

12
29



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

Facultad de Química

**ALTERACIONES CAUSADAS POR LA CONTAMINACION DE
ALGUNOS GENEROS BACTERIANOS DURANTE EL PROCESO
DE FABRICACION DE LA CERVEZA Y METODOS
PREVENTIVOS**

**TRABAJO MONOGRAFICO
DE ACTUALIZACION**

ANA MARIA CASO MARASCO

Carrera: Químico Farmacéutico Biólogo



México, D. F.

1988



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	PAGINA
1.- INTRODUCCION	1
2.- OBJETIVOS	2
3.- GENERALIDADES	3
3.1.- Historia	3
3.2.- Fabricación de Cerveza	5
3.2.1.- Materias Primas	5
3.2.2.- Fabricación	6
4.- BACTERIAS CONTAMINANTES DURANTE EL PROCESO DE FABRICACION DE LA CERVEZA.	10
4.1.- Introducción	10
4.2.- Grupo del Acido Láctico	10
4.2.1.- <u>Lactobacillus</u>	10
4.2.2.- Importancia del <u>Lactobacillus</u> en la Industria de la Cerveza.	11
4.3.- Género <u>Pediococcus</u>	18
4.3.1.- Características Generales	18
4.3.2.- El <u>Pediococcus</u> y su Actividad en la Industria Cervecera.	19
4.4.- Género <u>Obesumbacterium</u>	24
4.4.1.- Características Generales	24
4.4.2.- Importancia en la Industria de la Cerveza.	25
4.5.- Género <u>Enterobacter</u>	32
4.5.1.- Características Generales	32
4.5.2.- El <u>Enterobacter</u> y su Importancia en la Industria de la Cerveza	33
4.6.- Género <u>Zimomona</u>	41
4.6.1.- Características Generales	41
4.6.2.- Las <u>Zimomonas</u> en la Industria de la Cerveza.	42

	PAGINAS
4.7.- Bacterias del Acido Acético.	47
4.7.1.- Características Generales	47
4.7.2.- Bacterias del Acido Acético como Organismos Contaminantes de la Cerveza.	49
4.8.- Pectinatus	54
4.8.1.- Características Generales	54
4.8.2.- <u>Pectinatus</u> como Bacteria Contaminante de la Cerveza	56
5.- CONTROL Y DETECCION DE MICROORGANISMOS CONTAMINANTES EN LA INDUSTRIA DE LA CERVEZA	60
5.1.- Introducción	60
5.2.- Control de Laboratorio	61
5.3.- Medios de Cultivo Utilizados en el Aislamiento de Bacterias Contaminantes de la Cerveza	66
5.4.- Prevención de la Contaminación	70
5.4.1.- Detergentes y Esterilizantes	72
6.- CONCLUSIONES	76
BIBLIOGRAFIA	78

1.- Introducción:

1.1.- La cerveza es una bebida de bajo grado alcohólico cuya fabricación se basa en la fermentación de azúcares utilizando levaduras, las cuales convierten dichos azúcares en alcohol y bioxido de carbono, como productos más importantes.

Siendo la cerveza una de las bebidas más consumidas y preferidas en todo el mundo, cada día el consumidor exige un producto de mejor calidad. Por esta razón la industria de la cerveza ha mejorado sus métodos de producción de manera considerable debido a un aumento en la demanda, sin embargo la contaminación bacteriana que se presenta durante el proceso de la fabricación de la cerveza no ha podido ser erradicado del todo debido al alto costo que ésto significa y también por tenerse un conocimiento incompleto de los microorganismos que contaminan a la cerveza tanto en los diferentes pasos de su fabricación como durante su almacenaje y venta.

En este estudio, se hace una recopilación de la información conocida actualmente sobre estos microorganismos, sus características, metabolitos que producen y algunos métodos de control con el objeto de facilitar este conocimiento a las personas que colaboran en el proceso de manufactura de la cerveza y también para sentar las bases de una investigación que debe continuar para un mejor conocimiento en cuanto a la obtención de un producto de mejor calidad, debido a un control microbiológico más estricto, fácil de realizar, rápido y menos costoso.

2.- Objetivos:

2.1.- Este trabajo consiste en una recopilación concerniente a los microorganismos contaminantes durante la fabricación de la cerveza.

2.2.- Consideramos que es importante dar a conocer lo último que se conoce en relación a los microorganismos que contaminan este productos y algunos de los métodos empleados para su control prevención y eliminación.

2.3.- Dado que los microorganismos viven con nosotros en donde quiera que estamos, ya sea para bien o para mal, nos vemos en la necesidad de conocerlos desde el punto de vista científico, epidemiológico y biotecnológico.

2.4.- Aunque actualmente se cuenta con cervecerías muy bien equipadas, usando la materia prima más apropiada y teniendo a su disposición métodos de detección de microorganismos nocivos, los problemas causados por la presencia de bacterias han sido disminuidos pero no eliminados.

2.5.- Este trabajo se propone dar una descripción de los efectos que producen los microorganismos ajenos a la producción de la cerveza sobre su sabor, olor y aspecto.

Estos daños producidos por estas bacterias son causados principalmente por los productos que ellas elaboran durante su metabolismo, gracias a la adecuada composición de nutrientes en las materias primas utilizadas para la fabricación de la cerveza.

2.6.- Espero que el presente trabajo sea de utilidad y despierte el interés de nuestros investigadores para mejorar aún más la industria mexicana de la cerveza, que tanto éxito tiene en nuestro país y en los lugares a donde se exporta actualmente.

3.- GENERALIDADES:

3.1.- Historia: (2)

Remontandonos muy atras en la prehistoria hay pruebas de que el hombre fermentó sustancias naturales que contenían azúcar mucho antes de que aprendiera a cocer el pan y a fabricar cerveza a base de granos.

Podemos decir que el hombre fermentó uva antes de fermentar granos.

Nadie puede estimar con precisión exactamente cuando comenzó el hombre a usar por primera vez dichas bebidas fermentadas, pero se ha estimado que fué por lo menos ha ce 30,000 años.

Los artefactos extraídos de las ruinas de ciudades antiguas prueban que fabricar cerveza era una costum bre establecida hace más de 5000 años, menciona cerveza hecha de cebada.

Numerosos escritos y dibujos se han recuperado del antiguo egipto, con detalles de la fabricación comercial de la cerveza y de la distribución de ésta a través del comercio.

Los monasterios y otros establecimientos cerveceros producían cerveza, durante la época medieval, en una forma que no difería mayormente de la que usamos ahora, empleando cebada malteada y lúpulo. Las bebidas hechas a base de granos fermentados, sin embargo, no datan de la época medieval. Ellas se remontan muy atrás a la historia del hombre. (2).

Un tipo de fabricación de bebida alcohólica a base de maíz se practicaba en América probablemente durante miles de años de que Colón hiciera su viaje. El maíz era molido mezclado con agua y fermentado para producir una bebida alcohólica.

La primera cervecería de las Américas fué construida en 1544 por Don Alfonso de Herrera cerca de la Ciudad de México.

En los archivos nacionales de la Ciudad de México, hay un documento firmado por Don Antonio de Mendoza dándole al señor Herrera permiso para que construya su cervecería. La fecha de este permiso fué el 12 de diciembre de 1543. El documento registra el nombramiento del primer funcionario encargado del impuesto al alcohol, Don Hernando de Pabio. "fiel servidor del rey", recibió así un sueldo de 200 pesos en oro para asegurar que el rey obtuviese su tercio.

Con el auge de los descubrimientos geográficos en América la industria cervecera empieza a extenderse a través de este continente.

Y es así como nacen muchas fábricas de cerveza, que dependiendo del grado de desarrollo alcanzado en cada país se ha ido modificando el equipo empleado en las diferentes fábricas, pero el proceso en sí ha tenido pocas variantes.

3.2.- Fabricación de la cerveza: (2)

3.2.1.- Materias primas:

Agua:

El agua ejerce una influencia decisiva en el proceso de elaboración y en la calidad del producto terminado, debe estar libre de cualquier contaminante químico o biológico, ser transparente sin olor ni color, no debe tener materias suspendidas ni materias orgánicas descompuestas.

El agua puede ser obtenida de las siguientes fuentes: Agua de superficies o vertientes (ríos, lagos etc) y agua subterránea.

Los mantos subterráneos son las fuentes más puras de agua, las que se obtienen a través del bombeo de pozos profundos, sin embargo requieren de cierto tratamiento para ser utilizadas en esta industria. Las otras fuentes requieren de un mayor tratamiento.

Malta:

La malta proviene de la germinación controlada de la cebada (planta herbácea de hojas bastante estrechas y de color verde, de la familia de las gramíneas).

Una vez cosechada, la cebada es limpiada para eliminar semillas extrañas, granos rotos, etc. y es almacenada en bodegas para granos, adecuadas.

El proceso por el cual la cebada es convertida en malta, recibe el nombre de malteo el cual se divide en tres etapas principales: Remojo, germinación y secado.

Remojo: El remojo se realiza en grandes tanques cilíndricos provistos de regaderas con el objeto de humedecer el grano lo necesario para la germinación.

Germinación: En la germinación los granos crecen bajo condiciones estrictamente controladas de temperatura, humedad, tiempo de germinación y oxígeno.

Secado: El grano germinado es secado por medio de aire caliente y con el objeto de producir el sabor,

aroma, color de la malta y para reducir el contenido de humedad.

Lúpulo:

El lúpulo es una planta trepadora parecida a la parra, de la cual se utilizan los racimos de flores de las plantas femeninas. El lúpulo se emplea para aromatizar la cerveza he impartirle su peculiar sabor amargo.

Algunos investigadores suponen que el aroma se debe a la formación de compuestos aromáticos derivados de los rompimientos de las moléculas de los ácidos alfa contenidos en el lúpulo.

Adjuntos:

Con la utilización de los adjuntos, como el arroz y la harina de maíz se modificarán las propiedades del mosto con lo cual se obtendrán cervezas con una mayor brillantez.

El principal objetivo de utilizar adjuntos, es la fuente de carbohidratos que suministran, por su alto contenido de almidón.

3.2.2.- Fabricación:

Molienda:

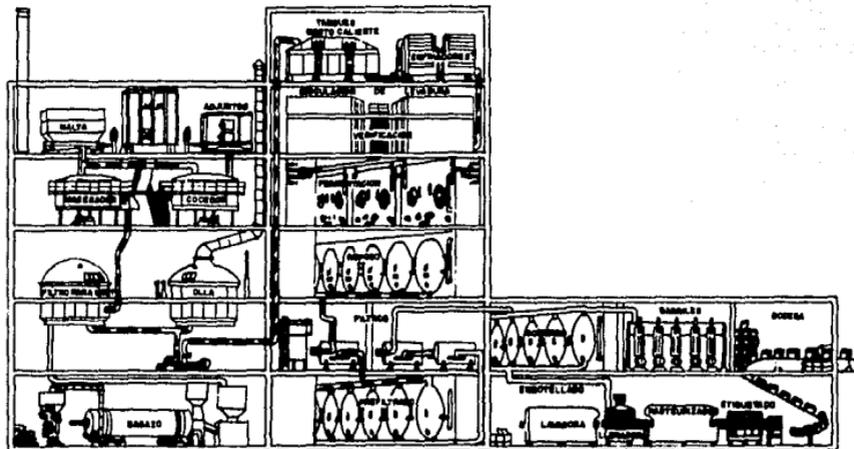
La malta limpia es cuidadosamente molido, dando fracciones gruesas, finas y algo de harina.

Maceración:

Los adjuntos y la malta "secos" se mezclan con agua y se someten a un proceso de cocción en el cual los almidones son convertidos en azúcares solubles.

El mosto en la olla de cocción es sometido a una fuerte y vigorosa ebullición con el objeto de esterilizarlo y dar uniformidad a su contenido químico incrementando la brillantez eliminando partículas inestables.

CUADRO No. 1 : DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO DE ELABORACION DE LA CERVEZA : (2).



Fermentación:

Inmediatamente después del enfriamiento del mosto se inocula la levadura previamente seleccionada

En esta etapa del proceso la levadura convierte los azúcares del mosto en alcohol generando además bióxido de carbono.

La fermentación se lleva a cabo en un período de 6 a 8 días, al término de los cuales la cerveza pasa a la fase de reposo o maduración durante 21 a 26 días.

Durante el reposo se clarifica parcialmente la cerveza y se mejora su sabor y aroma.

La fermentación alcohólica se ilustra en la figura 1.

