



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Bacterias lácticas: evaluación de la producción de aminas  
biógenas y su crecimiento en diversos estilos cerveceros**

**T E S I S**

**Que para obtener el título de  
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA**

**KARLA JIMÉNEZ MORATO**

**ASESOR EXTERNO**

Dra. MAGALY RODRÍGUEZ SAAVEDRA

**ASESOR INTERNO**

Dra. MARITERE DOMÍNGUEZ ROJAS

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA**  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

**Bacterias lácticas: evaluación de la producción de aminos biógenas y su crecimiento en diversos estilos cerveceros.**

Que presenta la pasante: **Karla Jiménez Morato.**

Con número de cuenta: **313247495** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Marzo de 2021.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	
<b>VOCAL</b>	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Dolores Molina Jasso	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Q.F.B. David Ladislao Sánchez	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/cnn\*



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**



**Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.**

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

**Bacterias lácticas: evaluación de la producción de aminas biógenas y su crecimiento en diversos estilos cerveceros.**

Que presenta la pasante: **Karla Jiménez Morato.**

Con número de cuenta: **313247495** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Marzo de 2021.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	<b>NOMBRE</b>	<b>FIRMA</b>
<b>PRESIDENTE</b>	<u>Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez</u>	
<b>VOCAL</b>	<u>Dra. Maritere Domínguez Rojas</u>	
<b>SECRETARIO</b>	<u>Dra. Dolores Molina Jasso</u>	
<b>1er. SUPLENTE</b>	<u>Q.F.B. David Ladislao Sánchez</u>	
<b>2do. SUPLENTE</b>	<u>Dra. María Eugenia Aranda Barradas</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/cnn\*



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

ACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

**Bacterias lácticas: evaluación de la producción de aminas biógenas y su crecimiento en diversos estilos cerveceros.**

Que presenta la pasante: **Karla Jiménez Morato.**

Con número de cuenta: **313247495** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Marzo de 2021.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	<b>NOMBRE</b>	<b>FIRMA</b>
<b>PRESIDENTE</b>	<u>Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez</u>	_____
<b>VOCAL</b>	<u>Dra. Maritere Domínguez Rojas</u>	_____
<b>SECRETARIO</b>	<u>Dra. Dolores Molina Jasso</u>	
<b>1er. SUPLENTE</b>	<u>Q.F.B. David Ladislao Sánchez</u>	_____
<b>2do. SUPLENTE</b>	<u>Dra. María Eugenia Aranda Barradas</u>	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/cms\*



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA**  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.



Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

**Bacterias lácticas: evaluación de la producción de aminas biógenas y su crecimiento en diversos estilos cerveceros.**

Que presenta la pasante: **Karla Jiménez Morato.**

Con número de cuenta: **313247495** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Marzo de 2021.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	_____
<b>VOCAL</b>	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Dolores Molina Jasso	_____
<b>1er. SUPLENTE</b>	Q.F.B. David Ladislao Sánchez	_____
<b>2do. SUPLENTE</b>	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	_____

NOTA: los sindicales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/cnn\*



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

**Bacterias lácticas: evaluación de la producción de aminas biógenas y su crecimiento en diversos estilos cerveceros.**

Que presenta la pasante: **Karla Jiménez Morato.**

Con número de cuenta: **313247495** para obtener el Título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica.**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Marzo de 2021.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Q.F.B. Jonathan Pablo Paredes Juárez	_____
<b>VOCAL</b>	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Dolores Molina Jasso	_____
<b>1er. SUPLENTE</b>	Q.F.B. David Ladislao Sánchez	_____
<b>2do. SUPLENTE</b>	Dra. María Eugenia Aranda Barradas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

LMCF/cnn\*

## AGRADECIMIENTOS

A lo largo del proceso de mi carrera en la Licenciatura en Bioquímica Diagnostica, muchas personas han sido las que han aportado tiempo, dedicación, conocimiento y experiencias para concretar mi formación; maestros, amigos y familia que estuvieron conmigo cuando lo necesite.

De forma muy especial para el desarrollo de mi tesis en la parte experimental agradezco al Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Alimentación (CIAL-UAM-CSIC), bajo la supervisión de la Dr. Magaly Rodríguez Saavedra y la Dr. M. Victoria Moreno-Arribas a quienes agradezco su confianza y la oportunidad de integrarme a su grupo de Biotecnología Enológica Aplicada, esta inclusión me permitió adentrarme más al estudio de la cerveza y adquirir conocimientos y experiencias que sin duda enriquecieron la presente investigación.

Expreso mi profundo agradecimiento a mis tutoras de tesis Dr. Maritere Domínguez Rojas y la Dr. Magaly Rodríguez Saavedra, por su orientación, instrucción, colaboración durante el desarrollo de esta investigación, así como en aspectos socioemocionales.

Mi gratitud a la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma mater, con la cual tengo una deuda infinita por la formación académica, personal que he recibido en sus aulas, así como agradecer la beca recibida para la estancia de investigación que hizo posible el desarrollo del tal trabajo.

No tengo palabras para expresar mi agradecimiento a mis padres queridos Miriam y César, quienes me han dado todo su cariño, apoyo, aliento e instrucciones durante toda mi vida, y que sin duda han confiado en mí, en todo momento; por lo que me siento afortunada de tenerlos. A mi madre Miriam Isabel, quien me ha brindado su amor y cuidado incondicional, igualmente sus consejos que me han guiado durante toda la vida; a mi padre César quien ha sido mi respaldo en todo momento, así como su orientación oportuna; a mi hermana Diana quien me ha acompañado en todo momento; a mi hermana Maia Valeria por su alegría; solo me resta decir gracias Dios, quien ha sido mi motor y ha puesto a todas esas personas maravillosas que están a mi lado y darme la fortaleza para concluir mi carrera.



## ÍNDICE

I.	RESUMEN .....	XI
II.	ÍNDICE DE FIGURAS .....	XII
III.	ÍNDICE DE TABLAS.....	XIII
IV.	LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
	INTRODUCCIÓN.....	1
1.	MARCO TEÓRICO.....	3
1.1	La cerveza.....	3
1.1.1	La cerveza artesanal .....	3
1.1.2	Proceso de elaboración de la cerveza.....	4
1.1.3	Características físico-químicas de la cerveza.....	5
1.1.4	Legislación actual .....	8
1.2	Principales microorganismos contaminantes de la cerveza .....	9
1.2.1	Bacterias ácido-lácticas .....	10
1.2.1.1	<i>Lactobacillus</i> spp.....	11
1.2.1.2	<i>Pediococcus</i> spp.....	12
1.2.1.3	<i>Leuconostoc</i> spp.....	12
1.2.2	Principales alteraciones producidas por BAL en cervezas .....	13
1.2.3	Otros microorganismos contaminantes de la cerveza .....	14
1.3	Crecimiento de BAL en cerveza.....	15
1.3.1	Ocurrencia de BAL en cerveza .....	15
1.3.2	Genes de resistencia al lúpulo presentes en BAL .....	15
1.3.2.1	Principales genes de resistencia .....	16
1.3.2.2	Otros genes relacionados.....	18
1.4	Producción de aminas biógenas en cerveza.....	19
1.4.1	Presencia de aminas biógenas en cerveza .....	20
1.4.2	Genes asociados a la producción de aminas biógenas.....	20
1.4.3	Toxicidad causada por aminas biógenas y límites legales.....	20
2	OBJETIVOS.....	23

2.1	Objetivo general .....	23
2.2	Objetivos particulares .....	23
3	<b>METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b> .....	24
3.1	Acondicionamiento de BAL al crecimiento en cerveza .....	24
3.1.1	Cepas de bacterias ácido-lácticas .....	24
3.1.2	Adaptación de las BAL al crecimiento en cerveza .....	24
3.2	Análisis físico-químico de cervezas.....	25
3.2.1	Preparación de muestras .....	25
3.2.2	pH y acidez total .....	26
3.2.3	Extracto fermentable por levaduras .....	26
3.2.4	Amargor .....	26
3.3	Evaluación del crecimiento de las BAL en cerveza.....	27
3.3.1	Inoculación de BAL en cerveza .....	27
3.3.2	Medición del crecimiento de BAL en cerveza.....	27
3.3.3	Detección de genes asociados con la resistencia al lúpulo en BAL .....	28
3.4	Evaluación de la producción de AB en cerveza.....	30
3.4.1	Inoculación de BAL en cerveza artesanal.....	31
3.4.2	Cuantificación de AB producidas en cerveza.....	31
3.4.3	Detección de genes relacionados con la producción de AB en BAL .....	31
3.5	Análisis estadístico .....	33
4	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	34
4.1	Acondicionamiento de BAL al crecimiento en cerveza .....	34
4.1.1	Adaptación de BAL al crecimiento en cerveza.....	34
4.2	Análisis físico-químico de cervezas.....	34
4.2.1	pH.....	36
4.2.2	Extracto fermentable por levadura.....	37
4.2.3	Amargor .....	37
4.3	Crecimiento de BAL en cerveza.....	38
4.3.1	Inoculación de BAL en cerveza .....	38
4.3.2	Medición del crecimiento de BAL en cerveza.....	39
4.4	Identificación de genes que confieren resistencia al lúpulo.....	40
4.4.1	Capacidad de deterioro de BAL en cerveza y presencia de genes relacionados con la resistencia al lúpulo .....	42

4.5 Producción de AB en cerveza y presencia de genes de aminoácidos descarboxilasa .....	46
5 CONCLUSIONES .....	48
6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
7 ANEXOS .....	55

## RESUMEN

La cerveza se considera una bebida estable microbiológicamente debido a la presencia de etanol, ácidos procedentes del lúpulo, valores de pH bajos y concentraciones reducidas de oxígeno, sin embargo, hay un grupo pequeño de bacterias alterantes resistentes a estas condiciones, siendo las bacterias ácido-lácticas (BAL) los microorganismos más comunes que pueden llegar a producir turbidez, olores y sabores desagradables.

La cerveza artesanal en comparación a la cerveza producida industrialmente es más susceptible al deterioro microbiano pues a menudo no implica un proceso de pasteurización y/o filtración.

En este contexto el objetivo principal de este proyecto es el estudio de la capacidad alterante de BAL y su producción de aminas biógenas (AB) en cerveza artesanal. Para ello se seleccionaron seis microorganismos pertenecientes al grupo de las BAL: *Lactobacillus brevis* (CIAL-BL1 y CIAL-BDI), *L. plantarum* (CIAL-BF1), *L. paracasei* (CIAL-B6), *Leuconostoc mesenteroides* (CIAL-B3) y *Pediococcus acidilactici* (CIAL-PF) que se adaptaron de forma secuencial en medios líquidos similares a la cerveza para posteriormente ser inoculadas en once tipos de cervezas artesanales. Dos aislados de *L. brevis* mostraron la capacidad más importante de deterioro de la cerveza con un 90.9 % de las cervezas ensayadas ya que crecieron en condiciones más ácidas, con un contenido de alcohol más elevado y con más lúpulo; además presentaron los genes *horA* y *horC*. Estos mismos aislados produjeron cantidades considerables de putrescina y tiramina.

