vendrames M, Cecchini F, Comi G, Buiatti S. Craft Beer Microflora Identification Before and After a Cleaning Process. *J Inst Brew.* 2011;117:343–51, <http://dx.doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00478.x>.
27. Meier-Dörnberg T, Hutzler M, Michel M, Methn F, Jacob F. The Importance of a Comparative Characterization of *Saccharomyces Cerevisiae* and *Saccharomyces Pastorianus* Strains for Brewing. *Fermentation.* 2017;3:41, <http://dx.doi.org/10.3390/fermentation3030041>.
28. Menz G, Aldred P, Vriesekoop F. Growth and Survival of Foodborne Pathogens in Beer. *J Food Prot.* 2011;74:1670–5, <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-546>.
29. Menz G, Andrighetto C, Lombardi A, Corich V, Aldred P, Vriesekoop F. Isolation, Identification, and Characterization of Beer-Spoilage Lactic Acid Bacteria from Microbrewed Beer from Victoria, Australia. *J Inst Brew.* 2010; 116:14–22.

30. Moretti E. Development of guidelines for microbiological control in microbrewery. PhD Course in Food Sciences. Italy: University of Bologna; 2013.
31. Nediani M, García L, Saavedra L, Martínez S, López Alzogaray S, Fadda S. Adding Value to Goat Meat: Biochemical and Technological Characterization of Autochthonous Lactic Acid Bacteria to Achieve High-Quality Fermented Sausages. *Microorganisms*. 2017;5:26, <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms5020026>.
32. Paradh A. Gram-negative spoilage bacteria in brewing. En: Hill AE, editor. *Brewing Microbiology: Managing Microbes. Ensuring Quality and Valorising Waste*. 1th edition Woodhead. Publishing Series in Food Science. Technology and Nutrition. Elsevier; 2015. p. 175–94.
33. Paradh A, Hill AE. Review: Gram Negative Bacteria in Brewing. *Adv Microbiol*. 2016;6:195–209, <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2016.63020>.
34. Pellettieri M. *Quality Management: Essential Planning for Breweries*. Boulder, Colorado: Brewers Publications; 2015. p. 196.
35. Priest FG. Microbiology and Microbiological Control in the Brewery. En: Priest FG, Stewart GG, editores. *Handbook of Brewing*. 2nd edition Boca Raton: CRC Press; 2006. p. 607–19.
36. Priest FG, Campbell I. *Brewing Microbiology*. 3rd edition New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher; 2003. p. 1–399, <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-9250-5>.
37. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2018. Disponible en: <https://www.R-project.org/>
38. Sakamoto K, Konings WN. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *Int J Food Microbiol*. 2003;89:105–24, [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00153-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00153-3).
39. Satora P, Tarko T, Sroka P, Blaszczyk U. The influence of *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast on the fermentation and chemical composition of apple wines. *FEMS Yeast Res*. 2014;14:729–40, <http://dx.doi.org/10.1111/1567-1364.12159>.
40. Schneiderbanger J. Occurrence, Detection, Characterization and Description of Selected Beer-Spoilage Lactic Acid Bacteria. Technische Universität München. Forschungszentrum Weihenstephan für Brau- und Lebensmittelqualität. 2019.
41. Schneiderbanger J, Grammer M, Jacob F, Hutzler M. Statistical evaluation of beer spoilage bacteria by real-time PCR analyses from 2010 to 2016: Statistical evaluation of beer spoilage bacteria by real-time PCR analyses from 2010 to 2016. *J Inst Brew*. 2018;124:173–81, <http://dx.doi.org/10.1002/jib.486>.
42. Shabani L, Devolli A. Microbial spoilage in processing by biofilm. 4th International Symposium of Ecologists of Montenegro, ref. 11. *Natura Montenegrina*. 2010;9:655–62.
43. Spedding G, Aiken T. Sensory analysis as a tool for beer quality assessment with an emphasis on its use for microbial control in the brewery. En: Hill A, editor. *Brewing Microbiology: Managing Microbes. Ensuring Quality and Valorising Waste*. Cambridge: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Elsevier Ltd; 2015. p. 375–404.
44. Storgårds E, Tapani K, Hartwall P, Saleva R, Suihko M-L. Microbial Attachment and Biofilm Formation in Brewery Bottling Plants. *J Am Soc Brew Chem*. 2006;64:8–15, <http://dx.doi.org/10.1094/ASBCJ-64-0008>.
45. Stewart GG, Hill AE, Russell I. 125th Anniversary Review: Developments in brewing and distilling yeast strains. *J Inst Brew*. 2013;119:202–20.
46. Suzuki K. 125th Anniversary Review: Microbiological Instability of Beer Caused by Spoilage Bacteria. *J Inst Brew*. 2011;11:131–55, <http://dx.doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00454.x>.
47. Suzuki K. Gram-positive spoilage bacteria in brewing. En: Hill AE, editor. *Brewing Microbiology: Managing Microbes. Ensuring Quality and Valorising Waste*. 1th edition. Cambridge: Woodhead Publishing Series in Food Science. Technology and Nutrition. Elsevier; 2015. p. 141–73.
48. Suzuki K. Emergence of New Spoilage Microorganisms in the Brewing Industry and Development of Microbiological Quality Control Methods to Cope with This Phenomenon: A Review. *J Am Soc Brew Chem*. 2020;78:245–59, <http://dx.doi.org/10.1080/03610470.2020.1782101>.
49. Toncek A. *Cervezas de los Andes*. Río Negro, Argentina: Editorial Caleuche; 2016.
50. Van der Aa Kühle A, Jespersen L. Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. *Int J Food Microbiol*. 1998;43:205–13, [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00113-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00113-5).
51. White C. Analysis of the First Large-Scale Testing of Craft Beer. *Tech Q Master Brew Assoc Am*. 2008;45:13–6.
52. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editores. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York: Academic Press, Inc. Elsevier; 1990. p. 315–22.
53. Winkelman B I. Análisis del sector cervecero artesanal en San Carlos de Bariloche, bajo el enfoque de sistemas agroalimentarios localizados, Tesis de Licenciatura en Economía, 2018. Universidad Nacional de Río Negro, Río Negro, Argentina.
54. Zanotti G. Cervezas artesanales: rentabilidad cayó fuerte por recesión, pero sigue el auge, *Revista de Economía Ámbito*. 2018 [consultado Abr 2021]. Disponible en: <https://www.ambito.com/economia/cerveza/s-artesanales-rentabilidad-cayo-fuerte-recesion-pero-sigue-el-auge-n5007823>