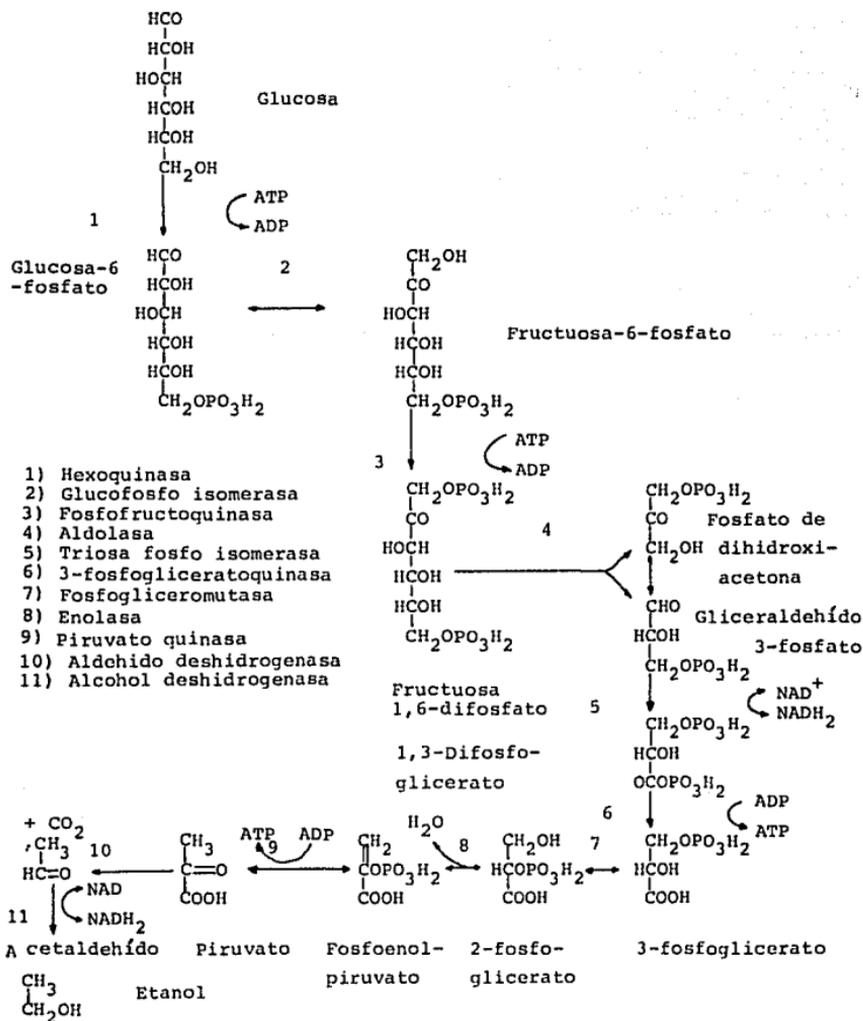
Filtración de la cerveza:

En el procedimiento empleado en las bodegas de maduración, descrito anteriormente, no se consigue la brillantez en la cerveza, porque algunas levaduras y algunas materias proteicas aún no han llegado a depositarse completamente. La brillantez exigida hoy en día solo se consigue con la filtración.

La cerveza ya filtrada, fría y saturada con gas carbónico se almacena en los llamados tanques de gobierno, desde donde es bombeada a las máquinas llenadoras de las líneas de embotellado.

La cerveza después de embotellada, se pasteuriza mediante un aumento gradual de la temperatura hasta alcanzar 60 °C aproximadamente, posteriormente se enfría lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Figura. No. 1 : FERMENTACION ALCOHOLICA : (3)



4.- BACTERIAS CONTAMINANTES DURANTE EL PROCESO DE FABRICACION DE LA CERVEZA.

4.1.- Introducción.-

Aunque actualmente se cuenta con cervecerías muy bien equipadas, usando la materia prima más apropiada y teniendo a su disposición métodos de detección e identificación de microorganismos nocivos y además los problemas relacionados con los daños causados por ellos han sido disminuidos, estos no han sido eliminados totalmente; así la aparición de bacterias gram positivas y gram negativas durante el proceso pueden causar daño a la cerveza como son; el producir cambios en el sabor, en su aspecto, en la viscosidad, en el olor etc.

En el presente capítulo se hará mención de las especies más comunes de los microorganismos contaminantes de la cerveza y de los daños que producen.

4.2.- Grupo del ácido láctico:

4.2.1.- Lactobacillus:

Características generales: (23)

Familia Lactobacilacea.

Bastoncillos largos, delgados, móviles que forman a menudo filamentos celulares.

Móviles con flagelos peritricos.

Pleomórficos, algunos formadores de cápsula.

La primera división de especies de Lactobacilos se basa en el metabolismo de la glucosa pudiendo ser, homofermentativos y heterofermentativos; las especies homofermentativas producen casi en su totalidad ácido láctico a partir de la glucosa.

Los Láctobacilos heterofermentativos son aquellos que fermentan la glucosa produciendo ácido láctico, ácido acético, CO_2 y etanol. En la figura 2 se ilustra la fermentación homoláctica y la heteroláctica.

Desarrollan a temperaturas de entre 2-53°C y su temperatura óptima se encuentra entre los 30 y 50°C.

Toleran un pH de entre 5.5-6.2 cuyo pH óptimo es de 5.0.

Sus colonias pueden ser lisas o rugosas de bordes claros con centro amarillento; algunas colonias son planas y grisáceas y casi transparentes.

Se hallan en el suelo, polvo, vegetales, en el intestino de los vertebrados y en los alimentos.

Son gram positivos y catalasa negativa.

4.2.2.- Importancia del Lactobacillus en la industria cervecera:

Entre las especies homofermentativas, la L. delbruekii es un organismo termófilico que puede proliferar en mosto cervecero, produciendo deterioro en las tinas de maceración, si es que la temperatura cae por debajo de los 50°C.

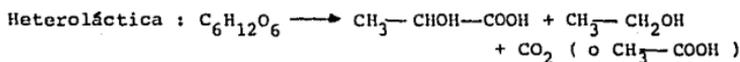
Similarmente también la L. casei y la L. plantarum pueden incluirse dentro de estas características mencionadas.

Dentro del grupo de los heterofermentativos se encuentra el L. pastorianus y el L. brevis los cuales son los más típicos contaminantes heterolácticos en cervecerías.

Figura No. 2 : FERMENTACION HOMOLACTICA Y HETEROLACTICA : (28)



Lactobacillus delbruckii
Lactobacillus casei
Lactobacillus plantarum
Lactobacillus acidophilus



Lactobacillus brevis
Lactobacillus pastorianos
Lactobacillus fermenti

El L.fermentum también ha sido aislado de plantas cerveceras y de cerveza contaminada.

Los Lactobacilos son auxótrofos para aminoácidos específicos como la arginina, ácido aspártico, glutámico, isoleucina, leucina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptofano y valina.

Por lo tanto la excreción de aminoácidos por la levadura debido a cambios ósmóticos sufridos durante la fermentación puede propiciar el desarrollo de estas bacterias.

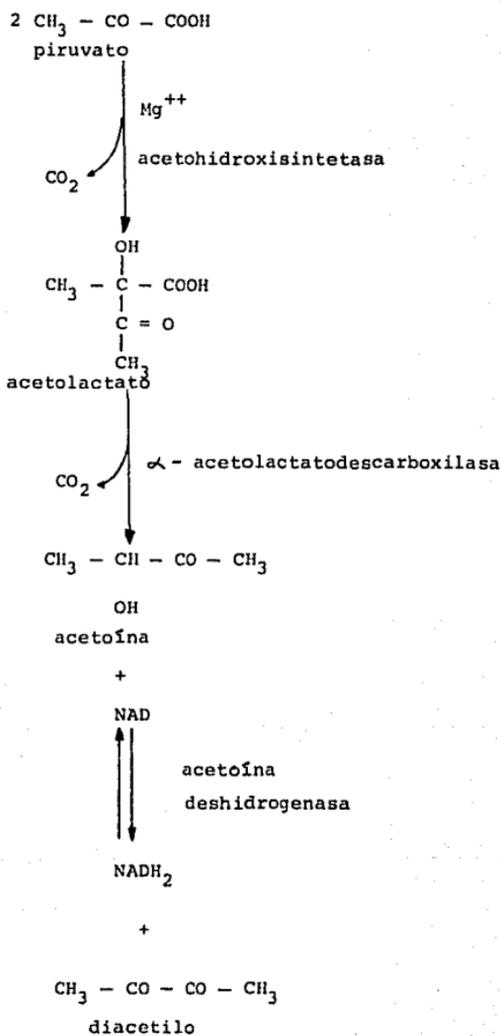
El crecimiento de este género puede ser retardado por el desarrollo vigoroso de la levadura, en el tiempo que dura la fermentación.

En resumen los Lactobacilos pueden encontrarse en el mosto, durante la fermentación y durante el reposo.

Todas las especies mencionadas pueden hechar a perder la cerveza causando turbidez, viscosidad, estas bacterias producen un velo tixotrópico (produce cambios en la viscosidad de la cerveza). La habilidad de formar turbidez y cambios en la viscosidad se pierde a menudo debido a mutaciones de la bacteria, la viscosidad que producen estas bacterias en la cerveza se debe a la formación de un heteropolímero complejo que contiene unidades de glucosa, manosa y ácido nucleico. (22).

Algunas cepas producen diacetilo (fig.3.) el cual es de gran importancia debido a que le imparte a la cerveza un caracter rancio en aroma y sabor; el diacetilo puede detectarse en la cerveza a muy bajas concentraciones (0.05 g/ml). A este aroma producido en un principio se le llamo " SARCINA " , debido a que sarcina es un nombre genérico anticuado para las bacterias gram positivas de las cervecerías.

Figura 3 . Formación del diacetilo. (27).



En general el lúpulo inhibe el desarrollo de los Lactobacilos aunque por adaptación pueden resistir su acción antiséptica.

Murrough y Palmer (20), publicaron un trabajo sobre bacterias contaminantes de mosto y cerveza y establecieron que cualquier bacteria contaminante de mosto sin lúpulo debe necesariamente ser termofílica, si por cualquier razón la temperatura del mosto sin lúpulo cae por debajo de los 50 °C las bacterias del ácido láctico termofílicas especialmente el L.delbruekii pueden desarrollarse, sin embargo esta bacteria puede soportar temperaturas tan altas como 54 °C aunque su temperatura óptima de crecimiento es de 40 a 44 °C.

Estos investigadores estudiaron el efecto de la temperatura en la producción de ácido láctico en los mostos. Al principio pareció obvio que la temperatura tenía influencia sobre la velocidad de acidificación del mosto. De acuerdo con lo anterior se hicieron intentos para cuantificar los efectos sobre la producción de ácido.

Las muestras provenientes de macerados se inocularon en medios especiales de mosto sin lúpulo el cual se preparó en una cervecera piloto mediante la maceración a 65 °C ; el mosto piloto contenía cebada malteada (73%), cebada hojuelada (18%), cebada tostada (9%), este mosto ya preparado fue distribuido en botellas en cantidades de 225 ml (por botella); el pH después de la esterilización por autoclave (15 lb/ 20 min) fue de 5.15.

Las muestras fueron inoculadas en el medio descrito anteriormente durante la noche a diferentes temperaturas (de 45 °C a 70 °C), posteriormente a las muestras se les analizó su contenido en ácido láctico, su pH y se realizó conteo de células.

Se encontró en los resultados que en mostos inoculados a temperaturas tan altas como 65 °C hubo

inhibición del crecimiento bacteriano; las concentraciones más altas de ácido láctico fueron producidas a 55° C.

Estos resultados probaron que a temperaturas mayores de los 55° C los Lactobacilos se ven afectados en su desarrollo y producción de ácido láctico.

Las bacterias encontradas en los aislamientos fueron en su mayor parte gram positivas, termófilicas (a un máximo de 55° C) , catalasa negativa, microaerofilicas, bacilos cortos, capaces de fermentar la glucosa, manosa y sacarosa. Estas bacterias fueron identificadas como especies típicas de Lactobacillus delbrueckii.

Cuadro No. 2 : CARACTERÍSTICAS DE LAS PRINCIPALES ESPECIES DE LACTOBACILOS CONTAMINANTES.(2)

	<u>L.delbrueckii</u>	<u>L.brevis</u>
MORFOLOGIA	Bastones cortos y largos, delgados solos o en pares.	Bastones cortos y largos forman ángulo obtuso o se encuentra dispuesto en pares.
GRAM	(positivo)	(positivo)
CATALASA	(negativo)	(negativo)
RESPIRACION	Microaerofilico	Microaerofilico estimulado con CO ₂ .
MOVILIDAD	(positiva)	(positiva)
T° OPTIMA	40 a 44° C	30 a 35° C
DESARFOLLA EN	Macerado y mosto	Mosto, fermentación, levadura de inoculación, cerveza terminada
PRODUCTOS	Forma ácido Lactico y diacetilo.	Forma ácido láctico, diacetilo y turbidez.
pH	4.0 a 9.0	4.0 a 9.0
pH Óptimo	6.0 a 7.0	7.5 a 8.5
OBSERVACIONES	Sensitivo al lúpulo, termófilico.	Peligroso ya que puede hidrolizar almidón.

4.3.- Género Pediococcus

4.3.1.- Características generales:(23)

Cocos con diámetro máximo de 1 micra. Pueden encontrarse como monococos, diplococos o formando tetradas.

Carecen de movilidad.

No esporulan

Son microaerofilicos y su crecimiento puede ser estimulado con CO₂.

Coco homofermentativo (fig.2)

Catalasa negativa

Gram positivo.

Forman ácido láctico.

Producen acidez, turbidez y además diacético (fig. 3) originando un olor y sabor parecido a la mantequilla.

Producen acidez pero no gas a partir de glucosa, fructosa, maltosa, ramnosa, manitol, galactosa y dextrinas.

No licuan la gelatina.

No reducen los nitratos a nitritos.

No producen acidez a partir de pentosas, lactosa, sacarosa y manitol.

La niacina, biotina y los aminoácidos serina, metionina y lisina son esenciales para su crecimiento.

Su pH de crecimiento es de 3.5 a 6.2 siendo el óptimo 5.5.

La temperatura óptima es de 22 a 30 °C, pueden desarrollarse a bajas temperaturas y con dificultad a 42 - 45 °C- Mueren a una temperatura de 60 °C, durante 10 minutos.

Pueden ser aislados de la malta molid, salmueras y cereales.

4.3.2.- El Pediococcus y su actividad en la industria cervecera: (15)

El Pediococcus es un género típico infectante de la cerveza. Se desarrolla en mosto lúpulado, fermentación, reposo y embotellado dando lugar a acidez, turbidez y pérdida de sabor.

Los cocos lácticos han sido conocidos en la cerveza desde 1880 como sarcinas debido a que sus tradas de células eran tomadas erróneamente por los paquetes cúbicos de una verdadera sarcina. Shimwell y Kirkpatrick (1939) mostraron por primera vez que las sarcinas cerveceras eran cocos lácticos.