Estos hallazgos indican que la cervecería artesanal debe enfocar sus esfuerzos en procesos de higiene y saneamiento para evitar cualquier riesgo para la calidad de la cerveza y la salud de los consumidores.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Proceso de elaboración de cerveza.....	5
<b>Figura 2.</b> Micrografía de microcolonias de <i>L. plantarum</i> , cultivadas a pH de 3, por microscopía de barrido electrónico.....	11
<b>Figura 3.</b> Estructura morfológica de <i>P. damnosus</i> por microscopía de barrido electrónico .....	12
<b>Figura 4.</b> <i>L. mesenteroides</i> por microscopía de barrido electrónico .....	13
<b>Figura 5.</b> Transferencia hipotética horizontal de <i>horA</i> y <i>horC</i> .....	15
<b>Figura 6.</b> Mecanismos propuestos de resistencia de BAL a los compuestos del lúpulo.....	17
<b>Figura 7.</b> Secuencia de los medios líquidos empleados para la adaptación de BAL.....	23
<b>Figura 8.</b> Valores indicativos de pureza en muestras de ADN.....	27
<b>Figura 9.</b> Muestras de cervezas utilizadas, atemperadas y descarbonatadas.....	32
<b>Figura 10.</b> Alcohol por volumen de las once cervezas seleccionadas.....	33
<b>Figura 11.</b> Valores de pH registrados en las once cervezas seleccionadas.....	33
<b>Figura 12.</b> Valores del extracto fermentable por levaduras (% YFE) de las once cervezas seleccionadas.....	34
<b>Figura 13.</b> Valores de las Unidades Internacionales de amargor (BU) de las once cervezas seleccionadas.....	35
<b>Figura 14.</b> Separación de la fase orgánica (iso- $\alpha$ -ácidos) y la acuosa en la determinación de BU35	
<b>Figura 15.</b> Siembra por spot para el conteo del inóculo de L1 en agar MRS .....	36
<b>Figura 16.</b> Imágenes correspondientes a la evaluación del crecimiento de BAL en los distintos estilos de cerveza.....	36
<b>Figura 17.</b> Curva de la qPCR para la detección de <i>horC</i> en L1, DI y B1, siguiendo el método descrito por Sami et al., 1997 y Susuki et al., 2006.....	37
<b>Figura 18.</b> Curva de la qPCR para la detección <i>horC</i> en L1 y D1, siguiendo el método descrito por Haakensen, M. et al., en 2008.....	38
<b>Figura 19.</b> Curva de la qPCR del gen 16S rRNA de las once cepas descritas en la Tabla 4.....	39
<b>Figura 20.</b> Curva de la qPCR, donde se detecta la amplificación de <i>horA</i> en L1 .....	41

<b>Figura 21.</b> Curva de la qPCR, donde se detecta la amplificación de <i>horC</i> en L1 y D1.....	42
<b>Figura 22.</b> Curva de la qPCR, donde se detecta la amplificación de <i>hitA</i> en L1.....	42
<b>Figura 23.</b> Curva de la qPCR, donde se detecta la amplificación de ORF5 en B1 y B6 .....	43
<b>Figura 24.</b> Curva de la qPCR, donde se detecta la amplificación de ORF5 en D1 y L1 .....	43

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características generales de especies del género <i>Lactobacillus</i> que provocan deterioro en la cerveza .....	11
<b>Tabla 2.</b> Microorganismos productores de AB en bebidas fermentadas .....	18
<b>Tabla 3.</b> Efectos fisiológicos y toxicológicos de las AB.....	20
<b>Tabla 4.</b> Cepas de BAL y su fuente de aislamiento .....	22
<b>Tabla 5.</b> Primers utilizados en la detección de genes asociados a la resistencia al lúpulo .....	26
<b>Tabla 6.</b> Primer utilizado como control interno para la presencia de ADN bacteriano (16S rRNA) .....	26
<b>Tabla 7.</b> Composición de los " Master Mix" para la detección de genes que confieren resistencia al lúpulo.....	28
<b>Tabla 8.</b> Condiciones de la qPCR para la detección de genes asociados a la resistencia al lúpulo	28
<b>Tabla 9.</b> Primers utilizados en la detección de genes relacionados con la producción de AB ....	29
<b>Tabla 10.</b> Composición de los "Master Mix" para la detección de genes relacionados a la síntesis de AB.....	30
<b>Tabla 11.</b> Condiciones de la qPCR para la detección de genes relacionados a la síntesis de AB	31
<b>Tabla 12.</b> Características físico-químicas (media $\pm$ desviación estándar) de las cervezas utilizadas en la evaluación de la capacidad de deterioro por BAL.....	32
<b>Tabla 13.</b> Concentración de BAL, inoculadas en las cervezas .....	36
<b>Tabla 14.</b> Resultados de la cuantificación y pureza del DNA (Nanodrop®) .....	39
<b>Tabla 15.</b> Capacidad de deterioro de las BAL a la cerveza y genes que confieren resistencia al lúpulo.....	41

**Tabla 16.** Genes relacionados con la síntesis de AB y su cuantificación en la cerveza B12..... 45

### **LISTA DE ABREVIATURAS**

ABV	Alcohol por volumen
BAL	Bacterias ácido – lácticas
EBC	Convención Europea de Cervecería
BU	Unidades de amargor
MRS	Man, Rogosa y Sharpe
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
YFE	Extracto fermentable por levaduras

## INTRODUCCIÓN

Desde hace muchos años la cerveza se ha considerado como una bebida microbiológicamente estable y segura, estas cualidades son proporcionadas por sus características físico-químicas, como la presencia de sustancias amargas procedentes del lúpulo, etanol (0.5-14 % Alc.Vol), bajo pH, alto contenido de dióxido de carbono y sólo trazas de sustancias nutritivas (glucosa, maltosa) (Suzuki, Iijima, Sakamoto, Sami & Yamashita, 2006). A pesar de ello existen algunos microorganismos capaces de crecer, causando un incremento en la turbidez y cambios sensoriales en la cerveza, trayendo consigo importantes pérdidas económicas para la industria cervecera (Back, 1994; Sakamoto & Konings, 2003). Se debe tener en cuenta que el sector cervecero está en constante crecimiento productivo y de consumo, tal es el caso de México y España, siendo México el país que ocupa el cuarto lugar como productor de cerveza en el mundo y España el país con mayor crecimiento en el número de cervecerías artesanales, así como uno de los mayores consumidores de cerveza en el mundo (De España, 2016; De México, 2018).

Las cervezas artesanas son más susceptibles a las contaminaciones microbianas por no incluir en su elaboración los procesos de filtración ni pasteurización, como sí se realiza en las cervecerías industriales. A pesar de que el número de especies microbianas con capacidad deteriorante en la cerveza es relativamente pequeño, los estudios hasta la fecha documentan que el 70% de estas contaminaciones son causadas por bacterias ácido-lácticas (BAL), destacando entre ellas los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus* (Garofalo, Osimani, Milanović, Taccari, Aquilanti & Clementi, 2015; Suzuki, Asano, Iijima & Kitamoto, 2008). Algunas de las especies pertenecientes a estos géneros han desarrollado mecanismos de resistencia al lúpulo relacionado con la presencia de ciertos genes, los cuales pueden ser detectados mediante el uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Suzuki *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2008; Schneiderbanger, Grammer, Jacob & Hutzler, 2018). Estos genes sugeridos son: *horA*, *horC* *hitA*, y probablemente ORF5. Sin embargo, la sola presencia de estos genes no predice el crecimiento de BAL en cerveza, sino que, dependerá de la expresión de estos genes y de las características físico-químicas de la cerveza, por lo que se hace necesario verificar la capacidad de crecimiento de las BAL presentes en la microbiota de una cervecería artesanal en los diferentes estilos cerveceros que produce.

Desde el punto de vista de seguridad alimentaria, otro aspecto a tener en cuenta relacionado



con BAL es la posible producción de aminas biógenas (AB), siendo las principales; histamina, tiramina, putrescina, cadaverina y espermina (Poveda, Ruiz, Sesena & Palop, 2017; Poveda, 2019). La acumulación de estos compuestos en los alimentos está relacionada con la presencia de microorganismos con actividad descarboxilasa, como lo son la mayoría de BAL (Marcobal, de las Rivas, Moreno-Arribas & Muñoz, 2006). Las AB juegan un papel importante a nivel fisiológico, como la regulación de temperatura, pH del estómago, actividad inmune, crecimiento, diferenciación celular entre otras; sin embargo, una ingesta de altas concentraciones de AB puede inducir a reacciones adversas en el consumidor, tales como náuseas, dolores de cabeza, erupciones cutáneas, cambios en la presión sanguínea, etc. (Marcobal *et al.*, 2006).

Aunque es cierto que no es común encontrar AB en cervezas industriales (la mayoría producidas por baja fermentación) en comparación con otras bebidas alcohólicas como el vino, es necesario estudiar la posible generación de AB por BAL, en los diversos estilos de las cervezas artesanales, ya que la introducción de nuevas materias primas, el uso de nuevos microorganismos, la elaboración a través de fermentación espontánea u otros factores podrían favorecer la producción de AB.

Por lo expuesto, el siguiente estudio evalúa el posible crecimiento de las BAL en diferentes estilos cerveceros artesanales, así como su capacidad de producción de AB.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 La cerveza

Las bebidas se toman para calmar la sed o por placer, proporcionan agua al cuerpo, refrescan y alimentan. La cerveza es una bebida alcohólica muy antigua, a la fecha los primeros vestigios datan de hace 13,000 años en Israel, pertenecientes al pueblo natufiano de cazadores-recolectores del este del Mediterráneo (Liu, Wang, Rosenberg, Zhao, Lengyel & Nadel, 2018). A través de su historia ha constituido un importante consumo social y una excelente fuente de calorías que, desde sus orígenes complementaba muchas dietas generalmente pobres (Suárez, 2013).

La palabra “cerveza” tiene muchos posibles orígenes, lo más probable es que derive de la palabra inglesa *bere* o de la palabra inglesa anterior *bēor*, aunque también la antigua palabra del alto alemán *bior* destaca (Mosher, Trantham, 2017).

La gran capacidad y potencialidad de las cerveceras de España han colocado a este país en el cuarto lugar de producción de Europa en el año 2018 y México se sitúa en el cuarto lugar a nivel mundial como productor, por lo que tal sector económico representa una actividad creciente y prometedora para ambos países.

### 1.1.1 La cerveza artesanal

El Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre de España, por el que se aprueba la norma de calidad de cerveza y de las bebidas de malta, define como cerveza al alimento resultante de la fermentación, mediante levaduras seleccionadas, de un mosto cervecero elaborado a partir de materias primas naturales (Boletín Oficial Del Estado, 2016). La cerveza artesanal se diferencia de la producción de la cerveza a escala industrial por su fabricación, ya que la primera no contempla filtración ni pasteurización, quedando levaduras viables y proteínas no inactivadas al no pasteurizarse, además, mantiene los aromas y sabores del producto recién terminado.

En el 2017 se estimó que existían alrededor de 10,000 fábricas de cervezas artesanales alrededor del mundo y cerca del 86% se localizan en los Estados Unidos y Europa. En el 2015 la lista con mayor número de fábricas artesanales en América Latina era encabezada por Brasil, México y Argentina (González, 2017). La obtención de estadísticas globales precisas que reflejen el mercado actual se vuelve complejo debido a la ausencia de un criterio unificado relacionado con el concepto de cerveza

artesanal.

El desarrollo de la actividad artesanal está transformando el panorama cervecero, donde la gran popularidad y transversalidad ha provocado tanto en España como en México, un creciente interés por esta bebida y con ello la oferta de cervezas, por sus aromas y sabores (Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2018). El abanico de posibilidades que ofrecen las cervezas artesanales se ha hecho tan atractivo, que muchas grandes corporaciones cerveceras incluyen estilos de cervezas en sus portafolios.