El género Pediococcus contiene 8 especies: P.damnosus, P.parvulus, P.inopinatus, P.dextrinicus, F.pentosaceus, P.acidilactici, P.halophilus, P.urinaeequi.

De las especies mencionadas, P.damnosus se desarrolla en fermentación, levadura de inoculación y cerveza terminada. (15).

P.acidilactici puede desarrollar en macerado y mosto pero es sensible al lúpulo por lo que no es capaz de desarrollar en mosto lupulado o en cerveza.

Según Priest (26) se le considera a P.damnosus como el Pediococo que es típicamente resistente al lúpulo y puede desarrollar a bajos pH. La contaminación notable de cerveza esta virtualmente limitada a cepas de P.damnossus ya que de acuerdo a una serie de estudios realizados por dicho autor, le correspondió un 97% de 840 muestras de cocos cerveceros aislados.

Las restantes fueron identificadas como P.inopinatus que ha sido aislada del medio ambiente, pero esta especie es rara vez responsable de la contaminación.

Caig y Weaver (21), realizaron estudios sobre dos especies de Pediococo; P.damnosus y P.pentosaceus éstas fueron aisladas de fuentes cerveceras con la utilización de varios factores nutricionales como carbohidratos; requerimientos de vitaminas; tolerancia a la temperatura, al oxígeno, al cloruro de sodio y al pH.

Utilizando fermentadores de 2 a 12 litros, algunos cultivos de diferentes especies de Pediococos fueron inoculados en mostos de tipo lager, con y sin levaduras. La concentración fué de 100 células por mililitro.

La producción de diacetilo y alcohol etílico y acetaldehído varió significativamente entre las diferentes especies tanto en el mosto sin levadura como en el que la contenía.

Después de estos estudios realizados por los investigadores anteriores se encontró que diferentes especies de Pediococos se pueden encontrar en las cervecerías, estas especies fueron diferenciadas basándose en un número determinado de pruebas, entre ellas la tolerancia a bajos pH durante su crecimiento, a la temperatura, requerimientos de oxígeno, concentración de cloruro de sodio, la habilidad de fermentar carbohidratos, requerimientos de vitaminas.

Caig y weaver (21) aislaron dos cepas de P.damnosus (variedad 1 y variedad 2), se encontró que ambas producían diacetilo en mosto y cerveza.

Un tercer aislamiento fué identificado como P.pentosaceus esta bacteria también producía diacetilo pero no frecuentemente. (fig. 3).

Con respecto a su desarrollo se observó que las especies de Pediococcus tenían preferencia por una etapa, en especial durante el proceso de la fabricación de la cerveza. El P.damnosus variedad 1 prefiere crecer durante el almacenaje de la levadura y durante la fermentación primaria. La bacteria P.pentosaceus también presenta crecimiento durante las etapas anteriores pero en un grado menor y el P.damnosus variedad 2 se encontró que su desarrollo predomina durante la fermentación final y en la cerveza embotellada. (21).

Cuando se inocularon durante la fermentación lager el P.damnosus variedad 1 y el P.damnosus variedad 2, se observó que hubo una disminución en el número de células de levadura en suspensión originando una fermentación lenta.

Las concentraciones de diacétilo fueron mayores en fermentaciones contaminadas que en los controles sin contaminación, de igual manera los niveles de acetaldehído.

El P.damnosus tiene la capacidad de formar cápsula y por lo tanto puede ocasionar un aumento en la viscosidad de la cerveza, al igual que el Lactobacilo.

Los Pediococcus que crecen en cerveza requieren más nutrientes que los Lactobacilos; por ejemplo todas las cepas de P.damnosus requieren niacina, biotina, purina pirimidina, riboflavina y piridoxina; en algunas cepas ascorbato y el tioglicolato resultaban estimuladoras del crecimiento.

Un punto de distinción entre P.damnosus y P.pentosaceus radica en que el primero tolera los anticépticos del lúpulo, mientras que el segundo no, aunque se ha observado que estos anticépticos pueden inducir la formación de células gigantes en P.damnosus. (21).

Middlekauff y Sondag (16), realizaron estudios con cepas de *Pediococcus* provenientes de la cerveza en medios de cultivo diferentes observando los efectos causados sobre el crecimiento y metabolismo de dichas cepas.

Se utilizó cerveza terminada con la adición de sustancias estimuladoras del crecimiento, tanto para medios de crecimiento de bacterias como para los experimentos realizados.

El crecimiento bacteriano fue medido con lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro Spectronic 20 de Bauch & Lomb, a 555 nm.

También se efectuó la medición de compuestos químicos como el dia-etilo, acetaldehído y ácido láctico que son productos de su metabolismo.

Con lo que respecta a los efectos del medio ambiente sobre el crecimiento del *Pediococcus* en cultivos de prueba, estas bacterias crecen mejor a 27 °C y a un pH de entre 5 y 6, en medios preparados a base de cerveza estéril y otros componentes, contenidos en los medios universales de cerveza (5).

Otros de los experimentos realizados por estos investigadores consistió en observar el comportamiento del *Pediococcus* ante diferentes sustancias estimuladoras contenidas en cerveza estéril, como sigue: Glucosa, xilosa, xilosa citrato, arabinosa citrato, lactosa, maltotriosa, glutatión N-acetil glucosamina, maltosa, malato, acetato, piruvato, citrato, succinato, fumarato, hidroxícloruro de betaína, piridoxina, biotina, tiamina, ácido ascórbico, ácido fólico, rivo flavina.

Tres clases de efectos fueron observados en los tubos anteriores; 1) No hubo efectos 2) inhibición del crecimiento 3) Estimulación del crecimiento.

Se observó en los resultados obtenidos que el citrato y el fumarato inhiben el crecimiento del *Pediococcus*.

El piruvato, glutati3n, N- acetil glucosamina, maltosa, hidroxidloruro de betafina, malato, acetato, succinato y la xilosa citrato, estimulan el desarrollo de dicha bacteria.

El crecimiento del Pediococo se ve estimulado cuando son agregados 100 mg / ml de 3cido piruvico en cultivos preparados a base de cerveza, por lo tanto, se concluye finalmente que la levadura al producir 3cido piruvico en el mpaximo de su actividad metabolica favorece el desarrollo de la bacteria en estudio.

El piruvato adem3s de estimular el crecimiento del Pediococo, es metabolizado por la bacteria hasta producir diacetilo, la cual produce cambios desagradables en el sabor de la cerveza.

Middlekauff y Sondag (16), correlacionar3n el n3mero de c3lulas de Pediococcus con la s3ntesis de acetoina y diacetilo que produce durante su metabolismo.

El ensayo se realizo en 7 litros de cerveza est3ril a la cual se le inocul3 la bacteria.

Seg3n los resultados obtenidos se llego a la conclusi3n de que el Pediococo es capaz de producir grandes cantidades de acetoina y diacetilo pero solo cuando la densidad c3lular, alcanza valores de 10^4 c3lulas / mililitro y sobre todo cuando la levadura esta en el m3ximo de su actividad metab3lica, ya que como se dijo anteriormente, es en esta etapa cuando produce 3cido piruvico.

Con respecto a la producci3n de 3cido l3ctico, se realizaron estudios en fermentaciones de 8 litros con la adici3n de cerveza est3ril, estas fermentaciones fueron inoculadas con Pediococcus.

Los resultados obtenidos demostraron que estos microorganismos producen m3s 3cido D - l3ctico que 3cido L - l3ctico durante su crecimiento en cultivos de cerveza; la adici3n de 3cido piruvico puede estimular la producci3n de 3cido L - l3ctico.

4.4.- Género Obesumbacterium:

4.4.1.- Características generales: (23)

Familia Enterobacteriaceae

Bastones pleomórficos de 0.8

a 2.0 μ de diámetro; 1.5 - 100 μ de longitud.

Los bastones cortos y gruesos predominan en mosto de cerveza con levaduras vivas. Los bastones largos predominan cuando crecen en medios bacteriológicos.

No son móviles.

Anaerobios facultativos.

Presentan un crecimiento lento.

Producen acidez a partir de glucosa y manosa; no producen acidez a partir de lactosa, maltosa, D-manitol, sacarosa y xilosa.

Reducen los nitratos a nitritos.

El género tiene una sola especie, O.proteus.

Su temperatura óptima de crecimiento es de 32 °C.

La especie O.proteus se divide en dos biogrupos, los cuales son especies fenotípicamente distintas y que solo están relacionadas en forma distante por su DNA.

Su pH óptimo de crecimiento es de 5.0; no desarrolla por debajo de 4.4.

Son gram negativos.

4.4.2.- Importancia en la industria de la cerveza:

Durante mucho tiempo se pensó que el Obesumbacterium proteus no causaba daño a la cerveza.

Más tarde Shimwell en, 1936 mediante experimentos realizados, observó que dicha bacteria se desarrollaba en fermentaciones primarias (de 24 horas) de una manera constante y con la peculiaridad de desarrollarse al mismo tiempo que la levadura. (22)

Strandskov y colaboradores(15), en 1953 observaron que después de inocular levadura y Obesumbacterium proteus en cultivos preparados a base de cerveza; tanto la levadura como la bacteria contaminante presentaban una curva de crecimiento exponencial muy similar. Sin embargo después de 48 horas de fermentación el crecimiento de la bacteria se ve afectado, debido probablemente a la disminución del pH; también existen evidencias de que diferentes cepas de levadura y la composición del mosto, puede tener una influencia en el desarrollo de Obesumbacterium proteus.

Si al Obesumbacterium proteus se le permite crecer en mosto un poco antes de agregar la levadura, se obtendría una cerveza con características afrutadas, con un olor y sabor a chirivía (Olor y sabor parecido al pepino). (19)

Este organismo puede desarrollarse en cervezas con un pH por arriba de 4.4. Puede afectar el sabor de la cerveza debido a la producción de diversas moléculas a partir de glucosa y D-manosa, como son: n-propanol, etanol, isobutanol, 2-3-butanediol, 2-acetolactato y sobre todo la síntesis de dimetil sulfuro ya que este es el responsable del característico olor y sabor a chirivía, en la figura 4 se muestra la reacción referente a la producción de dimetil sulfuro.

Priest (25), realizó estudios sobre la posición taxonómica del Obesumbacterium proteus en base a una evaluación sobre su contenido de guanina y citocina (G.C) del DNA durante el aislamiento de 19 cepas de O.proteus (de las cuales 16 fueron aisladas de cervcerías) y 18 especies de referencia.

A partir de 50 pruebas bioquímicas y fisiológicas se demostró que el Obesumbacterium proteus se subdivide en dos grupos; el primer grupo abarca las cepas 502, 510 y 511 (grupo 1); el segundo grupo incluye las cepas 501 y 530.

El grupo 1 parece estar relacionado con la bacteria Echerichia coli por la similitud que presenta el DNA de ambos microorganismos en lo que respecta a su punto de fusión y contenido de guanina y citocina.

La bacteria Hafnia alvei NCTC 8102 es idéntica a las cepas 512 y 580 de O.proteus en su contenido de guanina y citocina del DNA.

Las cepas de H.alvei NCTC 8105 y 8112 desarrollarán en una fermentación cervcera simulada, se observó que crece en forma parecida a la O.proteus.

Priest (25), sugirió que el nombre de Flavobacterium proteus y Obesumbacterium proteus fueran cancelados y se incluyeran en el género Hafnia, en una única especie denominada Hafnia protea (comb.nov).

Aunque este mismo investigador encontró que el Obesumbacterium proteus se subdivide en dos grupos no existe ninguna diferencia entre ellos en lo que respecta a su comportamiento durante las fermentaciones destinadas a la producción de cerveza.

El Obesumbacterium proteus puede crecer, produciendo acidez en medios que contengan fructuosa, galactosa y el lactosa, sacarosa, xilosa y arabinosa, aunque en estos últimos no produce acidez.

Con lo que respecta a su metabolismo, los ácidos como el acético, fórmico, 2-oxoglutámico, pirúvico y succínico son productos de la fermentación de O. proteus, en el mosto que se utiliza para la producción de cerveza también puede producir acetofina, etanol, ácido láctico y dimetil sulfuro como el principal producto de su metabolismo y el causante principal de las alteraciones en el sabor y olor de la cerveza.

El Obesumbacterium no produce diacetilo. (25).

A continuación mencionaremos los factores que son importantes en el desarrollo del Obesumbacterium proteus en las primeras etapas de la fermentación: (1).- Velocidad de siembra de la levadura; (2).- El pH del mosto; (3).- La velocidad a la que el pH disminuye durante la fermentación. Si la levadura se infecta fuertemente con O. proteus el pH de la cerveza permanecerá alto y la población bacteriana no disminuirá tan marcadamente y por lo tanto será posible encontrar O. proteus en el traciego del producto. (25).

Case (4), inoculó O. proteus en un litro de mosto cervecero esterilizado previamente en autoclave, dicho mosto se hizo fermentar en cilindros de 12 por 3 pulgadas en un baño de agua a temperatura controlada. A los cilindros se les inoculó una cantidad apropiada de levadura.