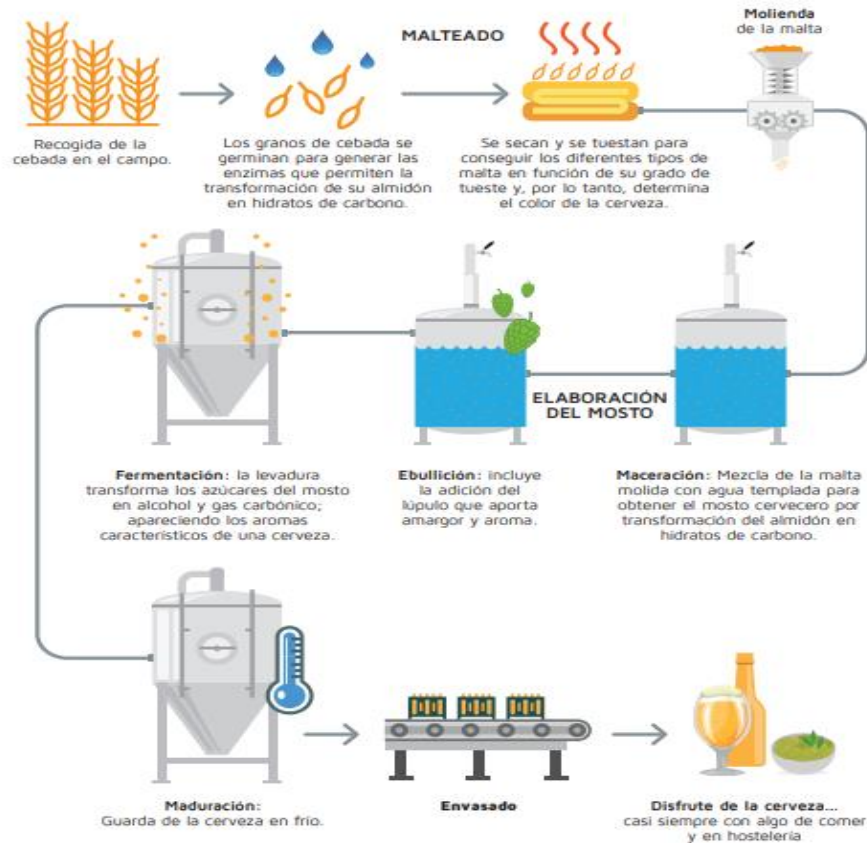
Tener y cumplir con estándares de calidad que permitan situar a la cerveza como una bebida competitiva a nivel internacional, principalmente para productores medianos y pequeños, y que garanticen su inocuidad, evitando el deterioro o pérdida de su estabilidad física y sensorial ocasionada en la mayoría de los casos por la presencia de microorganismos indeseables, traería consigo una cultura de prevención evitando pérdidas económicas ostentosas e inclusive riesgos a la salud del consumidor. Por ello, la investigación sobre los agentes microbianos implicados en el deterioro de la cerveza juega un papel crucial en la toma de decisiones y en las medidas preventivas a considerar en la elaboración de los planes de inocuidad alimentaria, en cumplimiento de las normativas correspondientes.

### **1.1.2 Proceso de elaboración de la cerveza**

La fabricación de cerveza se ha ido desarrollando a lo largo de varios miles de años, su proceso aparentemente complejo, se puede englobar en cuatro etapas: obtención de azúcares a partir de granos, cocción del mosto, fermentación y carbonatación (González, 2017). El cuidado de cada una de estas etapas es imprescindible para poder obtener un verdadero producto de calidad.

Las materias primas esenciales para la elaboración de la cerveza son: cebada malteada, agua, levadura y lúpulo. Como tal se puede decir que el proceso de fermentación de la cerveza no ha cambiado en esencia en los últimos siglos, lo que ha evolucionado es la forma en la que se siguen los procesos para obtener productos y variedades de la máxima calidad y seguridad (Colignon & Roldán, 2018).

Cabe mencionar que el malteado es un procedimiento que pocas cervecerías industriales realizan y son muy escasas las artesanales que lo llevan a cabo. La producción de cerveza comprende de una forma esquemática los pasos que se muestran en la Figura 1.



**Figura 1.** Proceso de elaboración de cerveza.

**Fuente:** Colignon & Roldán (2018)

### 1.1.3 Características físico-químicas de la cerveza

Los parámetros físico-químicos usados comúnmente para describir una cerveza y que pueden ser medidos convenientemente en la tarea de asegurar la calidad de la bebida, son:

- **Color**

El color de las cervezas se debe a varios compuestos: melanoidinas, productos de caramelización y pirólisis, polifenoles oxidados, riboflavina, carotenoides, antocianinas, clorofilas y sus productos de oxidación. De ellos la fuente primaria de color son las melanoidinas, producto de la reacción de Maillard, donde los grupos amino básicos de las proteínas, péptidos y aminoácidos reaccionan con

los grupos carbonilo de los azúcares y se condensan, por lo que la reacción ocurre entre el grupo amino y el grupo del azúcar (Cárdenas, 2003). Estos compuestos poseen un espectro de color que va desde al amarillo al ámbar.

El color se evalúa de acuerdo con dos escalas: la SRM (Método de Referencia Estándar) utilizada principalmente en los Estados Unidos y la EBC (Convención Europea de Cervecería) en el resto del mundo. Este parámetro puede ser indicador del tiempo útil de vida de la bebida.

### ● Alcohol

El alcohol se forma durante la etapa de fermentación del mosto (proceso anaerobio), mediante el cual la levadura convierte la glucosa en etanol y dióxido de carbono a través de la vía glucolítica. La medida estándar de alcohol en cerveza es ABV (alcohol por volumen) y corresponde al contenido de alcohol etílico, expresado en porcentaje. Este valor tiene un rango entre 0.5 – 14 % en una cerveza estándar. Este parámetro influye en la estabilidad microbiológica de la cerveza, por ello, cuando el contenido de alcohol es bajo y en cervezas sin alcohol la susceptibilidad ante contaminaciones microbianas aumenta. Así mismo, un alto contenido de alcohol influye en la estabilidad de la espuma, pues la presencia de etanol aumenta la viscosidad del agua y reduce el drenaje líquido de la espuma (Spedding, 2016)

Otros alcoholes producto de la fermentación que se forman en menor proporción respecto al etanol contribuyen de forma importante al perfume y aroma de la cerveza, tales como: n-propanol, butanoles, alcoholes amílicos y feniletanol (Rodríguez & Muñoz, 2000).

### ● pH

Un factor importante en la fermentación es el pH, debido al control que ejerce frente a una contaminación bacteriana, así como al crecimiento de levaduras, la velocidad de fermentación y la producción de alcohol.

El pH es una medida de la actividad de los protones en sistemas acuosos y se obtiene a través de la relación de la concentración de ácidos débiles no disociados en equilibrio con sus bases conjugadas. El valor del pH de la cerveza está influenciado por el contenido de ácidos orgánicos débiles presentes en la materia prima, que se utiliza para su elaboración, como péptidos, aminoácidos, fosfatos de sodio o potasio derivados de la malta o el ácido carbónico presente en el agua usado en la elaboración (Rodríguez & Muñoz, 2000).

La variación del pH durante el proceso de fermentación se debe a la transformación de los aminoácidos por pérdida de nitrógeno, pasando a ácidos, originando una disminución del pH, igualmente influye a tal fenómeno la generación de ácidos orgánicos como los ácidos láctico, propiónico y pirúvico (Suárez, 2013).

Los valores característicos de pH en la cerveza se encuentran en un rango de 3.8 - 4.7, proporcionando con ello estabilidad microbiológica. De modo que, si el valor del pH fuera relativamente alto, la estabilidad correría riesgo haciéndolo más susceptible a contaminaciones microbianas (Suzuki, 2011)

### ● **Turbidez**

La mayoría de los problemas de turbidez posteriores al envasado en la cerveza se debe a la formación de complejos proteína-polifenoles que llevan a la formación de partículas coloidales. Los niveles de hordeína, proteína existente en la cebada al igual que la albúmina, son los que influyen en mayor medida a la formación de la turbidez (Suárez, 2013).

La pérdida de brillo, el descenso de la transparencia, el grado de enturbiamiento, incluso la precipitación y sedimentación, son las sucesivas manifestaciones visuales de la falta de estabilidad de la cerveza, donde las causas pueden clasificarse en tres: coloidal, química y biológica (Cárdenas, 2003). En los tres casos el aspecto de la bebida se ve afectado y con ello la aceptación por el consumidor. En cuanto a la turbidez por causas biológicas es un indicativo de la posible presencia de microorganismos deteriorantes.

### ● **Amargor**

El amargor se define como la medida en unidades internacionales de amargor (IBU o BU) que corresponden a partes por millón ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de ácido  $\alpha$ -isomerizado y es una de las características organolépticas más apreciadas en la cerveza por parte de los consumidores, otorgado principalmente por los  $\alpha$ -ácidos presentes en el lúpulo, específicamente del cono de la planta femenina. El amargor, se percibe en la parte posterior de la lengua y en el paladar, y es la contraparte del dulzor conferido por la malta (Suárez, 2013).

Las resinas del lúpulo pueden dividirse en blandas y duras. Dentro de las blandas se encuentran los  $\alpha$ -ácidos: humulona, cohumulona y adhumulona. Durante la ebullición al que se somete el mosto y se agrega el lúpulo, los  $\alpha$ -ácidos sufren un cambio estructural, llamado isomerización, originando

compuestos solubles amargos a los que se les denominan  $\alpha$ -isoácidos (iso-humulona, isocohumulona e iso-adhumulona) (Cárdenas, 2003). Los  $\beta$ -ácidos que son las resinas blandas, igualmente se isomerizan; pero debido a que la solubilidad de los  $\beta$ -iso-ácidos en el mosto es muy baja, la contribución al amargor es casi despreciable (Rodríguez, 2003).

Estudios indican que los  $\alpha$ -isoácidos (17 – 100 ppm en la cerveza), pueden otorgar propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram positivas (Suzuki, 2011), esto se debe a que los compuestos de lúpulo son ácidos débiles, que pueden atravesar la membrana citoplasmática en forma no disociada, actuando como ionóforos.

#### ● **Extracto aparente**

El extracto aparente es la fracción de sustancias disueltas en la cerveza, considerando el alcohol presente. Se suele utilizar para el control del mosto durante su fermentación (Gómez, 2014). Este valor se obtiene a partir de la relación porcentual entre la gravedad original del mosto y la final del proceso de fermentación, este último valor indica la cantidad de azúcares no fermentables por la levadura en el producto final. Los valores pueden ser expresados en grados Plato ( $^{\circ}$ P) o como densidad aparente (Gómez, 2014).

Cuando una cerveza presenta un valor alto de azúcar residual después de la fermentación, tendrá un valor de atenuación o extracto aparente más bajo (Mosher & Trantham, 2015). La presencia de azúcar residual en la cerveza podría favorecer la alteración de la estabilidad microbiológica, ya que podrían ser metabolizado por microorganismos que provocan deterioro de la cerveza.

Este parámetro puede caracterizar a diversos estilos de cerveza, y se relaciona con la cantidad de alcohol que puede presentar la bebida; ya que cuanto más alto sea el valor de extracto aparente, mayor será la cantidad de alcohol.

#### **1.1.4 Legislación actual**

A la fecha, desde el punto de vista de la calidad alimentaria, la elaboración y comercialización de cervezas y bebidas de malta en España, está regulada por la normativa de la Unión Europea en materia alimentaria por el *Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta*, (BOE 17 de diciembre de 2016). Las características de la cerveza que se puntualizan en este decreto son: deberá presentar un pH inferior a 5.5 y un amargor superior a  $5 \text{ mg L}^{-1}$  ( $1 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\alpha$ -isoácidos en cervezas equivalente a una unidad

de amargor IBU) (Boletín Oficial Del Estado, 2016). Es importante mencionar que no se establecen criterios microbiológicos, ni metodologías para la detección de microorganismos y de sus posibles productos resultado de su metabolismo que puedan provocar efectos tóxicos en el consumidor (por ej. aminos biógenas). La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), tampoco presenta indicaciones o normativas con respecto al área de seguridad microbiológica de la bebida (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2020). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha indicado que la cerveza puede ser un producto que contenga altos niveles de AB (EFSA Panel on Biological Hazard, 2011).

En México la regulación de esta bebida se encuentra en la *Norma Oficial Mexicana NOM-199-SCFI-2017, Bebidas alcohólicas-Denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba*. Esta norma contiene la denominación de las bebidas alcohólicas y establece las especificaciones físico-químicas, y los métodos de prueba que deben aplicarse para determinar su cumplimiento. En este documento se establecen las características físico-químicas del producto final como: contenido de alcohol a 20°C desde 2 a 20 % ABV, acidez total (como ácido láctico) máxima de 10 g L<sup>-1</sup>, pH desde 2.5 a 5.0, plomo con un máximo de 0.5 mg L<sup>-1</sup> y arsénico con un máximo de 0.5 mg L<sup>-1</sup>.

En ambas legislaciones no se mencionan explícitamente los criterios microbiológicos, por lo que cada cervecería artesanal se rige por sus propios estándares lo que hace que este producto, probablemente por tratarse de un sector relativamente joven, esté amparado por una normativa más laxa en comparación con otras bebidas fermentadas. Una regulación en el ámbito microbiológico permitiría aún más la apertura de mercados, favoreciendo la competitividad a nivel internacional y ofrecería una mayor seguridad alimentaria. Sin embargo, para lograr una regulación se necesita de un mayor impulso en las investigaciones relacionadas a la cerveza artesanal, que incluyan a los posibles microorganismos deteriorantes y los posibles efectos en la salud del consumidor en caso de contaminaciones microbianas.

## **1.2 Principales microorganismos contaminantes de la cerveza**

La cerveza es reconocida desde hace cientos de años como una bebida segura, la razón de ello es que esta bebida es un medio con escasos nutrientes y muy hostil, para muchos microorganismos



debido a sus características físico-químicas como: rangos de concentración de etanol de 0.5 hasta 14 %, pH de 3.8 a 4.7, altas concentraciones de dióxido de carbono (0.5 % v/v), bajo contenido de oxígeno (<0.1 ppm), además de los compuestos ácidos del lúpulo (aproximadamente 17 - 100 ppm de  $\alpha$ -isoácidos), siendo estos últimos tóxicos especialmente para bacterias Gram positivas. Además, las concentraciones de sustancias nutritivas como carbohidratos y aminoácidos son escasas, ya que la mayoría de estos nutrientes han sido consumidos por la levadura durante la fermentación (Sakamoto & Konings, 2003). La inestabilidad microbiológica de la cerveza es frecuente que sea ocasionada por bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus*, *Megasphaera* y *Leuconostoc*, esta última con menor frecuencia (Sakamoto & Konings, 2003).

Los géneros deteriorantes de la cerveza *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* pertenecen a las BAL y *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Zymophilus* y *Selenomonas* conforman el grupo de bacterias anaerobias estrictas. El número de especies que se pueden encontrar en la cerveza es relativamente pequeño, estudios previos documentan que el 70% de las contaminaciones son ocasionadas por BAL (Garofalo *et al.*, 2015)

Estos microorganismos causan efectos negativos en la cerveza como: incremento de turbidez, producción excesiva de ácido láctico, incremento del diacetilo, entre otros, llegando a ocasionar que sea imbebible (Sakamoto & Konings, 2003), así como considerables pérdidas económicas.

### **1.2.1 Bacterias ácido-lácticas**

El término de bacterias ácido-lácticas (BAL) engloba a un grupo heterogéneo de microorganismos cuya característica definitoria es la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de carbohidratos. Pertenecen al grupo de bacterias Gram-positivas y son ácido tolerantes (Dridier, 2016). Las BAL están ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido aisladas de diversos alimentos, tierra, plantas verdes, así como también del tracto digestivo y vagina de mamíferos, entre otras fuentes (Ramírez, Rosas, Velázquez, Ulloa & Arce, 2011). Estas bacterias son cocos o bacilos, no forman esporas, son inmóviles, anaeróbicos facultativos, microaerofílicos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y bencidina negativa, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito (Dridier, 2016).

La clasificación de las BAL se basa principalmente en la morfología, el modo de fermentación de la glucosa, crecimiento a diferentes temperaturas, configuración del ácido láctico producido,

capacidad de crecimiento a altas concentraciones de sal y la tolerancia ácida o alcalina. Los géneros básicos que comprende son: *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* principalmente (Drider, 2016).

### 1.2.1.1 *Lactobacillus* spp

Los *Lactobacillus* son bacilos no esporulados y raramente móviles. Las células tienen forma de bastón regular de 0.5 a 1.2 x 1 a 10 µm. Usualmente son bastones alargados pero algunas veces son casi cocoides, comúnmente se encuentran en cadenas cortas (Suzuki, 2011). La temperatura óptima de crecimiento es de 30 a 40 ° C; pero las BAL aisladas de ambientes cervecero comúnmente tienen temperaturas óptimas de crecimiento de 19 a 26 ° C y a un pH de 4 - 6 (Sakamoto & Konings, 2003; Suzuki, Ozaki & Yamashita, 2004; Susuki, 2011).

Solo algunas especies de *Lactobacillus* son capaces de deteriorar la cerveza, entre estas especies se encuentran *L. brevis* y *L. lindneri* consideradas las mayores bacterias contaminantes de cerveza. *L. brevis* y *L. lindneri* son heterofermentativas y a estas especies pertenecen las cepas con la mayor habilidad de alterar la cerveza (Susuki, 2011; Sakamoto & Konings, 2003). En las cervecerías otras especies que también pueden provocar deterioro son *L. paracasei* y *L. plantarum* (Susuki, 2015).



**Figura 2.** Microfotografía de microcolonias de *L. plantarum*, cultivadas a pH de 3, por microscopía de barrido electrónico.

**Fuente:** Ingham, Beerthuyzen & van Hylckama (2008)

**Tabla 1.** Características generales de especies del género *Lactobacillus* que provocan deterioro en la cerveza.

Características	Microorganismo		
	<i>L. brevis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. paracasei</i>
Tipo de fermentación	Heterofermentativa obligada	Heterofermentativa facultativa	Heterofermentativa facultativa

Formación de polisacáridos extracelulares	Si	No	No
Tolerancia al lúpulo	Alta (gen <i>horA</i> , <i>hor C</i> )	Débil (gen <i>hor A</i> )	Débil
Efectos en la cerveza	Turbidez, acidificación, no produce diacetilo	Sabor desagradable a diacetilo	Sabor desagradable a diacetilo

Fuente: Suzuki (2015); Pérez (2019)

### 1.2.1.2 *Pediococcus* spp

*Pediococcus* es un género de bacterias homofermentativas, cocos no esporulados, inmóviles, aerobio facultativo (Drider, 2016). Las células son esféricas, nunca alargadas, forman tetradas bajo condiciones favorables, algunas veces sólo se observan en pares. Su temperatura óptima de crecimiento es de 25 – 40 ° C.

De este género, *Pediococcus damnosus* es el principal agente deteriorante de la cerveza, es generalmente resistente a los componentes del lúpulo y es frecuente que se encuentre en las fermentaciones tardías. Se caracteriza por su producción de diacetilo (aroma a mantequilla), ácidos propiónico y acético, sulfuro de hidrógeno y mercaptanos. También, se ha documentado otras especies aisladas de cerveza como: *P. acidilactici*, *P. dextrinicus*, *P. halophilus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus* y *P. pentosaceus* (Sakamoto & Konings, 2003).

En particular las especies contaminantes de *Pediococcus*, se caracterizan por alta producción de diacetilo y exopolisacáridos, así como por su habilidad para crecer a temperaturas bajas, por lo que suelen contaminar cervezas lager, las cuales son fermentadas a bajas temperaturas (García, 2017)

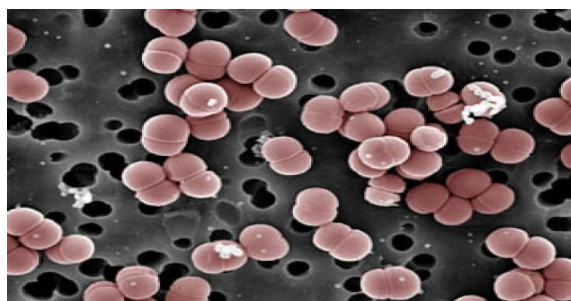


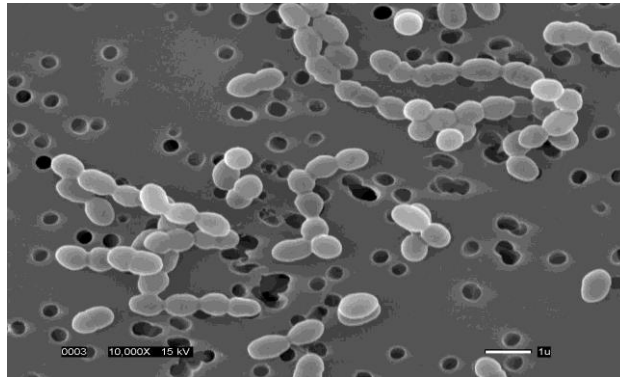
Figura 3: Estructura morfológica de *P. damnosus* por microscopía de barrido electrónico

Fuente: Sheahan (2016)

### 1.2.1.3 *Leuconostoc* spp

*Leuconostoc* spp. son microorganismos ambientales generalmente encontrados en plantas. Fenotípicamente pueden ser cocos, cocobacilos o elipsoidales, se presentan en pares o en cadenas y

son heterofermentativos a diferencia del género *Pediococcus*. Las especies que provocan deterioro en la cerveza son *L. citreum* y *L. mesenteroides*, las cuales no tienen alta resistencia al lúpulo, por lo cual el deterioro se produce en cervezas con bajo contenido de lúpulo, pH alto y contenido de alcohol bajo (Suzuki, 2015).



**Figura 4.** *L. mesenteroides* por microscopía de barrido electrónico  
**Fuente:** SCIMAT (2019)

### 1.2.2 Principales alteraciones producidas por BAL en cervezas

Las BAL son responsables frecuentemente de las alteraciones a la cerveza haciendo que sea imbebible debido a la producción de ácido láctico, diacetilo y turbidez (Menz, Andriquetto, Lombardi, Corich, Andred & Vriesekoop, 2010).

*L. brevis* en casi todos los estilos de cerveza causa espuma, sedimentación, acidificación; pero no produce diacetilo. En el caso de *L. lindneri*, la espuma y la sedimentación es menor comparando con *L. brevis*. Además *L. lindneri* tiene la cualidad de reducir su tamaño celular cuando crece en cerveza, esto le otorga facilidad para penetrar las membranas de filtración usadas por las industrias cerveceras para remover los posibles microorganismos presentes (Suzuki, 2011).

En el caso de contaminaciones por *P. damnosus* es característico la formación de ácido, olor a mantequilla debido al diacetilo producido. Algunas cepas llegan a producir exopolisacáridos haciendo la cerveza espumosa, gelatinosa y con textura aceitosa. Otra propiedad que posee es que se puede adherir a las levaduras de la cerveza y algunas veces las induce a la sedimentación prematura, retardando el proceso de fermentación (Suzuki, 2011).

En cuanto a lo que puede provocar *Leuconostoc*, aún no se tiene del todo claro, sin embargo, Suzuki y colaboradores en el 2008 reportaron la habilidad deteriorante de la bacteria causando espuma y

textura gelatinosa y aceitosa. Existen investigaciones que indican que *L. mesenteroides* puede ser crítico, ya sea por el potencial de deterioro a la cerveza o debido al potencial de formación de biopelículas en la cervecería (Riedl, Goderbauer, Brandl, Jacob & Hutzler, 2017). Otro estudio realizado en una cervecería mexicana por Giles-Gómez y colaboradores en el 2016, indicaron que puede proporcionar propiedades probióticas a la cerveza.

### 1.2.3 Otros microorganismos contaminantes de la cerveza

En la actualidad se considera que las contaminaciones de cerveza producidas por bacterias Gram negativas son insignificantes en comparación a las que se producen por bacterias Gram positivas. A pesar de esto, existen especies como *Micrococcus* que puede crecer en cervezas con bajo nivel de etanol y BU, y a pH alrededor de 4.5 (Sakamoto & Konings, 2003).

*Pectinatus* y *Megasphaera* son bacterias Gram negativas anaerobias estrictas que pueden contaminar las cervezas envasadas. *Pectinatus* no solo provoca sedimentos pesados, espuma y pequeños coágulos, también exhibe un olor a huevo podrido y sabor extremadamente desagradable, asociado a la producción de sulfuro de hidrógeno (Suzuki, 2011). *Megasphaera* genera una ligera espuma en la cerveza, pero sus severos olores desagradables están asociados a la producción de ácido butírico, ácido caproico y sulfuro de hidrógeno, haciéndolo imbebible. *Megasphaera* tolera en menor medida al etanol, por lo que es común solo encontrarla en cervezas con bajo alcohol (Suzuki, 2011).

Otros microorganismos que pueden causar problemas en la calidad de la cerveza son las levaduras que no se hayan introducido intencionalmente en la cerveza. Aunque se producen cervezas de fermentación espontánea realizada mediante cepas salvajes de levadura (Michel, Meier, Jacob, Methner, Wagner & Hutzler, 2016), algunas levaduras salvajes producen deterioro a nivel sensorial por la generación de compuestos fenólicos volátiles similares al humo o sudor, además cambios en la turbidez y carbonatación, así como una disminución del cuerpo de la cerveza. Las especies del género *Dekkera* (anamorfo del género *Brettanomyces*) pueden ser agentes perjudiciales cuando se ha efectuado procesos erróneos de embotellado y se conserva oxígeno que le permite crecer. Otras especies de levaduras alterantes pertenecen a los géneros, *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Torulaspota*, *Williopsis* y especies no cerveceras del género *Saccharomyces* (Hill & Priest, 2018).