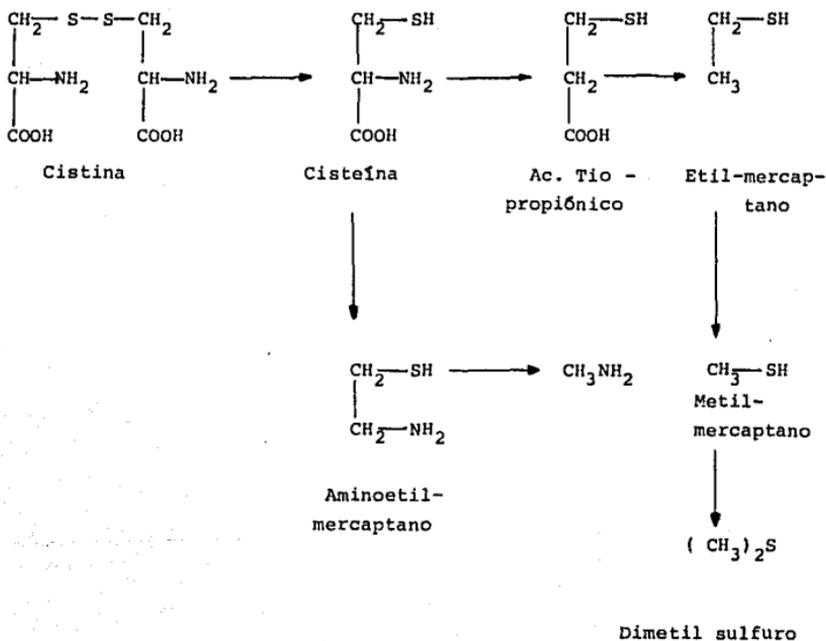
Según los resultados obtenidos se llegó a la conclusión de que existen tres casos típicos en cervecerías:

(a).- Fermentaciones inoculadas con levadura no infectada.

(b).- Aquellas inoculadas con levadura que lleva alguna infección de otra clase.

(c).- Aquellas inoculadas como en el inciso anterior pero que dan lugar a un crecimiento excesivo de O. proteus.

Figura No. 4 : FORMACION DEL DIMETIL SULFURO : (27).



En el inciso "a" el crecimiento de la bacteria en estudio es de 10 colonias aproximadamente por mililitro, en este caso se adquiere la infección en la planta.

El inciso "b" es el que se presenta más comunmente en la planta cervecera, aunque no representa un problema grave, ya que con la disminución del pH a lo largo de la fermentación desaparece paulatinamente la infección.

El caso "c" se le considera como el más peligroso por la alta y tempranera población de O. proteus que puede ocasionar daños en la cerveza y dicha bacteria puede encontrarse en el trasiego.

Las fermentaciones de laboratorio examinadas inmediatamente después de la inoculación muestran que la proporción de siembra inicial de O. proteus puede variar desde cero hasta unos cuantos miles por mililitro.

La velocidad de crecimiento del O. proteus no está determinada simplemente en función del inoculo sino también por la composición del mosto y de las condiciones de fermentación.

Las fermentaciones de 5 galones a pH neutro y a pH hasta de 5, inoculados con la levadura en cada caso, mostrarán una reducción substancial del crecimiento de esta bacteria, pero en la fermentación con un inicio de pH de 5 este crecimiento disminuyó considerablemente.

Los niveles de pH característicos de los diferentes tipos de mosto (ale ligera, ale oscura ale clara, cerveza oscura, cerveza amarga) están relacionados con el nivel de desarrollo del O. proteus, siendo mayor el crecimiento en mostos de pH más alto como muestra el cuadro No 3

En dicho cuadro se observa que el segundo miembro de cada par fué preparado a un pH más bajo dando cuentas más bajas y picos gráficos de crecimiento también más bajos.

Otro de los experimentos realizados por estos investigadores se observó como afecta la temperatura de fermentación el desarrollo de O. proteus.

Cuadro No. 3 : NIVELES DE PH CARACTERISTICOS DE LOS DIPERENETS
TIPOS DE MOSTO. (4)

TIPOS DE CERVEZA	PH DEL MOSTO	# MAX DE COLONIAS DE <u>O-proteus</u> POR MILILITRO.
Cerveza ale ligera	5.52	325,000
	5.15	
Cerveza ale obscura	5.56	920,000
	5.11	
Cerveza ale clara clara	5.47	1,000,000
	5.00	
Cerveza amarga	5.19	200,000
	5.00	
Cerveza obscura espesa y fuerte	5.14	70
	4.94	

Se tomaron porciones de mosto a los cuales se les inoculó levadura infectada con O.proteus, estas porciones se incubaron a diferentes temperaturas, finalmente se llegó a la conclusión de que la bacteria O.proteus se desarrolla mejor a temperaturas no muy frías (4).

Por otro lado se hicieron inoculaciones de O.proteus en mosto sin levadura, se observó que disminuye considerablemente su desarrollo, formando un velo delgado de bacterias en suspensión sobre la superficie del mosto. En mosto tibio este velo fue mucho más denso que en mosto frío, finalmente se llegó a la conclusión, que el incremento de la temperatura no es efectivo para controlar la contaminación de O.proteus. (4).

Case (4), ha demostrado que el desarrollo de O.proteus se ve afectado cuando se desarrolla en fermentaciones de levadura floculante. Cuando la levadura de fermentación no es de tipo floculante no hay restricción en el crecimiento de O.proteus.

Al introducir aire a la fermentación, es posible acelerar el proceso de producción e inhibir el desarrollo de O.proteus, sin embargo, la aereación excesiva puede acelerar la fermentación de forma incontrolable y ocasionar cambios notables en el sabor de la cerveza.

Cuando la levadura está contaminada con O.proteus y es inoculada a los tanques de fermentación se altera el pH final de dicha fermentación, para demostrarlo se inocularon en tres diferentes mostos tres tipos de levadura: 1) Levadura lavada con ácido vigorosamente, 2) Levadura lavada con ácido muy diluido, 3) Levadura no lavada con ácido.

Finalmente en los resultados se observó que la levadura número tres provocó una baja del pH muy lenta, obteniéndose un pH final más alto en comparación con las levaduras de los incisos uno y dos.

4.5.- Género Enterobacter:

4.5.1.- Características Generales:(23)

Familia Enterobacteriaceae.

Bacilos con movilidad a base

de flagelos peritricos.

Algunas especies tienen cápsu

la.

Son gram negativos.

Tienen la capacidad de licuar

la gelatina.

Son comensales comunes del

tracto intestinal del hombre y de los animales.

Son capaces de descarboxilar

la ornitina.

Fermentan la glucosa a 37 °C

con producción de gran cantidad de gas; a 44.5 °C no producen gas a partir de glucosa.

Las especies más importantes

de este género son: Enterobacter cloacae, E.agglomerans, E.aero
genes, E.hafneae.

La especie de importancia en

la industria de la cerveza es el E.agglomerans el cual puede pro
ducir gas a partir de adonitol, glicerol y sorbitol.

El género Enterobacter crece

a una temperatura óptima de 27 a 30 °C; puede desarrollar a una temperatura máxima de 32 °C.

Produce acidez a partir de

glucosa, fructuosa, galactosa, sacarosa.

Son anaerobios facultativos.

4.5.2.- El Enterobacter y su importancia en la industria de la cerveza:

El género Enterobacter produce en el mosto sabores semejantes al apio, calabaza cocida, dulce afrutado y a sulfídrico.

Se desarrolla principalmente en el mosto y al principio de la fermentación, fermenta la maltosa y glucosa produciendo acidez y gas.

La especie Enterobacter aerogenes produce durante su metabolismo; 2,3 butanediol, glicerol, ethanol, CO₂, dimetil sulfuro, acetaldehído y propanol, estos dos últimos se producen en pequeñas cantidades. (15)

Van Vuuren y Cosser (30), realizaron estudios sobre la influencia de E. agglomerans en el sabor de la cerveza.

Ellos afirmaron que la presencia de éste da lugar a un incremento en los niveles de acetaldehído, metilacetato, diacetilo, 2,3 pentadiona en la cerveza terminada.

Se sabe que las especies de Enterobacter no sobreviven a la fermentación, sin embargo estos investigadores demostraron que la especie Enterobacter aerogenes sobrevive a los procesos de la fabricación de cerveza e inclusive se ha encontrado en levadura reciclada, esto nos indica que es un contaminante potencial para la cerveza.

Varias cepas de E. agglomerans se aislaron de dos diferentes cervezas tipo lager, dichas cepas fueron caracterizadas realizando análisis fenotípicos y cromatografía de gases.

El experimento se realizó en una planta piloto, como medio de cultivo se utilizaron 60 litros de mosto con lúpulo esterilizado en autoclave y almacenado en tres recipientes de acero inoxidable con una capacidad de 30 litros cada uno.

Los tres recipientes fueron inoculados con un cultivo puro de Sacharomyces cereviccae, en dos de estos recipientes se inocularon 10^3 y 10^6 células / mililitro de E.agglomerans.

Todos los recipientes fueron incubados a 7°C durante un período de 11 días.

Al cabo de este tiempo se observó que la velocidad de fermentación en los mostos infectados fué mayor durante los primeros 8 días, en comparación con los mostos no contaminados.

El pH de la fermentación contaminada con 10^6 células / mililitro de E.agglomerans fué de 4.38 y el pH de los mostos no infectados fué de 4.19. El valor de pH más altos en mostos contaminados probablemente se deba a los productos metabólicos de la bacteria como el diacetilo y el dimetil sulfuro, entre otros.

Los niveles de diacetilo en cervezas no infectadas fué de 0.04 mg / litro, mientras que en cervezas contaminadas se encontró un valor de 0.07 mg / litro. En lo que respecta a los niveles de dimetil sulfuro fueron reportados 142.8 mg / litro en cervezas infectadas y 54.6 mg / litro en los recipientes no infectados.

Las cantidades de acetaldehído, metil acetato, isoamilalcohol, 2,3 pentanodiona que fueron detectadas en la cerveza contaminada y no contaminada se muestran en el cuadro No. 4 .

Cuadro No. 4 : CANTIDADES DE METABOLITOS QUE FUERON DETECTADOS EN CERVEZAS CONTAMINADAS Y NO CONTAMINADAS. (30)

COMPUESTOS	CANTIDADES DETECTADAS EN mg / litro		
	Fv 1	Fv 2	Fv 3
Acetaldehído	9.6	11.52	13.1
Metilacetato	3.0	3.5	3.5
Etilacetato	26.6	23.6	23.3
n - propanol	16.5	15.5	11.5
Isobutanol	15.1	15.4	11.5
Isoamilacetato	3.6	3.1	3.2
Isoamilalcohol	88.2	86.1	75.2
2,3 - pentadiona	0.03	0.03	0.05
Diacetilo	0.04	0.05	0.07
Dimetil sulfuro	54.6	55.3	142.8

Fv 1: Cerveza control

Fv 2: Cerveza contaminada con 10^3 células / ml de E. agglomerans.

Fv 3: Cerveza infectada con 10^6 células / ml de E. agglomerans.

Se puede observar en el Cuadro No. 4 que las cervezas producidas a partir de los mostos contaminados con E.agglomerans muestran un aumento en el nivel de los compuestos descritos y que cuanto mayor es el inoculo de la bacteria mayor es el aumento de dichos niveles.

La presencia de E.agglomerans causa sobre todo un aumento considerable de dimetil sulfito (fig.4).

Los catadores han indicado que las cervezas contaminadas con E.agglomerans son practicamente inbebibles, por la presencia de un sabor y aroma a frutas, leche y azufre.

Van Vuren y Kersters (29) aislaron un gran número de cepas provenientes de cuatro cervecerías de Sudáfrica, de estas cepas aisladas 55 fueron identificadas como Enterobacterias, por la realización de numerosos análisis fenotípicos.

De estas 55 cepas se reportaron 18 de la especie de E.agglomerans las cuales fueron sobre todo aisladas de tinajas de levadura y de tanques de fermentación.

Para la obtención de las cepas se tomaron muestras de las diferentes etapas del proceso en la forma más aceptica posible y recolectadas en botellas con mosto y levadura.

El contenido de las botellas se transfirió a placas que contenían un medio denominado UEA (UNIVERSAL BEER AGAR).(5) con la adición previa de actidiona (antibiótico capaz de inhibir el desarrollo de la levadura).

La incubación de las placas se llevo a cabo en condiciones aerobicas a una temperatura de 28 °C, durante 6 días.

El crecimiento obtenido en las placas fué recolectado e incubado en medios líquidos de UBA y cultivados a 28°C para su posterior aislamiento en placa.

Las bacterias fueron caracterizadas mediante análisis fenotípicos, los productos metabólicos fueron identificados por cromatografía de gases y las proteínas mediante electroforesis.

51 de los 55 aislamientos obtenidos de las cuatro cervecerías denotadas con las letras A, B, C, D fueron identificadas. En el Cuadro No. 5 se muestran las especies aisladas a partir de levadura de inoculación, mosto y cerveza terminada de las cuatro diferentes cervecerías.

Cuadro No. 5: ESPECIES DE ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE LAS CUATRO DIFERENTES CERVECERIAS DE SUDAFRICA. (29)

CERVECERIA	<u>Enterobacter agglomerans</u>	<u>Hafnia protea</u>
A	5	10
B	0	0
C	13	0
D	0	0
TOTAL	18	10

CERVECERIA	<u>Klebsiela pneumoniae</u>	<u>Serratia marcescens</u>
A	2	0
B	8	1
C	0	0
D	0	0
TOTAL	10	1

CERVECERIA	<u>Enterobacter cloacae</u>	<u>Citrobacter freundii</u>
A	0	0
B	5	2
C	0	0
D	0	0
TOTAL	5	2

Podemos observar en el cuadro No. 5 que de las 7 especies encontradas, E.agglomerans apareció con más frecuencia, esto se debe a que está bacteria sobrevive mejor a los procesos de fabricación de cerveza y porque tiende a acumularse en la levadura de inoculación.

El Cuadro No. 6 muestra la frecuencia con que aparecen las diferentes especies de Enterobacterias durante las distintas etapas del proceso de fabricación de cerveza.