### **1.3 Crecimiento de BAL en cerveza**

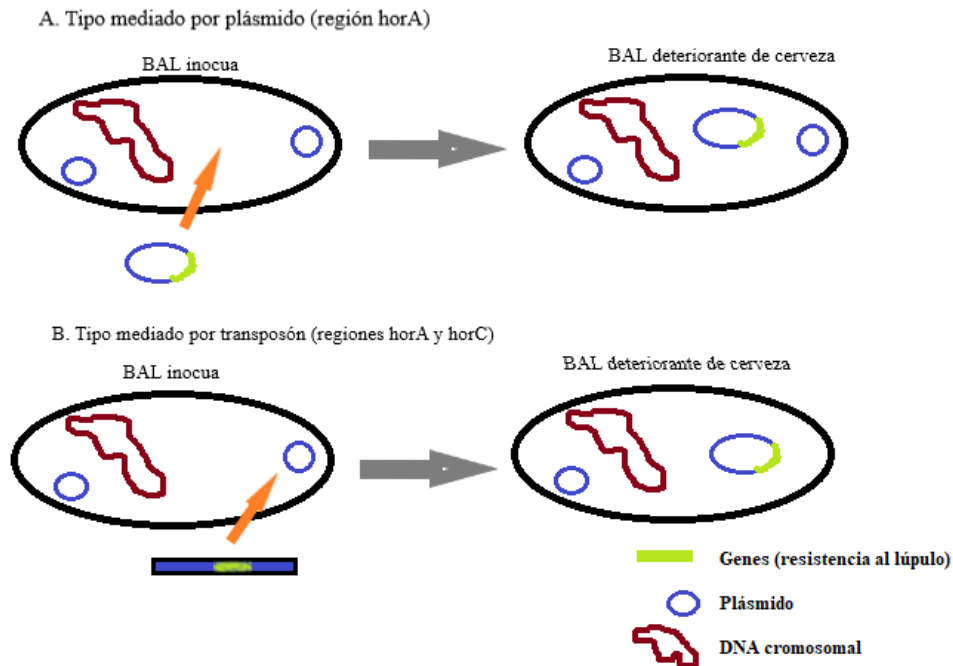
Solo algunas bacterias pueden crecer bajo condiciones inhóspitas, como lo es la cerveza. Sin embargo, aquellas que logran su supervivencia bajo estas condiciones son de gran interés para la industria cervecera. Las BAL juegan un rol importante en la investigación, en donde la búsqueda de las propiedades que les permiten su crecimiento en la cerveza las vuelve aún más interesantes.

#### **1.3.1 Ocurrencia de BAL en cerveza**

Las BAL son responsables de aproximadamente del 70% de los incidentes deteriorantes de la cerveza (Sakamoto & Konings, 2003; Ruiz, Celada, Seseña & Palop, 2018), causando efectos negativos en la calidad de la cerveza. En Europa, en el periodo de 1980-2002, *Lactobacillus* y *Pediococcus* causaron aproximadamente entre el 60 a 90% de los incidentes microbiológicos, siendo *L. brevis* la especie bacteriana más frecuente. En cuanto a *Leuconostoc*, la frecuencia es mucho menor en comparación con los dos géneros anteriores, alrededor del 1% según los resultados de Suzuki y colaboradores en el 2008; sin embargo, su presencia en la materia prima como la malta, genera un punto de alerta (Suzuki, 2011).

#### **1.3.2 Genes de resistencia al lúpulo presentes en BAL**

Las BAL contaminantes de cerveza tienen algunas características en común, como la resistencia a los  $\alpha$ -isoácidos del lúpulo, la cual está dada por elementos genéticos como los transportadores multidrogas *horA*, *horC*, y los transportadores de cationes *hitA* y ORF5, los cuales se encuentran comúnmente en plásmidos (Sakamoto & Konings, 2003; Haakensen, Schubert & Ziola, 2008; Susuki *et al.*, 2006; Suzuki, 2011) Anteriormente se creía que la resistencia al lúpulo era una característica estable codificada en el ADN cromosomal; sin embargo, en la actualidad se cree que pueda deberse a una combinación de genes cromosomales y de plásmidos que se pueden llegar a adquirir a través de una transferencia horizontal de genes, como se muestra en la Figura 5 (Susuki *et al.*, 2006).



**Figura 5.** Transferencia hipotética horizontal de *horA* y *horC*. Se han postulado dos modos de transferencia horizontal de genes que confieren resistencia al lúpulo. El tipo A corresponde al que es mediado por plásmido, mientras que el tipo B es mediado por transposones, sobre la bases de las identidades de secuencia de nucleótidos y el análisis de ORF de las regiones de ADN que contienen *horA* y *horC* identificadas en *L.brevis*, *L.lindneri*, *L.paracollinoides* y *P.damnosus*.  
**Fuente:** Suzuki *et al.* (2006).

### 1.3.2.1 Principales genes de resistencia

Los  $\alpha$ -isoácidos del lúpulo que se producen durante el calentamiento del mosto, poseen propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram positivas (Suzuki *et al.*, 2006). Estos ácidos del lúpulo son ácidos débiles que pueden atravesar la membrana citoplasmática y actuar como ionóforos causando la disipación del gradiente de pH a través de la membrana citoplasmática, reduciendo la fuerza motriz de protones. En consecuencia, el pH intracelular se disipa interfiriendo con las reacciones enzimáticas esenciales, la fuerza motriz de protones dependiente de nutrientes (Behr & Vogel, 2009), cambios en la permeabilidad en la pared celular, inhibición de la actividad transportadora de azúcares y aminoácidos, subsecuentemente ocurre la inhibición de la respiración y de la síntesis de proteínas (Sakamoto & Konings, 2003).

Debido al mayor pH intracelular, los ácidos del lúpulo se disocian internamente disipando así el gradiente de pH transmembrana, que es un componente importante de la fuerza motriz de protones para generar energía (ATP), interviniendo así en el transporte de nutrientes (Simpson, 1993). Como resultado de ello está la acción protonofórica de los ácidos amargos del lúpulo, ocasionando que la viabilidad de las bacterias expuestas disminuya. En respuesta a ello se ha demostrado que se

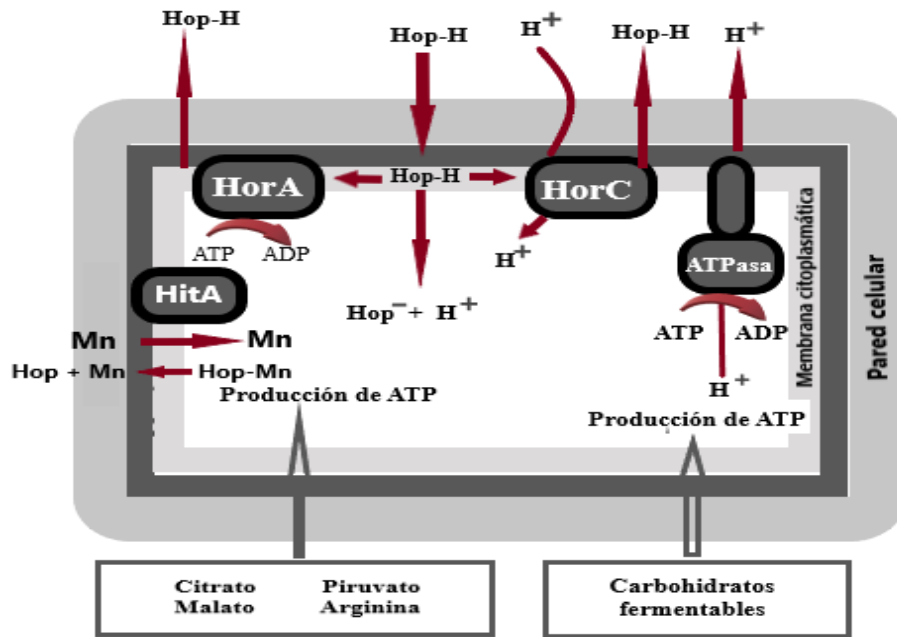
incrementa la actividad de translocación de protón ATPasa, con la finalidad de contrarrestar los efectos ionofóricos de los compuestos del lúpulo y mantener el pH de gradiente transmembranal.

El gen *horA* pertenece a la familia de transportadores multidrogas de casete de unión de ATP y se ha localizado en el plásmido llamado PRH45 de 15.1 kpb de una cepa de *L. brevis* (Sakamoto & Konings, 2003).

Se ha demostrado que la proteína HorA pertenece a una familia de transportadores multidrogas de casete de unión a ATP (ABC), mientras que la proteína HorC es dependiente de la fuerza motriz del protón (PMF) para excluir los ácidos amargos del lúpulo de las células bacterianas. Presumiblemente las actividades de HorA y HorC provocan una entrada reducida de los ácidos amargos del lúpulo no disociados y permeables a la membrana citoplasmática y, por lo tanto, limitan el efecto protonofórico antibacteriano de los compuestos derivados del lúpulo, como se muestra en la Figura 6 (Suzuki, 2011).

Para la adquisición de resistencia al lúpulo, además del uso de proteínas transportadoras, se ha observado que algunas BAL en presencia del lúpulo, aumentan su función de ATPasa para la translocación de protones, lo que contrarresta el efecto de los ácidos del lúpulo (Sakamoto & Konings, 2011). También se ha encontrado otros genes cromosomales que podrían estar implicados en la capacidad de crecer en cerveza, como el gen *hitA*. Suzuki, K. (2011) ha propuesto que funciona como un mediador de la resistencia al lúpulo, ya que juega un rol en captar cationes divalentes como el  $Mn^{+2}$ , mientras los compuestos ácidos del lúpulo reducen los cationes divalentes intracelulares, como se observa en la Figura 6. Sabemos que esta acción de contrarrestar el flujo de cationes divalentes es importante en la supervivencia de la bacteria, ya que muchas proteínas son dependientes de  $Mn^{+2}$ , las cuales están involucradas en la generación de energía y homeostasis redox.





**Figura 6.** Mecanismos propuestos de resistencia de BAL a los compuestos del lúpulo. HorA y HorC son transportadores de múltiples medicamentos que son impulsados por ATP y PMF respectivamente. Los compuestos de lúpulo no disociados (Hop-H) se intercalan en la membrana citoplasmática y son transportados por los transportadores de múltiples fármacos. Algunas porciones de Hop-H escapan de las actividades de bombeo de los transportadores y entran al citoplasma. En el citoplasma, Hop-H se asocia a la forma aniónica (Hop-) y  $H^+$  debido al mayor pH interno.  $H^+$  también ingresa al citoplasma en antiport con Hop-H por las acciones de HorC. Para evitar la acidificación del citoplasma y minimizar el gradiente de pH transmembrana, la ATPasa translocante de protones excreta  $H^+$  a través de la membrana. Los cursos de energía para estos mecanismos de resistencia del lúpulo se suministran desde los metabolismos del citrato, piruvato, malato y arginina. En algunos casos, los carbohidratos fermentables, como la maltotriosa, pueden utilizarse para producir ATP.

Fuente: Susuki *et al.*, (2006)

### 1.3.2.2 Otros genes relacionados

Otros genes que se han propuesto que confieren habilidad deteriorante a las BAL son *horB*, *bsrA* y *bsrB*. El gen *horB* es un regulador transcripcional, el cual se ha asociado con la regulación de HorC (Bergsveinson, Baecker, Pittet, & Ziola. 2015), por lo que también está implicado en exportar  $\alpha$ -isoácidos de la célula. Ambos genes *bsrA* y *bsrB*, son casete de unión a ATP multidroga de tipo primario, éstos se han visto relacionados con el deterioro de cervezas, según un estudio publicado por Haakensen (2009), donde estadísticamente estuvieron altamente correlacionados con la resistencia al lúpulo para el género *Pediococcus* (Haakensen, Vickers & Ziola, 2009)

De estos genes no se tiene gran información, pues se ha visto que los genes *horA*, *horC* y *hitA* tienen mayor correlación con la resistencia al lúpulo en la BAL.

#### 1.4 Producción de aminas biógenas en cerveza

Las aminas biógenas son compuestos orgánicos de bajo peso molecular producidos mayoritariamente por la descarboxilación de ciertos aminoácidos por acción bacteriana. Las principales bacterias productoras de AB en alimentos fermentados son las BAL (Barbieri, Montanari, Gardini & Tabanelli, 2019), quienes, a través de enzimas descarboxilan los aminoácidos precursores produciendo la AB correspondiente. Se ha descrito que estas enzimas aminoácido descarboxilasas son inducibles y se producen como respuesta adaptativa a la presencia de los aminoácidos precursores en el medio (Bearson, Bearson & Foster, 1997).

La síntesis y acumulación de AB en los alimentos requiere de la presencia de aminoácidos precursores, de bacterias con la aminoacil descarboxilasa apropiada y de las condiciones ambientales que favorezcan la acción enzimática y el crecimiento bacteriano. La combinación de todos estos factores influye en las variedades y cantidades de AB presentes en productos alimenticios (Río, Díaz, Pérez, Redruello, Linares, Ladero & Álvarez, 2018). En la Tabla 2 se muestran algunos de los microorganismos que se encuentran mayormente implicados en la producción de AB en bebidas fermentadas.

**Tabla 2.** Microorganismos productores de AB en bebidas fermentadas

Amina biógena	Microorganismo productor
Histamina	<i>Oenococcus oeni</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Pediococcus parvulus</i>
Tiramina	<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
Putrescina	<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Oenococcus oeni</i> , <i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus zeae</i> .

**Fuente:** Río *et al.*, (2018)

Los factores químicos como el pH, la concentración de sal y la temperatura pueden afectar al microorganismo productor de AB, tanto en su crecimiento como en la actividad descarboxilasa (Linares, del Río, Ladero, Martínez, Fernández, Martín & Álvarez, 2012). Se ha llegado a plantear una teoría para el caso de las BAL, indicando la relación entre el descenso del pH y la producción de AB, pues estas últimas contrarrestan el estrés ácido de algunos ambientes (Bearson *et al.*, 1997), sustentando que el bajo pH es un factor crucial para la actividad de algunas aminoácido descarboxilasas (Linares *et al.*, 2012), siendo el pH óptimo entre 4.0 - 5.5 (Karovičová & Kohajdová, 2005). Respecto a la temperatura, en estudios previos se evidencia que, a temperaturas de 5 °C o menores, decrece la acumulación de AB como histamina, tiramina, putrescina y cadaverina,

atribuyéndose a la reducción de la actividad enzimática, así como en la reducción de la expresión génica implicada (Calles, Eriksen, Anderson, Rattray, Johansen, Fernández & Álvarez, 2010).

#### **1.4.1 Presencia de aminos biógenas en cerveza**

En estudios previos, se han identificado alrededor de seis AB presentes en botellas de cerveza listas para su comercialización o en el punto de venta (Kalač, Šavel, Křížek, Pelikánová & Prokopová, 2002). Con base en lo mencionado por Poveda (2019) el origen de AB en la cerveza proviene de dos fuentes: por un lado, se pueden producir por la acción descarboxilasa de los microorganismos, y la otra es que las AB pueden encontrarse naturalmente en las materias primas, principalmente en la malta.

En la materia prima como la malta y el mosto se pueden encontrar AB como agmatina, putrescina, espermidina y espermina, siendo la malta la principal fuente de AB (Kalac, & Krizek, 2003). Mientras que en el proceso de fermentación se han localizado tiramina, histamina, putrescina y cadaverina (Loret, Deloyer & Dandrifosse, 2005; Poveda, 2019).

También se ha reportado que los contenidos de AB en cervezas sin contaminación conocida están más relacionados con las materias primas y la cervecería que con el metabolismo de las BAL (Poveda, 2019)

#### **1.4.2. Genes asociados a la producción de aminos biógenas**

A través de métodos moleculares rápidos y reproducibles se logra detectar genes implicados en la producción de AB en bacterias productoras. Estos métodos moleculares se basan en el uso de oligonucleótidos específicos para la detección de los genes bacterianos que codifican enzimas amino descarboxilasas, como: histidina descarboxilasa (*hdc*), tirosina descarboxilasa (*tdc*) y ornitina descarboxilasa (*odc*). Por lo que a través de ellos se podría detectar si una bacteria tiene la capacidad genética de producir histidina, tiramina y putrescina, respectivamente (Elsanhoty & Ramadan, 2016).

#### **1.4.3 Toxicidad causada por aminos biógenas y límites legales**

Dado que las AB pueden actuar como agentes vasoactivos, su presencia de altas cantidades de AB en los alimentos fermentados puede ser contraproducente para la salud, algunas de ellas se describen en la Tabla 3. Las AB más frecuentes en alimentos son histamina, tiramina, putrescina, cadaverina, triptamina, b-feniletilamina, espermina y espermidina, sin embargo, la mayoría de los casos de

intoxicación alimentaria están relacionadas con la histamina y la tiramina. Además de la propia toxicidad de la tiramina, ésta se ha relacionado con favorecer la adhesión de patógenos como *Escherichia coli* a la mucosa intestinal (Coton, Romano, Spano, Ziegler, Vetrana, Desmarais & Coton, 2010). Por otro lado, las diaminas tales como putrescina y cadaverina pueden reaccionar con nitritos dando lugar a la formación de nitrosaminas, cuyo efecto es cancerígeno (Barbieri, Montanari, Gardini & Tabanelli, 2019).

En condiciones normales si se llegara a ingerir AB a través de los alimentos, rápidamente las monoamino oxidasas (MAO) o las diamino oxidasas (DAO) de la mucosa intestinal actúan para prevenir una intoxicación. Estas enzimas se caracterizan por poseer un nucleótido derivado de la vitamina B2, como flavin-adenin-dinucleotido (FAD) o flavin-mononucleotido (FMN), conocida también como riboflavina-5-monofosfato, al momento que catalizan la desaminación oxidativa de las aminas, lo hacen con consumo de oxígeno y agua, produciendo el aldehído correspondiente, amoniaco y peróxido de hidrógeno (Barbieri *et al.*, 2019). Sin embargo, cuando estas enzimas no son funcionales, ya sea por problemas genéticos o por la presencia de inhibidores como el alcohol presente en la cerveza o determinados fármacos, es difícil para el organismo reestablecer los niveles de aminas normales. Por lo que la detoxificación depende de la eficacia de los sistemas, variando de un individuo a otro, además esto puede estar sujeto a la presencia de otras AB, pues llegan a tener efectos sinérgicos (Lucas, Claisse & Lovaud, 2008).

**Tabla 3.** Efectos fisiológicos y toxicológicos de las AB.

Amina biógena	Aminoácido precursor	Efectos fisiológicos	Efectos toxicológicos
Histamina	Histidina	Neurotransmisor, interviene en la secreción ácido-gástrica, crecimiento y diferenciación celular. Regula el ritmo cardíaco y temperatura del cuerpo. Está implicado en la ingesta de alimentos, aprendizaje y memoria, respuesta inmune, reacciones alérgicas.	Dolores de cabeza, sudoración, secreción nasal, enrojecimiento facial, erupciones cutáneas con picazón, mareos, edema (en párpados), urticaria, dificultad para tragar y respiratoria, diarrea, broncoespasmos, aumento del gasto cardíaco, taquicardia, trastornos de la presión arterial.
Tiramina	Tirosina	Neurotransmisor, vasoconstrictor periférica, produce incremento del gasto cardíaco, aumenta la glucosa en la sangre y liberación de la adrenalina.	Dolores de cabeza, migraña, trastornos neurológicos, náuseas, vómitos, trastornos respiratorios, hipertensión.
Putrescina	Ornitina	Regulación en la expresión de genes, maduración intestinal en la etapa neonatal, crecimiento y diferenciación celular.	Aumento del gasto cardíaco, taquicardia, hipotensión, efectos cancerígenos.

**Fuente:** Linares *et al.*, (2012); Álvarez & Moreno-Arribas (2014)

No hay una legislación específica respecto a la presencia de AB en los alimentos, a excepción de los productos pesqueros publicada por la comisión del Codex Alimentarius, donde se establece un nivel máximo aceptable de histamina. Sin embargo, la EFSA realizó una evaluación cuantitativa de los riesgos sobre las AB en alimentos fermentados en la Unión Europea, indicando concentraciones que podrían inducir efectos adversos en la salud de los consumidores.

Los datos toxicológicos proporcionados por la EFSA se realizaron tanto a personas sanas como a individuos sensibles. La tiramina junto con la histamina son consideradas las AB más tóxicas y particularmente relevantes para la seguridad alimentaria. Una ingesta de tiramina en individuos sensibles de 6 mg/kg causa una crisis leve, de 0 - 25 mg/kg se presenta dolor de cabeza intenso con hemorragia intracraneal. En individuos que no presentan defectos en las enzimas de detoxificación puede ser bien tolerada un consumo de 50 – 150 mg/kg de tiramina. Los resultados de histamina en personas sanas expuestas a un nivel de 25 - 50 mg/kg han llegado a producir efectos adversos para la salud. Países como Suiza, Austria, Alemania, Holanda, Bélgica y Francia han establecido recomendaciones en el contenido de histamina en bebidas fermentadas, siendo en un rango aceptable entre 2 a 10 mgL<sup>-1</sup> (Moreno-Arribas & Polo, 2008)

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

Estudiar la capacidad deteriorante de bacterias ácido-lácticas (BAL) y su producción de aminos biógenos (AB) en cerveza artesana, a través de su inoculación en distintos estilos, con el fin de desarrollar un monitoreo de seguridad alimentaria y calidad de la cerveza.

### **2.2 Objetivos particulares**

- Evaluar la capacidad deteriorante de las BAL mediante la detección de los genes de resistencia al lúpulo y su crecimiento en diferentes estilos cerveceros.
- Evaluar la capacidad de producción de AB por las BAL a través de la detección de los genes relacionados y la cuantificación de su producción en cerveza artesanal.

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### 3.1 ACONDICIONAMIENTO DE BAL AL CRECIMIENTO EN CERVEZA

##### 3.1.1 Cepas de bacterias ácido-lácticas

Se usaron 11 cepas de BAL, que se muestran en la Tabla 4, de las cuales 8 provienen de la colección de microorganismos del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Alimentación (CIAL, España), las cuales previamente fueron aisladas de ambientes y productos cerveceros e identificadas por espectrofotometría de masas MALDI TOF-MS (*Matrix-Assisted-Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) Biotyper y por el método de secuenciación completa del gen 16S rRNA. Adicionalmente se utilizaron 3 cepas de la Colección Española de Cultivos (CECT).

**Tabla 4.** Cepas de BAL y su fuente de aislamiento

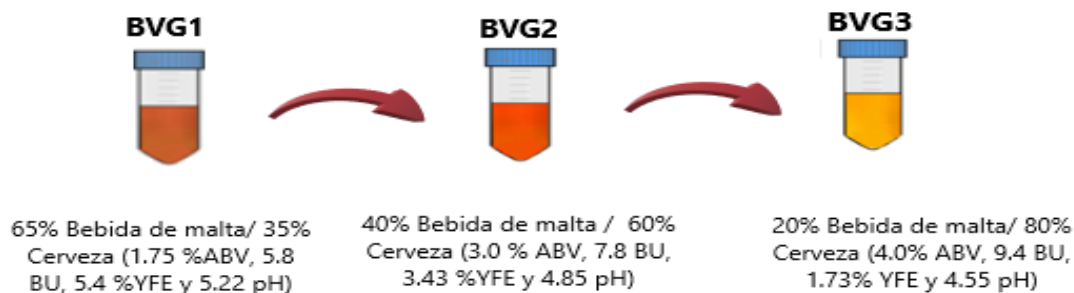
Nomenclatura	Código de identificación	Género y especie	Aislamiento
CIAL-B6	B6	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Ambiente cervecero artesanal
CIAL-BD1	D1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Cerveza 6,5 % ABV y 14 BU de una cervecera artesanal
CIAL-BF1	CL	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Arándanos rojos
CIAL-B2	B2	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	Ambiente cervecero artesanal
CIAL-B1	B1	<i>Leuconostoc citreum</i>	Ambiente cervecero artesanal
CIAL-BL1	L1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Cerveza 4,5% ABV y 20 BU de una cervecera de gran escala
CIAL-PF	PF	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Ambiente cervecero artesanal
CIAL-B3	B3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Ambiente cervecero artesanal
CECT-793	PT	<i>Pediococcus damnosus</i>	Levadura de cerveza la ger
CECT-216	T1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Cerveza
CECT-8644	CE	<i>Lactobacillus paracollinoides</i>	Ambiente cervecero

##### 3.1.2 Adaptación de las BAL al crecimiento en cerveza

Se tomaron colonias previamente crecidas en caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS, Difco™, France) en condiciones de anaerobiosis a 28°C durante 72 horas y con ellas se realizaron cultivos progresivos en tres medios líquidos para inducir las a adaptarse y a crecer en un medio similar a una cerveza.