Cuadro No. 6: FRECUENCIA CON QUE APARECEN LAS DIFERENTES ESPECIES DE ENTEROBACTERIAS DURANTE LAS DISTINTAS ETAPAS DEL PROCESO DE FABRICACION DE CERVEZA. (29)

ETAPA DEL PROCESO.	<u>E.agglomerans</u>	<u>H.protea</u>	<u>K.pneumoniae</u>
Levadura de cultivo.	3	3	0
Recipientes de recolección.	0	0	3
Fermentación	15	7	7
Tanques de reposo.	0	0	0
Tanques de gobierno.	0	0	0

Continuación del Cuadro No.6 :

ETAPA DEL PROCESO.	<u>S.marcescens</u>	<u>E.cloacae</u>	<u>C.freundii</u>	<u>P.mirabilis</u>
Levadura de cultivo.	0	0	0	0
Recipientes de recolección.	5	4	2	1
Fermentación	0	0	0	0
Tanques de reposo.	0	1	0	0
Tanques de gobierno.	0	0	0	0

En el Cuadro No. 6 se puede observar que las Enterobacterias aparecen más frecuentemente durante las etapas tempranas del proceso de fabricación de cerveza. Las especies E.agglomerans y H.protea fueron encontradas en la levadura de inoculación y en la fermentación; K.pneumoniae fué aislada de los recipientes de recolección de mosto y también de la fermentación; S.marcescens, E.cloacae, C.freundi y P.mirabilis solo fueron encontradas en los recipientes de recolección de mosto.

En conclusión la especie E.agglomerans puede contaminar mosto, etapas tempranas de la fermentación y en levadura reciclada, rara vez puede encontrarse en malta y lúpulo.

4.6.- Género Zimomona:

4.6.1.- Características generales: (23)
Anaerobios facultativos.

Células de forma bacilar gruesa con bordes redondeados, solas o en pares.

Presentan movilidad a partir de flagelos polares y periféricos.

Son gram negativos.

Catalasa negativa.

Su temperatura óptima se encuentra entre los 28°C y 30°C.

Produce ácido sulfúrico, no licua la gelatina, no produce indol, no reducen los nitratos a nitritos.

Produce acetaldehído y este tiende a acumularse en el medio de cultivo.

Este género muestra un metabolismo vigoroso a partir de glucosa o fructosa por la vía de Embden-Meyerhof, produciendo etanol y CO₂.

Su pH óptimo de crecimiento es de 6 a 7.

Este organismo se ha encontrado en jugos vegetales en fermentación como el pulque.

La especie Zimomona anaerobia resiste bajos pH y altos contenidos de alcohol; por lo tanto crecen bien a pH de 3.6.

4.6.2.- La Zymomonas en la Industria de la Cerveza:

La especie Zymomonas anaerobia es la más importante de este género como contaminante durante el proceso de la fabricación de la cerveza. Sus productos secundarios como el acetaldehído y el ácido sulfídrico constituyen un problema serio, ya que ocasionan en la cerveza un sabor y aroma a manzanas podridas. (15)

La figura No.5 muestra la reacción correspondiente a la producción de acetaldehído por la Zymomona.

Figura 5: Formación de Acetaldehído por la Zymomona: (28).



Acetaldehído Bioxido de carbono

TPP = Coenzima Tiamina Pirofocfato.

La Zymomona ha sido aislada de los cepillos de las maquinas lavadoras de botellas.

Esta bacteria puede deteriorar a la cerveza en solo 24 horas o menos, cuando la temperatura ambiente es de 20°C a 30°C, por su respiración anaerobica facultativa puede desarrollar en reposo pero sobre todo en cerveza embotellada y de barril.

Como ya se mencionó el microorganismo puede introducirse a la botella por medio de escobillones sucios o en mal estado.

Para eliminar la contaminación de Zymomona anaerobia se requiere de la pasteurización y de la filtración antes del reposo.

En general el género Zymomona no es capaz de producir diacetilo ni acetilmetilcarbinol.

Por la necesidad de detectar a la Zimomona lo más rápidamente posible, Denis y Young (7) reportaron un método rápido para la detección del microorganismo.

La bacteria se hizo crecer en un medio líquido al cual se le adicionó la cantidad necesaria de reactivo de Schiff's, el cual reacciona con el acetaldehído que produce la Zymomona durante su metabolismo dando como resultado un color morado oscuro, el cual puede ser observado sin necesidad de instrumentación. Por lo que este reactivo se puede utilizar en forma rutinaria en el laboratorio.

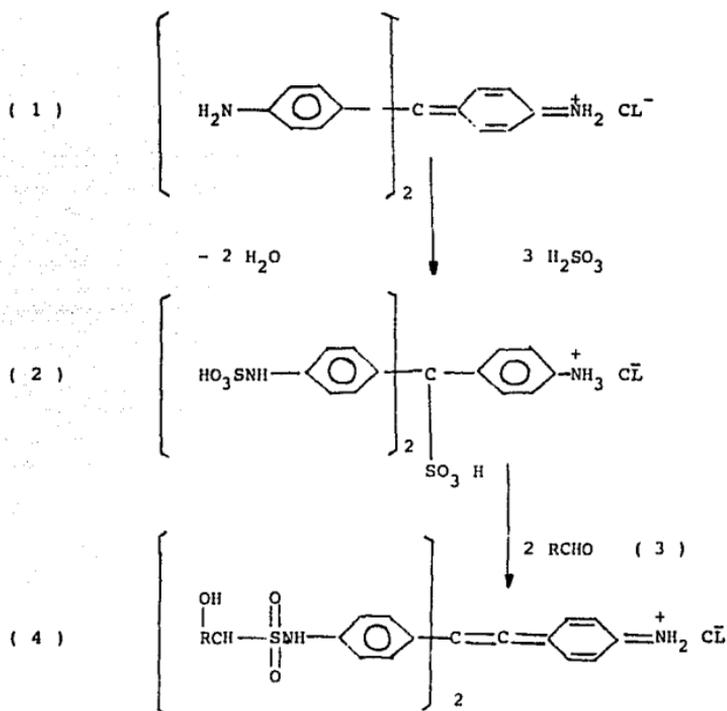
El reactivo de Schiff's se prepara de la siguiente manera: Se utiliza el clorhidrato de rosanilina (uno de los colorantes básicos del magenta) en una concentración del 2 % ; el cual es decolorado mediante el burbujeo de SO_2 y la adición de carbón activado a continuación se deja reposar durante toda la noche a temperatura ambiente y al cabo de este tiempo se filtra (Figura No. 6).

El colorante ya preparado se puede envasar en botellas de color ambar, de esta forma se conserva durante un tiempo de tres meses en ausencia de luz.

En esta forma se efectúan análisis de muestras provenientes de tanques cerveceros, dichas muestras fueron transferidas a un medio de cultivo de agar sulfito cuya fórmula se muestra en el cuadro No. 7; dichas muestras ya inoculadas en el medio anterior fueron incubadas a $30^{\circ}C$ durante cuatro días. A los cultivos se les analizó diariamente su densidad de crecimiento y producción de gas.

Diez mililitros de caldo incubado fueron transferidos a un tubo de 1.75 por 15 cm enseguida fueron agregados 0.15 ml del reactivo de Schiff's, la aparición de un color púrpuro indica la presencia de Zymomona.

Figura No. 6 : FORMACION DEL REACTIVO DE SCHIFF'S : (8)



(1).- Clorhidrato de rosanilina

(2).- Acido leucosulfónico (Reactivo de Schiff's)

(3).- Acetaldehido

(4).- Compuesto de color purpura

Cuadro No. 7: COMPOSICION DEL MEDIO AGAR SULFITO:(18)

COMPOSICION	MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO (g/lt)	MED, SOLODO (g/lt)
Glucosa ($C_6H_{12}O_6$)	40	10
Fructuosa ($C_6H_{12}O_6$)	40	10
Extracto de levadura	40	10
Actidiona	0.1	0.1
Sulfito de sodio (Na_2SO_3)	-	0.5
Acetato de plomo ($Pb.Ac.3H_2O$)	-	0.5
Agar	-	30
pH	4.0	5.0

A veces es posible que al agregar el reactivo de Schiff's se produzca una coloración roja o rosa debido a la presencia de otros microorganismos, pero estos casos fueron considerados como negativos con relación a la presencia de la Zymomona.

En el cuadro No. 8 se comparan las diferencias producidas en muestras de cerveza utilizando el reactivo de Schiff' s.

Un comité propuesto por Woodward (31); recomendaron la utilización de un medio selectivo para la detección de Zymomona, denominado agar sulfito (cuadro No. 7). En dicho medio la combinación de glucosa y fructuosa favorece el desarrollo de la Zymomona; el sulfito de sodio estimula la producción de ácido sulfídrico y el acetato de sodio al combinarse con dicho ácido da como resultado una coloración negra de las colonias.

Cuadro No. 8 : DIFERENCIAS PRODUCIDAS EN MUESTRAS DE CERVEZA
UTILIZANDO EL REACTIVO DE SCHIFF'S. (7).

MUESTRA	CRECIMIENTO	GAS	COLOR	ABSORBANCIA
No inoculo	-	-	LP	0.092.
Lev.Ale.	-	-	LP	0.087-0.095
Lev.Lager.	-	-	LP	0.089-0.091
Lev.Silvestre.	-	-	LP	0.093
Lactobacillus spp.	+	-	C	0.067
Enterobacter spp.	+	+	C	0.063
Acetobacter spp.	+	-	C	0.084
Obesumbacterium spp	+	+	C	0.081
12 cultivos de Zymomonas (Brewing Researsh Foundation)	+	+	DP	7.22-8.61
5 cultivos de Zymomonas (aislados de muestras de cerveza)	+	+	DP	7.43-8.54

DP = Morado oscuro; LP = Rosado claro;

C = casi nada de color.

La actidiona actua como inhibidor de las levaduras que se encuentran en las muestras provenientes de la planta cervecera.

El gas que produce la Zy momonas puede ser observado mediante la utilización de tubos invertidos (campanas de Durhan), durante la incubación a 30°C, en un periodo de uno a seis días.

La observación microscópica de los medios líquidos muestra la gran movilidad de los bacilos.

4.7.- Bacterias del Acido Acético:

4.7.1.- Características Generales: (23)

Pertenece a la familia Pseudo

monadaceas.

Células de forma bacilar.

Gram negativos.

Son ligeramente móviles, ya sea por flagelos polares (Gluconobacter) o peritricos (Acetobacter).

Son aerobios estrictos.

El habitat natural de estas bacterias lo constituyen las plantas.

Las bacterias del ácido acético presentan en común la posibilidad de producir acidez por la oxidación de azúcares y alcoholes.

Presentan una gran tolerancia a los ácidos.

Las bacterias del ácido acético se dividen en peroxydans (las que producen ácido acético temporalmente y luego lo oxidan) y en suboxydans (las que no oxidan el ácido acético producido).

Durante su crecimiento en un medio opaco a base de agar, etanol, extracto de levadura y una suspensión de CaCO_3 , aparecen halos transparentes alrededor de las colonias debido a la disolución del CaCO_3 a causa de la producción del ácido acético durante el desarrollo de estas bacterias.

Mientras que el halo desaparece en las bacterias suboxydans, en las peroxydans vuelven a enturbiarse los halos a causa de una nueva precipitación de CaCO_3 por la hidrólisis del ácido acético.

Las bacterias del ácido acético son capaces de oxidar alcoholes primarios a los ácidos grasos correspondientes; los alcoholes secundarios son convertidos a cetonas.

Estos microorganismos se parecen a las pseudomonas si bien se diferencian de las mismas por una gran tolerancia a los ácidos, por una ínfima actividad proteolítica, así como la carencia de pigmentos coloreados.

4.7.2.- Bacterias del Acido Acetico como Organismos Contaminantes de la Cerveza:

Las bacterias del ácido acético se desarrollan en mosto o en cerveza sobre todo cuando se exponen al aire durante el proceso, estos microorganismos no se ven afectados en su crecimiento por la disminución del pH durante la fermentación y tampoco se afecta su desarrollo por la presencia de los antisépticos del lúpulo y mucho menos por el alcohol ya que este constituye su fuente de carbono.

Causan aumento de acidez, pérdida de sabor, turbidez por la formación de películas gruesas de celulosa (Acetobacter) mezcladas con las células bacterianas formando una película gruesa que suele denominarse " madre del vinagre ".

El género Gluconobacter requiere poco aire para desarrollar y no produce películas de celulosa.

Algunas especies producen un aumento en la viscosidad en la cerveza debido a la formación de dextranas. (15)

Generalmente es posible controlar el crecimiento de estas bacterias imponiendo condiciones anaeróbicas, aunque es posible que estas bacterias desarrollen en condiciones microaerofílicas (Gluconobacter).

El crecimiento de la bacteria del ácido acético da lugar a la formación de una película grasosa en la superficie, que puede ser observada al ser extraída la cerveza del envase.

Siendo aeróbicas, las bacterias del ácido acético pueden causar daño en cervezas de barril, sobre todo cuando la cerveza contenida en el barril no es consumida en poco tiempo, ya que estas bacterias pueden encontrarse en el medio ambiente. (15).

Se debe hacer mención de la extraordinaria facultad que poseen todas las especies de Acetobacter de presentar mutaciones.

Se ha demostrado que la especie A.cylinum que normalmente produce una película de celulosa, puede dejar de producir esta película a causa de mutaciones producidas en la bacteria.

Kulca y Walkwer en 1946, (15), al describir la influencia de 14 cepas sobre el sabor de la cerveza reportaron que la infección por estas bacterias ocasiona sabores amargos desagradables al paladar, aún cuando las cervezas no eran amargas. Quizas la oxidación que causan las bacterias sobre los polialcoholes, como la formación de dihidroxiacetona fosfato a partir de glicerol, como muestra la figura No. 7, podrían ser responsables de este tipo de alteraciones en el sabor de la cerveza.