La preparación de los tres medios líquidos o Beverages (BVG): BVG 1, BVG 2 y BVG 3 consistió en mezclar una cerveza (5 % ABV; 11 BU; pH 4,25; 0,25 % YFE) y una bebida no alcohólica a base de malta (0% ABV; 3 BU; pH 5,75; 6,6 % YFE) de acuerdo con lo indicado en la Figura 7. Posteriormente, los medios líquidos, fueron esterilizados por filtración con el uso de membranas de

0.45  $\mu\text{m}$  (Millipore, Estados Unidos), se añadió cicloheximida (Thermo Scientific <sup>TM</sup>, Estados Unidos) hasta alcanzar una concentración de 10 ppm y se homogenizó.



**Figura 7.** Secuencia de los medios líquidos empleados para la adaptación de BAL.

Los cultivos desarrollados en el medio MRS, se centrifugaron a 3000 rpm, 10 min y 4°C; se lavó el pellet dos veces con solución salina estéril (0.9%) y se inoculó cada una de ellas y por separado en un tubo con 10 mL de BVG 1 para luego incubarse a 28°C. Después del desarrollo de turbidez o formación de precipitado en el fondo del tubo, se volvió a centrifugar a las mismas condiciones anteriores y el pellet fue sembrado en 10 mL de BVG 2, incubándose a 28°C hasta el desarrollo de turbidez o formación de precipitado, y se repitió el procedimiento anterior con una nueva siembra e incubación en 10 mL de BVG 3. Para el mantenimiento y la conservación de las cepas adaptadas se hicieron cambios del medio BVG 3 cada 7 días.

## 3.2 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE CERVEZAS

Para realizar los ensayos, se seleccionaron 11 cervezas artesanales disponibles en el mercado español. La preparación de la muestra para el análisis y la determinación de los parámetros de pH, BU y % YFE de las cervezas seleccionadas se analizaron según los métodos de la American Society of Brewing Chemists (American Society of Brewing Chemists ASBC, 2008), descritas brevemente a continuación. Se utilizó el nivel de alcohol declarado en la etiqueta de las cervezas, siendo esta información de carácter obligatorio de acuerdo al Real Decreto 678/2016 en España.

### 3.2.1 Preparación de muestras

Previo a los análisis físico-químicos de la cerveza se descarboxaron y atemperaron las muestras según el método Beer-1, A de la ASBC (2008a), en el que se recomienda someter las muestras de cerveza a una agitación lenta seguida por una agitación vigorosa con agitadores magnéticos durante



10 min. Posteriormente se centrifugaron (10 min, 4000 rpm, 4°C) y se recogieron los sobrenadantes atemperándose a 15-20 °C.

### **3.2.2 pH y acidez total**

El valor de pH se determinó con un potenciómetro digital (pHenomenal®, Reino Unido). Para la acidez total se empleó el método de valoración potenciométrica, para cuantificar el volumen necesario de NaOH 0.1 N para elevar el pH de 12.5 mL de cerveza hasta 8.2 (ASBC, 2008c).

### **3.2.3 Extracto fermentable por levaduras**

Para determinar el extracto fermentable por levaduras se sembraron 3 colonias de *S. pastorianus* (Saflager™ S-189) crecidas en agar Dextrosa-Peptona-Levadura (YPD, Difco™, Francia) a 50 mL de cada una de las cervezas contenidas en un matraz de Erlenmeyer. Cada matraz se incubó a 25°C en un agitador orbital (Infors® AG CH-4103, Bottmingen) a 100 rpm. Al inicio y cada dos días se midieron los grados °P por triplicado hasta que el valor permaneciera constante (ASBC, 2008e). Finalmente, el porcentaje del extracto total fermentable (% YFE) se calculó en base a la fórmula indicada en la ASBC (2008b).

### **3.2.4 Amargor**

El amargor de las cervezas (BU) se determinó mediante el método estandarizado Beer-23A (ASBC, 2008f), que consiste en la extracción principalmente de  $\alpha$ -isoácidos con iso-octano (2,2,4-trimetilpentano). Para esto se emplearon 5 mL de las muestras descarbonatadas, libres de turbidez y atemperadas a 10 °C, a las que se añadió 0.5 mL de HCl 3N y 10 mL de iso-octano. Posteriormente, se agitaron 15 min vigorosamente, se centrifugó a 3000 rpm por 20 minutos a 10°C, (esto garantizó la separación de las fases acuosa y orgánica (Hunter & Dompkowski, 2018). Se prosiguió a la medición de la absorbancia de las muestras a 275 nm en el espectrofotómetro Specord®210 usando el programa Win Aspect®, empleando el iso-octano como blanco. La muestra de cerveza se tomó de la capa superior obtenida del centrifugado (extracto orgánico, apariencia incolora), una vez obtenido el valor de absorbancia, se multiplica por 50, donde relaciona la pendiente de la correlación y el disolvente utilizado, para obtener las BU (ASBC 2008f). Cada determinación se realizó por duplicado, considerando el promedio para el resultado final.

### **3.3 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE BAL EN CERVEZA**

Una vez que las cepas se encontraban adaptadas y las cervezas analizadas, se procedió a la inoculación artificial de las BAL.

#### **3.3.1 Inoculación de BAL en cerveza**

Para la inoculación de cada microorganismo en las diferentes cervezas, se partió de nuevas siembras de cada una de las bacterias adaptadas en el medio BVG 3 (medio que se asemeja más a las condiciones de una cerveza comercial) a 28 °C durante 72 horas, tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria temprana (Pérez, 2019). Posteriormente el cultivo se centrifugó (3000 rpm, 10 min, 4 °C) y tras realizar dos lavados con solución salina estéril (0.9 %), se realizaron nuevas suspensiones bacterianas hasta alcanzar una  $DO_{590nm} = 1$  ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) en solución salina estéril y a partir de esta suspensión se efectuaron diluciones seriadas hasta alcanzar una concentración de  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>.

Las cervezas antes de su inoculación fueron previamente esterilizadas por filtración usando filtros de 0.45 micras (Sartorius) y se colocó 5 mL de cerveza filtrada en un tubo de Eppendorf. A cada tubo se adicionó 5 µL del inóculo de  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> en condiciones de anaerobiosis. Posteriormente se incubaron a una temperatura de 28°C durante 30 días. Paralelamente se incubaron las cervezas sin inocular, como control. Se comprobó la cantidad de bacterias inoculadas por la técnica de sembrado por spot en agar MRS incubándose a 28 °C hasta 7 días en anaerobiosis.

#### **3.3.2 Medición del crecimiento de BAL en cerveza**

Después de 30 días se evaluó el crecimiento de las BAL en las cervezas mediante el desarrollo de turbidez, formación de precipitado y en aquellas donde el crecimiento no era visible, se determinó el crecimiento por espectrofotometría. Para ello las muestras fueron homogenizadas en vórtex y se colocó por triplicado, 250 µL de cada una de las muestras en pocillos de placas con fondo plano. Se midieron las  $\Delta DO_{590nm}$  a los 0 y 30 días con un lector de placas (BioTeck Sinergy™ HT, Estados Unidos), donde una  $\Delta DO_{590nm} \geq 0.05$ , utilizando la cerveza sin inocular como blanco, evidencia un crecimiento bacteriano (Menz *et al.*, 2010) y en aquellas muestras donde el valor era  $< 0.05$  se sembraba en placa en medio MRS, para verificar su crecimiento. La pureza de los crecimientos se comprobó mediante microscopía directa y siembra en medio MRS verificando su color y características morfológicas de las colonias, así como pruebas de peroxidasa y KOH.

Con fines de crear un resultado binario se les asignó un valor de 1 a las muestras con crecimiento y un valor de 0 a las muestras sin crecimiento bacteriano.

### 3.3.3 Detección de genes asociados con la resistencia al lúpulo en BAL

Se realizó una búsqueda bibliográfica de las posibilidades de genes implicados en conferir resistencia al lúpulo a las BAL. Las opciones de primers se analizaron en bases de datos bioinformáticas Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), Gen Bank y Oligo Analyzer. Una vez definidos los genes con sus respectivos primers (Tabla 5), la elaboración de estos últimos fue encargada a la casa comercial de Sigma-Aldrich®. El procedimiento experimental se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar clase II, utilizando tubos Eppendorf de 1.5 mL libres de DNAasa y puntas de pipeta Biosphera® plus (estériles y libres de: ADN, DNasa/RNasa, inhibidores de PCR, ATP y pirógenos/endotoxinas).

**Tabla 5.** Primers utilizados en la detección de genes asociados a la resistencia al lúpulo.

Gen	Primer	Secuencia del primer (5´-3´)	Longitud del fragmento	Referencia
<i>horA</i>	h198F2	5'- AAA TCT TAA CCCTGC CGG -3'	210	Haakensen, M., Shubert, B., & Ziola, B. 2008
	h198R	5'- GCG GAA CGG CGA TAA ACA TA -3'		
<i>horC</i>	46F	5'- CTT GTT GGA GCA ATT ATT GG -3'	94	Haakensen, M., Shubert, B., & Ziola, B. 2008
	139R	5'- CGT TGA CAA GTG CTA CAG G -3'		
<i>hitA</i>	28F	5'- AGC GTA GCA GAA GAA CCT AAG -3'	179	Haakensen, M., Shubert, B., & Ziola, B. 2008
	207R	5'- CAA TTA CCA GGA TCC ATGTACC -3'		
ORF5	154F	5'- GTA CGG ATC GTG GTA AAC G -3'	117	Haakensen, M., Shubert, B., & Ziola, B. 2008
	270R	5'- GAC CAT TTG TCT ACA AGG CAG -3'		

**Tabla 6.** Primer utilizado como control interno para la presencia de ADN bacteriano (16S rRNA)

Gen	Primer	Secuencia del primer (5´-3´)	Longitud del fragmento	Referencia
16SrRNA	386F	5'- CTG ATG GAG CAA CGC CGC GT -3'	210	Haakensen, M., Shubert, B., & Ziola, B. 2008
	534R	5'- ATT ACC GCG GCT GCT GG -3'		

#### a. Preparación de primers

Los primers en seco se centrifugaron (7500 rpm, 10 seg, temperatura ambiente), se le añadió a cada uno la cantidad de agua libre de DNAasa indicada por el fabricante, con la finalidad de tener una

concentración de 100  $\mu\text{M}/\mu\text{L}$ . Se dejaron en hielo durante 30 min, transcurrido el tiempo se agitaron en vórtex durante 15 seg, se tomó 10  $\mu\text{L}$  del preparado de cada primer en un tubo Eppendorf y se añadió 90  $\mu\text{L}$  de agua para qPCR, obteniendo una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ . Este último preparado se utilizó para la preparación de los “Master Mix”. Las preparaciones de los primers que no se utilizaron al final, fueron guardadas en congelación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su conservación y posterior uso.