La baja incidencia de contaminación por bacterias del ácido acético en cervezas elaboradas con la más alta tecnología, se debe principalmente a que se trata de evitar en lo posible el acceso del aire durante la fermentación y en general durante todas las etapas del proceso; el mejoramiento de la higiene de la planta y la utilización de cultivos puros de levadura también han contribuido en forma importante a evitar la contaminación.

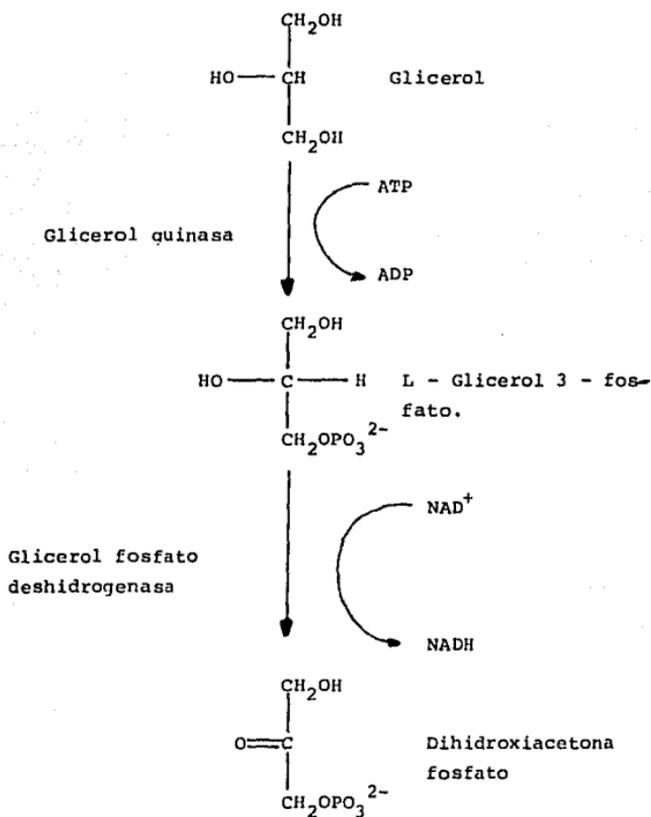
Gililand y Lasey (9), realizaron estudios sobre la posible actividad letal del Acetobacter sobre la levadura. Para este experimento se utilizó cerveza y agar - mosto (mosto y cerveza más 2 % de agar).

La levadura usada fue Saccharomyces cerevisiae (Guinness strain 1164), la cual se cultivo en mosto cervecero y en condiciones aeróbicas, a 25 °C.

Las bacterias se aislaron en agar mosto con actidione para evitar el desarrollo de la levadura.

A las cepas de Acetobacter se les denominó 'AY' que significa anti - yeast por su habilidad para causar la muerte de la levadura.

Figura No. 7 : FORMACION DE DIHIDROXIACETONA FOSFATO A PARTIR DE GLICEROL. (3).



Para demostrar la acción letal que produce la bacteria Acetobacter AY sobre la levadura, a partir de un cultivo de cerveza que contenía 0.5 millones de células de levadura por mililitro, porciones de dicho cultivo se repartieron en cuatro botellas con tapón de rosca; a las cuatro botellas de las adiciónó un inóculo de 0.25, 0.5, 1.5, 5.0 de una suspensión de Acetobacter AY, respectivamente.

Las botellas fueron incubadas a 18°C; se examinaron diariamente y se realizó un conteo posterior de las células de levadura. Finalmente se encontró que cuando están presentes igual número de levadura que de bacterias la fermentación transcurre lentamente, pero es posible obtener una cerveza hasta cierto punto, de calidad aceptable.

Si el número de células de Acetobacter es mayor que el número de células de levadura, nunca se obtendrá cerveza terminada, obteniéndose un producto en condiciones inaceptables.

Si la concentración de bacterias es mucho mayor que la de levaduras, aproximadamente diez bacterias por levadura, las bacterias preponderaron en la fermentación y causan la muerte de las levaduras en un tiempo máximo de 4 días.

Según estos investigadores la estreptomycinina no destruye la habilidad destructora del Acetobacter sobre la levadura.

Otros experimentos demostrarán que la bacteria Acetobacter "AY" sobrevive a 52°C y no pierde la capacidad de inhibir el desarrollo de la levadura. Por otra parte la exposición del Acetobacter "AY" a una temperatura de 54°C hace que se pierda su capacidad letal sobre la levadura. Esta capacidad letal también puede perderse por mutaciones que pueda sufrir el microorganismo, pero no en cepas liofilizadas.

Kulca y Walkwer (20), observaron que si se inyecta aire en grandes cantidades durante la fermentación, disminuye la actividad letal del Acetobacter "AY", pero sin embargo, en estas condiciones aeróbicas existe una mayor producción de ácido acético, que por si solo inhibe el desarrollo de la levadura.

La capacidad letal que tiene la bacteria de Acetobacter "AY", sobre la levadura no se debe a ningún producto metabólico, es indispensable que la levadura esté presente, ya que si las bacterias son eliminadas antes de inocular la levadura, no se presenta ningún efecto letal.

Debido a la apariencia de la película grasosa que se forma en la cerveza terminada se considero que el Acetobacter "AY" era la especie A. racens.

Mediante diversos experimentos se demostró que a un pH de 4.5 la Acetobacter "AY" afecta en forma letal a la levadura, por otro lado a un pH de entre 6 y 7, la levadura se desarrolla casi normalmente aún en presencia del microorganismo contaminante.

El Acetobacter representa un peligro potencial en la elaboración de la cerveza por su capacidad de desarrollarse bajo condiciones aeróbicas, por lo tanto, la cerveza no debe dejarse en recipientes semillenos sin una cubierta protectora de bióxido de carbono para prevenir el crecimiento de Acetobacter "AY".

4.8.- Género Pectinatus:

4.8.1.- Características generales: (23)

Pertenece a la familia Bacterio-

daceae.

Bastones largos, delgados con extremos redondeados, dispuestos en forma simple, en pares y en cadenas cortas.

Son microorganismos gram negativos.

Las células maduras se mueven activamente por medio de flagelos con apariencia de cepillo.

Son anaerobios estrictos.

No forman esporas.

Desarrollan a una temperatura de entre 15°C a 40°C, con una temperatura óptima de crecimiento de 32°C.

Originalmente son aislados de la cerveza embotellada o de barril.

El género Pectinatus tiene una única especie denominada P.cerevisiiphilus.

Estas bacterias desarrollan bien en medios de tioglicolato, incubandolos en jarras GAS PAK (BBL) (5), en este medio se presentan como colonias blancas, convexas circulares, claras u opacas.

Producen acidez a partir de adonitol, dulcinol, fructuosa, galactosa, glucosa, glicerol, lactato, maltosa, manitol, manosa, ramnosa y ribosa.

No fermentan la lactosa, rafinosa, sorbitol, sacarosa y xilosa.

No reducen los nitratos a nitritos, no hidrolizan el almidón; producen a partir de lactato: ácido acético, ácido succinico, ácido láctico y CO₂.

Pueden desarrollarse en una atmósfera de 80 % de N₂, 10 % de CO₂ y 10 % de H₂.

Un medio selectivo diferencial (LL - agar; Lee et al., 1981) (5) ha sido usado para el aislamiento de Pectinatus, este medio contiene: extracto de levadura 5 g/lt ; Lactato de sodio, 17 ml; ácido ascórbico, 10 g/lt; $\text{Na}_2 \text{S}_2 \text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/ lt; acetato de plomo, 0.2; azul de metileno, 0.002 ; alcohol de fenetilo, 2.0 ml y agar, 15.0 g/lt.

En este medio las cepas de Pectinatus producen colonias negras, en tanto que otros organismos contaminantes de la cerveza son inhibidos, o forman colonias - blancas.

Las bacterias de Pectinatus aisladas de cerveza se cultivan en este medio y se incuban a una temperatura de entre 30°C a 32°C , por un tiempo de 10 días.

4.8.2.- Pectinatus como Bacteria
Contaminante de la Cerveza:
(15) :

El género Pectinatus es un nuevo microorganismo capaz de crecer en cerveza con lúpulo.

Produce cantidades considerables de ácido sulfídrico y una alta turbidez cuando desarrolla en cerveza almacenada o embotellada. No produce alcohol a partir de glucosa a diferencia del género Zimomona.

Las características físicas y bioquímicas de este microorganismo indican que no está relacionado con ninguna de las bacterias que se han estudiado hasta ahora, incluyendo el género Zimomona.

Una de las cepas de Pectinatus (P.cerevisiiphilus) se encuentra depositada en la American Type Culture Collection (ATCC), con el número 29359.

Lee, Mabee (18), aislaron una bacteria que fué capaz de desarrollar en forma vigorosa en cerveza embotellada.

El Pectinatus al igual que la Zimomona también produce turbidez y un olor desagradable a manzanas podridas.

La Zimomonas producen trazas de ácido sulfídrico y niveles altos de acetaldehído, el Pectinatus produce cantidades despreciables de acetaldehído y niveles extremadamente altos de ácido sulfídrico

El propósito del estudio de estos investigadores fué el de encontrar las propiedades de el Pectinatus y su diferenciación con el género Zimomona.

Las bacterias que se utilizaron en este estudio fueron: Zimomona anaerobia NCIB 8227, Zimomona anaerobia Schwarz B - 62, Pectinatus cerevisiiphilus ATCC 293559, Sacaromyces uvarum CCC Y - 1091 esta levadura fué incluida en este estudio como un control para comparar la producción de alcohol.

Ambas cepas de Z. anaerobia se hicieron crecer en un caldo preparado a base de glucosa al 1%, extracto de levadura al 0.5%, $K_2 H P O_4$ 0.005%. La cepa de P. cerevisiophilus fué cultivada en caldo MRS para Lactobacilos. La levadura se hizo crecer en mosto de cerveza.

La producción de etanol y acetaldehído fueron determinados por un cromatógrafo de gases.

Los resultados obtenidos de mostraron que el microorganismo en estudio es capaz de crecer bien en condiciones aeróbicas o anaeróbicas en un caldo que contenía azúcares fermentables con un 2% de inóculo.

Un mínimo de espacio de aire que prevalezca en el tubo donde se desarrolla la bacteria, estimulará su crecimiento.

Pectinatus también se desarrolló bien en cerveza hermeticamente cerrada. No se obtuvo ningún crecimiento en medios sólidos bajo condiciones aeróbicas o incubándolo en una atmósfera de 98% de CO_2 .

Un inóculo del 0.3% (v/v) de desarrollo activo echó a perder la cerveza en un tiempo de 48 horas a 30°C.

La turbidez en la cerveza persistió durante varios meses a un año, antes de que las células se sedimentaran en el fondo del recipiente.

En el Cuadro No. 9 muestra las diferencias en la producción de acetaldehído y alcohol, entre bacterias las bacterias estudiadas, incluyendo el control de levadura.

Como se observa en el Cuadro No. 9 la bacteria en estudio no produce etanol y si pequeñas cantidades de acetaldehído; ambas cepas de Zimomona produjeron cantidades semejantes de etanol y acetaldehído.

El microorganismo Pectinatus produjo acidez a partir de adonitol, arabinosa, dulcitol, fructuosa, galactosa, glicerol, lactato, maltosa, glucosa-ribosa y manosa. No se presentó acidez a partir de dextrina, escuili

na, gelatina, inositol, lactosa, leche, rafnosa, sorbitol, sorbo
sa, sucrosa, xilosa.

Cuadro No. 9 : DIFERENCIAS EN LA PRODUCCIÓN DE ACETAL
DEHIDO Y ALCOHOL, ENTRE LAS BACTERIAS
ESTUDIADAS: (18).

BACTERIA	ETANOL (mmol/ 100 ml)	ACETALDEHIDO (mmol / 100ml)
<u>Z.anerobia</u> NCLB8227	12.35	0.036
<u>Z.anaerobia</u> Schwarz B-62	11.48	0.080
<u>S.uvarum</u> CCC Y- 1090	11.31	-----
<u>P.cerevisiiphilus</u> ATCC29359	-----	0.0039

----- ; no se detectaron cantidades apreciables.

El género Pectinatus afecta la cerveza más seriamente que la Zimomona a causa de su alta producción de ácido sulfídrico, acético y propiónico y una turbidez muy elevada, por lo tanto la cerveza contaminada con este microorganismo toma un olor a huevos podridos. (18).

El modo de transmisión de esta bacteria no ha sido establecido del todo, se ha aislado de aceites lubricantes mezclados con cerveza y agua y se ha encontrado en el sistema de drenaje de las fábricas de cerveza.

Puede estar presente en cualquier cervecera y no ser detectado debido a sus requerimientos de crecimiento anaerobico estricto; esta bacteria puede ser eliminada calentando la cerveza a una temperatura de 58°C, durante un minuto. (18).

5.- CONTROL Y DETECCION DE MICROORGANISMOS CONTAMINANTES EN LA INDUSTRIA DE LA CERVEZA:

5.1.- Introducción:

Los avances realizados acerca de las técnicas de laboratorio para la detección de bacterias involucradas en la contaminación de la cerveza, no han eliminado la necesidad básica del control microbiológico para prevenir el daño que ocasionan estos microorganismos, de hecho, los riesgos de contaminación de la cerveza se incrementan a medida que el tamaño de las cervecerías aumenta y cuando el volumen de su producción es considerable.

En esta sección se tratará de dar una orientación básica de los métodos más usados en el laboratorio de control de cervecerías y por otro lado algunas normas y sistemas de prevención para evitar la contaminación microbiológica en las plantas cerveceras.

5.2.- Control de Laboratorio: (6)

El mosto con o sin lúpulo proveerá los requerimientos necesarios para el crecimiento de un gran número de microorganismos, el bajo pH y el poco oxígeno disuelto en el transcurso de la fermentación, pronto resultan factores capaces de permitir solo el crecimiento de un número limitado de bacterias.

Antes del advenimiento de la fermentación en cilindros cónicos cerrados, la infección por bacterias del ácido acético era mucho mayor que en los recipientes cerrados donde el acceso de oxígeno es reducido. Pero sin embargo estas condiciones pueden favorecer el crecimiento de bacterias con respiración microaerofílica y anaerobia facultativa, sin embargo estos microorganismos serán inhibidos conforme disminuya el pH durante la fermentación.

El control microbiológico en la cerveza debería extenderse a todas las partes del proceso de producción, si se desea que este sea efectivo; el análisis del agua utilizada es extremadamente importante, ya que por esta vía pueden ocasionarse infecciones de los mostos no inoculados.

El control del mosto y la cerveza durante y después de la fermentación consiste en obtener una serie de muestras de puntos fijos escogidos de tal forma que proporcionen el máximo de información útil respecto al estado microbiológico del proceso cervecero.

En el Cuadro No. 10 muestra un esquema que se sugiere para el control del mosto, la fermentación y la cerveza producida.

Las muestras de mosto deberán ser examinadas conforme dejan el enfriador y poco antes de la inoculación de la levadura.

Los tanques de fermentación deben ser analizados antes de depositar en ellos, cualquier materia prima de la cerveza y así mismo debe ser examinada el agua de enjuague,

Cuadro No. 10 : ESQUEMA QUE SE SUGIERE PARA EL CONTROL DEL MOSTO, FERMENTACION Y CERVEZA. (6).

MUESTRA	PUNTO DE MUESTREO	FRECUENCIA	PROPOSITO
Mosto enfriado	Recipiente de fermentación antes de la inoculación.	En cada lote de cerveza.	Detección de la infección del mosto.
Mosto ebriado	Recipiente de fermentación después de la inoculación.	En cada lote de cerveza.	Detección de la infección del mosto.
Cerveza de fermentación.	Recipiente de fermentación de 12 a 15 hrs después de la inoculación.	En cada lote de cerveza	Detección de la infección persistente, chequear el crecimiento de la levadura.
	Recipiente de fermentación durante el trasiego.		Detección de la infección persistente, chequear la levadura usada
Cerveza almacenada en cuartos fríos.	Cada tanque antes de la filtración.	En cada tanque.	Detección de cualquier infección residual.
Tanques de cerveza ya filtrada.	Cada tanque después de la filtración.	En cada tanque.	Checar la eficiencia de los filtros en la remoción de cualquier contaminación.
Cerveza empaquetada.	Después del llenado.	Diferentes contenidos o depósitos en cada corrida.	Verificar la esterilidad de la cerveza en el empaque final.

de esta forma las fuentes de infección pueden ser localizadas y eliminada.

Para la detección de microorganismos contaminantes en la cervecería es necesario incluir los siguientes puntos:

(a).- Detección de fallas durante el proceso tales como, el funcionamiento defectuoso de los pasteurizadores.

(b).- La búsqueda de microorganismos contaminantes en las levaduras antes de ser inoculadas, ya que se requiere de levadura de la más alta calidad para la fermentación.

(c).- Evaluación del estado microbiológico del producto empaquetado antes de que sea distribuido al mercado.

(d).- Control microbiológico durante las reparaciones de las averías. (6).

Con respecto a las técnicas que se utilizan para la detección y cuantificación de microorganismos contaminantes de la cerveza; no es conveniente que sean muy complicadas, de tal forma que requieran de personal y equipo muy especializado.

Examinemos brevemente algunas de estas técnicas que para fines rutinarios no son utilizadas: (12)

(a).- Cromatografía de gases:

La cromatografía de gases es ideal para la identificación relativamente rápida de bacterias; los metabolitos producidos por los microorganismos durante su metabolismo son extraídos del cultivo y examinados en un cromatógrafo de gases.

El funcionamiento de un cromatógrafo de gases se basa en el coeficiente de partición o distribución de los metabolitos. El gas (fase móvil) arrastra los componentes de la mezcla a lo largo de una fase estacionaria (partí

culas de un sólido poroso recubiertas con un líquido no volátil). Mediante el flujo continuo de gas cada componente abandona la columna separadamente en un pequeño volumen de dicho gas, y se detecta mediante un sistema de detección que registra los picos de elución y el tiempo desde que se efectuó la inyección.

(b).- Medición de conductividad:

Los metabolitos producidos por las bacterias afectan la conductividad eléctrica del medio de cultivo, estos cambios pueden ser observados cuando se alcanza un conteo de células de 10^5 a 10^6 células / mililitro.

(c).- Inmunoserología:

Las bacterias contaminantes de la cerveza pueden ser identificadas mediante el uso de sueros específicos.

(d).- Técnicas radioactivas:

Se agrega al medio de cultivo un carbohidrato marcado con carbono 14, el CO_2 que se desprende es medido (con C^{14}) radioactivamente para conocer su contenido en C^{14} .

Uno de los métodos que se utilizan usualmente en el laboratorio de control de las cervecerías involucra la siembra en placa de muestras provenientes de la planta sobre un agar nutriente adecuado, la incubación puede ser aeróbica o anaeróbica. Después de la incubación, las cajas de petri son analizadas mediante la observación de las colonias y el conteo de las mismas

Cuando se quieren detectar concentraciones pequeñas de microorganismos se utiliza el método de filtración de membrana, estas membranas están constituidas de acetato de celulosa o de nitrato de celulosa.

Una porción de la muestra proveniente de la planta se hace pasar a través de la membrana; dicha membrana ya impregnada con la muestra se deposita en la superficie de un medio de cultivo sólido y se incuba a las condiciones adecuadas.

Después de la incubación se pueden efectuar pruebas como la de la catalasa, tinción de gram o la observación directa de las colonias al microscopio, para detectar la morfología de las células. (12)

5.3.- Medios de Cultivo Utilizados en el Aislamiento de Bacterias Contaminantes de la Cerveza: (5)

En los últimos 30 años se ha desarrollado un gran número de medios de cultivo para el aislamiento de bacterias de origen cervecero dos de ellos (1 y 2) del Cuadro No. 11 pueden ser usados en el trabajo de control general microbiológico en la cervecería, la mayoría de las levaduras y las bacterias gram negativas crecen bien en estos medios y además los organismos del ácido láctico como Lactobacilos y Pediococos crecen bien en estos medios bajo condiciones anaeróbicas.

Si a estos medios se les agrega actidiona, inhibirá el desarrollo de las levaduras.

Medios de cultivo diferenciales:

Los medios diferenciales son útiles para la identificación de contaminantes microbiológicos en la cervecería.

Estos medios de cultivo contienen antibióticos u otros componentes que inhiben el desarrollo de microorganismos indeseables para favorecer el crecimiento de otros.

A continuación se describe un medio diferencial muy utilizado actualmente en las cervecerías.

LEE'S MULTI-DIFERENCIAL AGAR (LMDA): ()

Este medio proporciona una recuperación bacteriana tan buena o mejor que el Medio Universal de Cerveza (UBA). (5).

Con este medio es posible identificar microorganismos mediante la observación de las colonias. El LMDA contiene Actidiona para inhibir el desarrollo de la levadura; CaCO_3 para la identificación de organismos productores de ácido y el verde de bromocresol para la observación de características en el cambio de color.

La incubación se lleva a cabo bajo condiciones anaeróbicas o aeróbicas.

**Cuadro No.11 : MEDIOS DE CULTIVO PARA EL AISLAMIENTO DE BACTERIAS
DE ORIGEN CERVECERO: (5)**

1.- Universal Beer Agar Medium (UBA) (Difco 0856)

Tomato juice broth (Caldo de Jugo de Tomate) (Difco 0856)	25.0 g
Leche peptonizada	15.0 g
Dextrosa	10.0 g
Agar	12.0 g
Agua destilada	750.0 ml
Cerveza	250.0 ml
pH	6.3

2.- Brewers' Tomato juice Medium (Medio de jugo de tomate de uso en cervecería):

Tomato Juice agar (Difco 0031)	51.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Solución A	5.0 ml
Solución B	5.0 ml
Agua destilada	1000.0 ml
pH	6.3

Solución A:

KH_2PO_4	25.0 g
K_2HPO_4	25.0 g
Agua destilada	250.0 ml

Solución B:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10.0 g
NaCl	0.5 g
FeSO_4	0.5 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5 g
Agua Destilada	250.0 ml

Cuadro No. 12: MEDIO DE CULTIVO LMDA: (17)

COMPONENTES:	g / l
Solidos de Jugo de Tomate (Tomato Juice Solids)	20.0
Leche peptonizada (Difco 0035)	20.0
Extracto de levadura (Difco 0127)	10.0
Dextrosa	10.0
Pentotenato de Calcio	2.0
Acido cítrico monohidratado	1.1
CaCO ₃	5.0
K ₂ HPO ₄	0.5
KH ₂ PO ₄	0.5
MgSO ₄	0.2
MnSO ₄	0.01
FeSO ₄	0.01
NaCL	0.01
Tween 80	0.5
Verde de bromocresol	0.022
Actidiona	0.007
Agar (Difco 0.140)	15.0
pH 5.5 después de la esterilización en auto-clavo.	

Cuadro No. 13 : INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN
EL MEDIO DE CULTIVO LMDA: (17).

ORGANISMO

C A R A C T E R I S T I C A S

Bacterias del ácido
láctico y del ácido
acético:

Vire de color del medio a amarillo; aparición de halos claros alrededor de las colonias.

Colonias de Lacto-
bacilos:

De color blanco verdoso con un centro de color verde oscuro; se presenta zona de halo y por debajo de la colonia aparece de color amarillo.

Bacterias del ácido
acético:

Presentan zona de halo; por debajo de la colonia aparece un color azul verdoso; las colonias son lisas o rugosas.

Obesumbacterium;

Colonias rugosas con centro oscuro y borde blanquecino a un azul claro.

Zimomonas y

Enterobacter:

No produjeron ni zonas de halo ni medios amarillos alrededor de las colonias; el color verdoso del medio permanece inalterado.

Zimomonas:

Colonias redondas brillantes de color azul verdoso; son pequeñas en comparación con las de Enterobacter. Al aumentar el período de incubación aumentan de tamaño.

Enterobacter:

Colonias grandes en comparación con los demás géneros contaminantes de la cerveza; son lisas y brillantes difundiendo superficialmente en el agar. Son de color verde amarillento; no producen halo.

Pediococcus:

Colonias pequeñas en comparación con el género Lactobacillos; presentan halos claros alrededor de las colonias pero estos se limitan al borde, aunque con el tiempo aumentan la zona de halo.

5.4.- Prevención de la Contaminación; (11)

Como ya se ha mencionado a lo largo de nuestro trabajo, las bacterias contaminantes son responsables de la pérdida de la calidad de la cerveza, afectandola en el sabor, olor, aspecto etc. Por estas razones es de suma importancia evitar en lo posible ambientes propicios para el desarrollo bacteriano.

La mejor forma de minimizar el número de microorganismos es asegurando un programa de limpieza efectivo; la limpieza en una planta cervecera es la mejor arma que se tiene para eliminar los problemas de contaminación y puede ser definida como una técnica que hace posible el lavado y esterilizado de dicha planta de procesamiento.

Actualmente existe un sistema denominado CIP (Cleaning-in-place), (10).

Este sistema incluye programas de control en la higiene de las plantas e incluye que las plantas se construyan tomando en cuenta las demandas de lavado indispensables para la producción de cerveza.

El CIP opera mediante la circulación de soluciones lavadoras a través de las diferentes zonas de la planta sin necesidad de desarmar ninguna de sus instalaciones removiendo suciedades y microorganismos mediante una actividad química y física.

A continuación se indican los factores que gobiernan el sistema CIP para una limpieza efectiva en la planta:

1).- Las líneas deben estar libres de obstrucciones e incrustaciones.

2).- No deben de existir ramificaciones excesivas de las tuberías, puntos muertos y puntos terminales en las líneas de conducción.

3).- Es necesario que las válvulas de venteo (para expulsar el aire) se encuentren completamente abiertas durante la limpieza para evitar burbujas atrapadas en el interior.

4).- Procurar no dejar las soluciones limpiadoras por tiempos prolongados ya que pueden fragmentar las válvulas, tuberías y las paredes de los tanques.

5).- Las líneas no deben dejarse vacías por tiempos prolongados después del lavado así como también los tanques de fermentación y almacenamiento.

6).- El piso de la planta debe de estar libre de residuos de cerveza o levadura para evitar la proliferación de microorganismos contaminantes.

Las fuentes de contaminación pueden ser las siguientes:

1).- Fallas mecánicas u operacionales de filtros, pasteurizadores etc.

2).- Plantas mal lavadas o sucias y esto incluye la planta de manejo de levadura, ya que si esta se contamina se puede exparcir la infección a todas las etapas del proceso durante la elaboración de la cerveza.

3).- La aparición de goteras provenientes de fuentes externas, mal limpiado de pisos, válvulas defectuosas.

4).- Las válvulas de las líneas de conducción de la cerveza deberán ser examinadas frecuentemente y remplazadas tan pronto como presenten signos de deterioro.

Las válvulas deben limpiarse estando totalmente abiertas, así, durante la limpieza de las tuberías las válvulas no deben de estar parcialmente abiertas o cerradas.

5).- Después de limpiar las líneas, si no se utilizan inmediatamente deben permanecer cargadas con alguna sustancia esterilizante.

6).- Al vaciar los tanques de fermentación y almacena - miento, es conveniente enjuagarlos inmediatamente para evitar la acumulación de residuos difíciles de eliminar, los cuales propician el desarrollo de bacterias contaminantes.

5.4.1.- Detergentes y Esterilizantes: (1)

El objetivo de usar un detergente es el de mantener a la planta visualmente limpia; por otro lado, la esterilización mantiene dicha planta libre de infección.

Es muy importante que se utilicen detergentes y esterilizantes que no impartan sabores u olores anormales a la cerveza.

Los detergentes no deben deteriorar o corroer la planta, no ser tóxicos para el personal, y puedan ser desalojados a la cañería sin causar contaminación al medio ambiente.

El agua debe cubrir las zonas que se van a limpiar antes de aplicar el detergente.

Otra de las características que debe de tener un detergente es de ser enjuagables rápidamente, los agentes surfactantes son los más fáciles de eliminar por lavado.

Por lo regular los tanques son lavados por medio de aspersores, en frío con detergentes cáusticos para mantener las temperaturas frías de la planta.

Las tuberías deben limpiarse en caliente, porque esto no afecta las temperaturas de la planta.

Los agentes esterilizadores o sanitarios pueden ser bactericidas (eliminadores de bacterias), fungicidas (eliminadores de hongos), algicidas (eliminadores de algas), viricidas (eliminadores de virus). Si se cambia la terminación 'cida' por 'statico' en cualquiera de los términos anteriores, el agente solo inhibe el crecimiento del microorganismo sin producir su muerte.

Aunque se utilizan en forma separada el detergente y el agente esterilizador, muchas veces es necesario que el detergente por si mismo sea capaz de aniquilar los microorganismos que contaminan la planta, por ejemplo durante el lavado de botellas o en los programas CIP.

La sosa cáustica tiene propiedades bactericidas las cuales dependen de la concentración, temperatura y tiempo de contacto.

Cuadro No. 14 : DETERGENTES UTILIZADOS EN ESTA INDUSTRIA, (1)

Inorganicos alcalinos:

Hidróxido de sodio (NaOH)

Hidróxido de potasio (KOH)

Metasilicato de sodio ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

Fosfato trisódico ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)

Algunos ácidos inorganicos que pueden utilizarse son:

Acido fosfórico (H_3PO_4)

Acido clorhídrico (HCl)

Detergentes orgánicos:

Gluconato de sodio

EDTA

Surfactantes

Los compuestos esterilizadores más usados son: El cloro y el yodo y compuestos cuaternarios de amonio (cloruro de benzalconio).

El cloro y el yodo destruyen a los microorganismos por oxidación química mientras que los compuestos de amonio causan la ruptura ósmotica de la pared celular

de los microorganismos.

La meta de un cervecero es darle al consumidor una cerveza envasada que tenga un sabor fresco de igual calidad que la cerveza recién salida del tanque. En la práctica esta meta se logra por muchos medios debido a la tecnología del envasado de la cerveza en grandes cantidades en botellas o latas. Al mismo tiempo se tiene la necesidad de proporcionar una cerveza envasada libre de contaminación microbiológica.

Para lograr estos propósitos se requiere de una filtración y la pasteurización de la cerveza.

La pasteurización es el proceso de someter productos de fácil descomposición tales como la cerveza, a un grado de calor suficiente para destruir la vida microbiana, o por lo menos inactivarla, pero generalmente no tan intenso que pueda producir daño en la calidad del producto. (24).

El proceso de la pasteurización se realiza a 60°C. El calentamiento se lleva a cabo mediante el vapor, agua caliente, calor seco o corrientes eléctricas.

El método de pasteurización más usado en la industria de la cerveza es el que utiliza vapor de agua como transmisor de calor. Por este método se puede pasteurizar ya sea antes o después del envasado de la cerveza. Cuando se pasteuriza antes de envasarse, el método utilizado es el llamado pasteurización flash. Cuando se pasteuriza después de envasarse la cerveza el método más utilizado es el llamado pasteurización tunel. (24).

La pasteurización flash es llevada a cabo en un intercambiador de calor de placas en el cual hay tres secciones: a) una sección de regeneración; b) una sección de calentamiento; c) una sección de enfriamiento. La cerveza es bombeada a la primera sección (a) pasando a la siguiente sección (b) en donde se calienta a la temperatura de pasteurización por el paso a contracorriente de agua caliente o vapor y se mantiene por un cierto período en un tubo retenedor. Luego regresa a la primera sección (a) donde pierde calor con la cer

veza que pasa a contracorriente y posteriormente fluye a contracorriente en salmuera fría en la sacción (c).

La pasteurización tunel se efectua después del embotellado; estos pasteurizadores comprenden una larga cubierta metálica dividida, encerrando una cadena transportadora continua. Las botellas ya llenas y tapadas son llevadas a la entrada del pasteurizador y pasan a una esprea de agua caliente que eleva la temperatura hasta lograr la pasteurización de la cerveza embotellada. Después estas botellas son enfriadas con agua a temperatura gradualmente más fría por medio de diferentes asperjadores, hasta alcanzar la temperatura ambiente. Las capacidades de las pasteurizadoras están normalmente entre los límites de 2000 a 6000 botellas / hr.

En la obtención de cerveza de barril embotellada es necesario eliminar todo contacto con el calor por lo que fué introducido el proceso de filtración estéril.

La esterilización a base de filtros se puede dividir en dos tipos : Filtración múltiple y filtración de membrana.

Filtración múltiple : En este caso los poros de los filtros son mayores que los microorganismos, aunque la filtración repetida va taponando dichos poros y esto hace que las bacterias puedan ser retenidas lo cual da como resultado que la cerveza tenga una contaminación muy por debajo del nivel crítico.

Filtración de membrana: En este tipo de filtración los poros son lo suficientemente pequeños para evitar el paso de las bacterias. La Filtración de membrana se le considera recientemente como una de las mejores formas de esterilizar a la cerveza, sin embargo economicamente resulta muy costoso.

Los filtros de membrana están constituidos por acetato de celulosa. (24)

6.- Conclusiones:

A lo largo de este estudio nos hemos dado cuenta que la cerveza requiere de un estricto y organizado control de calidad para que sea posible obtener un producto exento de alteraciones causadas por bacterias contaminantes que pueden ser detectadas por el paladar de personas que en forma cotidiana toman cerveza.

Como se ha mencionado las especies de microorganismos más importantes que contaminan la cerveza durante su elaboración son los Lactobacilos, Pediococos, Obesumbacterium, Acetobacter, Gluconobacter, Enterobacter, Zimomonas, Pectinatus.

Se ha observado que cada una de estas bacterias tienen preferencia por una etapa del proceso. Así los Lactobacilos y Pediococos pueden encontrarse en el mosto, durante la fermentación y durante el reposo.

El Obesumbacterium proteus puede desarrollarse en las tinajas de levadura de fermentación y de reposo.

El Enterobacter crece principalmente en el mosto y al principio de la fermentación.

Las Zimomonas han sido aisladas de los cepillos de las máquinas llenadoras de botellas y por lo tanto pueden encontrarse en el interior de las botellas cerradas.

Las bacterias del ácido acético se desarrollan en mosto o en la cerveza sobre todo cuando se exponen al aire libre durante el proceso.

El Pectinatus se desarrolla en cerveza almacenada o embotellada.

Por lo anterior es importante que el control microbiológico en la cervecería se aplique a todas las etapas del proceso.

Además la cervecería deberá estar perfectamente limpia en toda su extensión abarcando tanto las áreas visibles como las no visibles (drenajes, salidas de líquido fuera de la fábrica etc.).

Otro punto importante es el mantenimiento adecuado de todas las instalaciones de la planta para evitar obstrucciones, goteras, válvulas defectuosas, funcionamiento defectuoso de los pasteurizadores y mantener en buen estado las paredes de los tanques.

Es de suma importancia que la aplicación de las técnicas de esterilización y asepsia aplicadas a todo el equipo de producción, sea verdaderamente efectiva.

También es necesario contar con un buen laboratorio de control de calidad que tenga todos los aparatos, equipos de cristalería, sustancias químicas, medios de cultivo y reactivos requeridos y contar con un personal profesional perfectamente entrenado para poder detectar y controlar cualquier contaminación o alteración del producto durante su proceso.

También será necesario renovar el equipo y las líneas de producción cada vez que sea necesario, para evitar su mal estado lo que haría más difícil el mantener la elevada calidad que actualmente se requiere en la elaboración de la cerveza.

Es importante entender que en la industria cualquier gasto que se haga, por elevado que parezca, es realmente bajo si se efectúa para mejorar o sostener la calidad del producto, ya que esto hará que sea aceptado cada vez más en el mercado comercial lo que redundará siempre en mayores beneficios para esa industria.

BIBLIOGRAFIA :

- (1).- Barret, Michael. Detergents and terilants in the rewe ry. Agosto, 1979: 35-40
- (2).- Broderick, Harold G.M. El Cervecerero en la Práctica. 2a Edición. Consejo Editorial de la MBAA. Venezuela. 1977: 3-282.
- (3).- Brock, D.Thomas. Biología de los Microorganismos. 2a Edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. 1978: 99-104.
- (4).- Case, A.C. Conditions controlling Flavobacterium proteus in brewery fermentations. J.Inst. Brew. 1975. 71: 250-303.
- (5).- Casey, P.Gregory & Ingredew, W.M. The Use and understanding of media used in brewing bacteriology. Brewers Digest. Nov. 1981. 10 : 72-77.
- (6).- Cowwan, David. Control and deteccion of microorganims in breweries. Brewers Guardian. February 1977: 11-29.
- (7).- Dennis, R.T. & Young, T.W. A simple rapid method for the detection of subspecies of Zymomonas mobilis. J.Inst. Brew. January-February, 1982. 88: 25-29.
- (8).- Fessenden, S.Ralph & Fessenden, S.Joan. Techniques and Experiments for Organic Chemistri. 2a Edition. Ed.Williar Grand Press. Boston. 1973: 378.
- (9).- Gilliland, R.B. & Lacey, J.P. An Acetobacter lethal to yeast in bottled beer. J. Inst. Brew. 1966. 72: 291-302.
- (10).- Hamilton, Gordon. Cleaning-in-place plant and procedings. Brewers Guardian. July, 1979: 53-55.
- (11).- Harrison, Caslie. Laboratory control of brewery higiene. Brewery Guardian. September, 1979: 47-50.
- (12).- Harrison, J. ; Webb, T.J.B. & Martin, P.A. The rapid deteccion of infection. ASBC. Proceeding. Agosto, 1974: 76-79.
- (13).- Hope, C.F.A. & Tubb, R.S. Approaches to rapid microbial monitoring in brewing. J.Inst.Brew. January-February, 1985. 91: 12-15.

- (14).- Hough, J.S. ; Briggs, D.E. & Stevens, R. Malting and Brewing Science. 2a Edición. Chapman and Hall. London England. 1975: 93-180.
- (15).- Ingledew, W.M. Effect of bacterial contaminants on beer. A review. ASBC Journal. Junio, 1979. 37, (3):145-150.
- (16).- James, E.Middlekauff & Sondag, Raymond. Studies on quality of end products during Pediococcus growth and metabolims. ASBC Proceeding. April, 1984. 15: 17-19.
- (17).- Lee, S.Y. ; Jangaard, N.O. & Coors, J.N. Lee's multi-diferencial agar (LMDA); A culture medium for enumeration and identification of brewery bacteria. ASBS Proceedings. October, 1977. 33, (1): 18-25.
- (18).- Lee, S.Y. ; Mabee, M.S. ; Jangaard, N.O. & Horiuchi. Pectinatus, a new genus of bacteria capable of growth in hopped beer. J.Inst.Brew. January-February, 1979. 85: 28-30.
- (19).- Masschelein, A. Effect of beer bacteria on beer flavor. The Brewers Digest. August, 1973: 54-57.
- (20).- Murrough & Palmer. Lactic acid production in sweet worts. J.Inst.Brew. January-February, 1979. 86: 11-14.
- (21).- Mc.Caig, Robert & Weaver, Robert. Physiological studies on Pediococcus. MBAA Technical Quarterly, 1983. 20, (1): 31-38.
- (22).- Neuton, R. & Ault, R.G. Spoilage Organims in Brewing.3a Edición. Editorial Modern Brewing Technology. Cleveland. 1971: 34-82.
- (23).- Noel, R.Krieg. ; Jhon, G.Holt. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Editorial Board. London. 1984: Volumen.1 y volumen 2.
- (24).- Portno, A.D. Pasteurization and sterilization of beer, a review. J.Inst.Brew. March, 1968. 74: 291-300.
- (25).- Priest, F.G. ; Somerville, H.J. ; Cole, J.A. & Hough, J.S. The taxonomic position of Obesumbacterium proteus, a common brewery contaminant. Journal of General Microbiology. January, 1973. 75: 285-307.

- (26).- Priest, G.Fergus. The classification and nomenclature of brewing bacteria, a review. J.Inst.Brew. September-October, 1981. 87: 279-281.
- (27).- Sokatch, J.R.. Bacterial Phisiology and Metabolism. 2a edición. Editorial Academic Press. London. 1969: 203-205.
- (28).- Schlegel, G.Hans. Microbiología General. 2a Edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. 1979: 179-247.
- (29).- Van vuren, H.J.J. ; Kersters, K. ; Toerien, Deley.J. & Meisel, R. Enterobacter agglomerans a new / bacterial con taminant isolated from lager beer breweries. J.Inst.Brew. December, 1978. 84: 315-317.
- (30).- Van Vuren, H.J.J. ; Cosser, K. & Prior, B.A. The influens of Enterobacter agglomerans on beer flavour. J.Inst.Brew. January-February, 1980. 86: 31-33.
- (31).- Woodward, J.D. Deteccion of Zimomonas. J.Inst.Brew. March -April, 1982. 88: 84-95.