#### **b. Aislamiento de DNA bacteriano**

Los ADN de cada cepa se obtuvieron de las colonias crecidas en agar MRS a partir de las BAL adaptadas a la cerveza. Para la extracción de ADN se usó el kit Insta Gene™ Matrix (Bio Rad, Italia), para ello se eligió una colonia aislada, la cual se resuspendió en 1 mL de agua libre de DNAsas en un tubo de Eppendorf, se centrifugó (12,000 rpm, 1 min,  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) removiéndose el sobrenadante, y al pellet se le agregó 200  $\mu\text{L}$  de Insta Gene™ Matrix, se incubó a  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 min, posteriormente se agitó con un vórtex durante 10 seg y se volvió a centrifugar (12, 000 rpm, 3 min,  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Se recolectó el sobrenadante (perteneciente al ADN extraído) y se pasó a un tubo de Eppendorf debidamente etiquetado.

El ADN extraído se puede usar al instante para la preparación posterior de la mezcla para qPCR o ser guardado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su conservación, donde si es requerido para su uso, se agita en vórtex durante 10 seg y se centrifuga (12,000 rpm, 3min,  $25^{\circ}\text{C}$ ).

#### **c. Pureza y cuantificación del DNA extraído (Nanodrop®)**

La cuantificación de ADN ( $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) se determinó por espectrofotometría usando el equipo NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y fue calculada a través de la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ). La pureza del ADN se obtuvo mediante la relación  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$ , en la Figura 8 se pueden observar valores indicativos a tales relaciones de absorbancia.

Radio	Valor	Pureza
A <sub>260</sub> /280	1.8-2	ADN de pureza óptima
	1.6-1.8	ADN de pureza aceptable
	<1.6	Presencia de compuestos aromáticos
	>2.1	Contaminación con ARN
A <sub>260</sub> /230	<1.5	Contaminación con sales, carbohidratos y fenoles

**Figura 8.** Valores indicativos de pureza en muestras de ADN.

**Fuente:** Palomo (2005).

#### d. Preparación de “Master Mix” y microplaca de qPCR

Se prepararon los “Master Mix” en tubos de Eppendorf identificados, teniendo en cuenta los siguientes volúmenes y orden de los reactivos, como se presentan en la Tabla 7, para cada uno de los genes a identificar.

**Tabla 7.** Composición de los “Master Mix” para la detección de genes que confieren resistencia al lúpulo.

Reactivo	Cantidad
H <sub>2</sub> O	70 µL
SYBER Green	100 µL
Primer R (1:10)	5 µL
Primer F (1:10)	5 µL

\*Las cantidades están consideradas para el llenado de 20 pocillos de la microplaca.

Se usaron microplacas de 384 pocillos (Applied Biosystems MicroAmp). En cada pocillo de la microplaca se añadió 9 µL del “Master Mix” más 1 µL de ADN bacteriano, este análisis se realizó por triplicado para cada ADN bacteriano. Paralelamente se llenaron pocillos blanco en los cuales se añadió 1 µL de H<sub>2</sub>O de qPCR en lugar de ADN bacteriano. Una vez finalizado el llenado se cubrió la placa con film, se centrifugó (3000 rpm, 3 min, 20°C). Se usó ADN extraído de *Pediococcus damnosus* CECT 793 como control positivo de los cuatro genes, y un control interno de PCR (IS) correspondiente al gen 16S rRNA.

#### e. Condiciones de la qPCR

Para la detección de los genes *horA*, *horC*, *hitA* y ORF5 en los ADN extraídos se usaron las condiciones descritas en la Tabla 8 y se llevó a cabo en el equipo Applied Biosystems ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Life Technologies), donde las condiciones se programaron directamente en el software del equipo, una vez establecidas se introdujo la placa recién centrifugada.

**Tabla 8.** Condiciones de la qPCR para la detección de genes asociados a la resistencia al lúpulo.

Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Anillamiento	Extensión	Extensión final	No. ciclos
95°C, 5 min	94°C, 45 s	52°C, 45s	72°C, 50s	72°C, 5min	35

### 3.4 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE AB EN CERVEZA

Se eligió evaluar la producción de AB en la cerveza artesanal B12 “Castaña” (22 BU, 5 % ABV y pH 4.3) a la cual se inoculó cada una de las BAL por separado.

### **3.4.1 Inoculación de BAL en cerveza artesanal**

Se esterilizó la cerveza elegida mediante filtros de 0.45 micras (Sartorius) y se colocó 20 mL de cerveza filtrada B12 (22 BU, 5.0 % ABV y pH 4.3) en un tubo hermético previamente esterilizado. Se prepararon inóculos de todas las BAL, a excepción de las cepas CECT. A cada tubo se adicionó 5  $\mu\text{L}$  del inóculo de  $10^5$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  de cada una de las BAL por separado, en ambiente anaeróbico, para luego incubarlas a 28°C durante 30 días. Paralelamente se incubó una muestra control de cerveza sin inóculo. La cantidad de bacterias inoculadas se comprobó por la técnica de sembrado por spot en agar MRS incubándose a 28°C durante 7 días en anaerobiosis.

### **3.4.2 Cuantificación de AB producidas en cerveza**

Después de la incubación durante 30 días, las muestras se centrifugaron (13,000 g, 5 min), y los sobrenadantes libres de células fueron usados para cuantificar la presencia de las AB: tiramina, histamina, putrescina y cadaverina, por RP-HPLC y detección de fluorescencia, de acuerdo con las condiciones descritas por Moreno-Arribas, Polo, Jorganes & Muñoz. (2003). La cerveza no inoculada se usó como control y todas las determinaciones se hicieron por duplicado. Para ello se enviaron las muestras a la “Estación Enológica de Haro”, el cual es un laboratorio de ensayos acreditado bajo la norma UNE-EN ISO/IEC 17025 por ENAC, ubicado en La Rioja, España. Las muestras fueron enviadas cumpliendo todos los requerimientos solicitados por el laboratorio para garantizar la integridad y conservación de la muestra.

### **3.4.3 Detección de genes relacionados con la producción de AB en BAL**

Se realizó una búsqueda bibliográfica de los genes con sus respectivos primers implicados en la producción por BAL de las principales AB presentes en cerveza. Las posibilidades de secuencias de iniciadores se analizaron por medio de herramientas bioinformáticas tales como: Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), GenBank y OligoAnalyzer. Una vez identificados los genes y los primers, (Tabla 9) se encargó su elaboración a Sigma-Aldrich®. El procedimiento experimental se llevó a cabo en una cabina de flujo laminar, clase II, utilizando tubos de Eppendorf de 1.5 mL libres de DNasa y puntas de pipeta Biosphera®plus (estériles y libres de: ADN, DNasa/RNasa, inhibidores de PCR, ATP y pirógenos/endotoxinas).

**Tabla 9.** Primers utilizados en la detección de genes relacionados con la producción de AB.

Gen	Primer	Secuencia del primer (5'-3')	Longitud del fragmento	Referencia
<i>hdc</i>	hdcAf	5'- ATG AAG CCA GGA CAA GTT GG -3'	210	Coton & Coton. 2005
	hdcAr	5'- AAT TGA GCC ACC TGG AAT TG -3'		
<i>tdc</i>	tdcf	5'- CAA ATG GAA GAA GAA GTT GC -3'	94	Lucas, Clisse & Lonvaud-Funel. 2008
	tdcr	5'- GAA CCA TCA GCA ACA ATG TG -3'		
<i>odc</i>	odcf	5'- TGC ACT TCC ATA TCC TCC AG -3'	179	Granchi, Talini, Rigacci <i>et al.</i> , 2006 Nannelli, Clisse, Gindreau <i>et al.</i> , 2008
	odcr	5'- GAA TTT CTG GAG CAA ATC CA -3'		

\*Histidina descarboxilasa (*hdc*), tirosina descarboxilasa (*tdc*) y omitina descarboxilasa (*odc*).

#### a. Preparación de primers

Los primers se prepararon de acuerdo con los descritos en la sección 3.3.3 apartado a.

#### b. Aislamiento de DNA bacteriano

Los ADN de las cepas control y de las BAL a analizar se obtuvieron del desarrollo de colonias crecidas en agar MRS según el procedimiento descrito en la sección 3.3.3 apartado b. Los códigos de las BAL a analizar son: L1, D1, B1, B3, PF, B2, B6 y CL.

#### c. Pureza y cuantificación de los ADN extraídos (Nanodrop®)

La pureza y cuantificación de los ADN extraídos se realizó según lo descrito en la sección 3.3.3 apartado c.

#### d. Preparación de “Master Mix” y microplaca de qPCR

Se prepararon los “Master Mix” en tubos de Eppendorf identificados, de acuerdo a lo descrito en la siguiente Tabla 10.

**Tabla 10.** Composición de los “Master Mix” para la detección de genes relacionados a la síntesis de AB.

Reactivo	Cantidad
H <sub>2</sub> O	60 µL
SYBER Green	100 µL
Primer R (1:10)	10 µL
Primer F (1:10)	10 µL

\*Las cantidades están consideradas para el llenado de 20 pocillos de la microplaca.

Se usaron microplacas de 384 pocillos (Applied Biosystems MicroAmp). En cada pocillo de la microplaca se añadió 9 µL del “Master Mix” más 1 µL de DNA bacteriano, por triplicado para cada ADN bacteriano. Paralelamente se llenaron pocillos blanco en los cuales se añadió 1 µL de H<sub>2</sub>O de qPCR en lugar de DNA bacteriano. Una vez finalizado el llenado se cubrió la placa con film, se centrifugó (3000 rpm, 3 min, 20°C). Se usaron dos cepas control, la cepa productora de tiramina *Lactobacillus brevis* CECT 216 (DMS 1268) y *Lactobacillus saerimneri* 30<sup>a</sup> (ATCC®)

33222™) cepa productora de histamina y putrescina, esta última proporcionada por el Instituto de Productos Lácteos de Asturias- CSIC, y un control interno de PCR (IS) correspondiente al gen 16S rRNA.

**e. Condiciones de la qPCR.**

Para detectar la presencia de los genes *tdc*, *hdc* y *odc*, correspondientes a los genes de descarboxilasas de tirosina, histamina y ornitina, respectivamente, se utilizaron las condiciones descritas por Cotton *et al.*, (2010). Se llevó a cabo en el equipo Applied Biosystems ViiA™ Real-Time PCR System (Lite Technologies), donde las condiciones se programaron directamente en el software del equipo como se muestra en la Tabla 11, una vez establecidas se introdujo la placa recién centrifugada.

**Tabla 11.** Condiciones de la qPCR para la detección de genes relacionados a la síntesis de AB.

Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Anillamiento	Extensión	Extensión Final	No. ciclos
95°C, 5 min	94 °C, 45 s	55 °C, 30s	72 °C, 2 min	72 °C, 5min	35

**3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Tanto para la regresión logística binaria como para la prueba t, el intervalo de confianza y el nivel de significancia se establecieron en 95 % y  $p < 0.05$ , respectivamente. La regresión logística binaria (RLB) se calculó en función de la capacidad de las BAL para crecer en las cervezas analizadas como variables de resultado relacionadas con la ausencia / presencia de genes de resistencia al lúpulo. Los resultados de PCR para los genes *horA*, *hitA*, *ORF5* y *horC* se incluyeron como covariables (0 = ausencia y 1= presencia), y la RLB se realizó utilizando el método Forward Stepwise. La prueba t de Student emparejada se utilizó para determinar si había diferencias significativas en la producción de AB en las cervezas probadas. El análisis estadístico de los datos se realizó con SPS Statistic versión 22.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 ACONDICIONAMIENTO DE BAL AL CRECIMIENTO EN CERVEZA

#### 4.1.1 Adaptación de BAL al crecimiento en cerveza

Para este estudio se seleccionaron once BAL, las cuales se describen previamente en la Tabla 4. Antes de llevar a cabo la prueba de capacidad de deterioro de la cerveza, los once aislamientos de BAL fueron inducidos a crecer en condiciones más próximas a la cerveza (BVG1, BVG2 y BVG3), a través del incremento paulatino de valores de alcohol y unidades de amargor (concentración subinhibitoria de  $\alpha$ -isoácidos), acompañado de una reducción de valores de extracto fermentable por levaduras y pH. De las once cepas aisladas siete pudieron crecer en la bebida tipo cerveza (BVG3). Las cepas con código de identificación; B1, CL, PF, B3, B6, D1 y L1 se seleccionaron para su evaluación.

La adaptación de las BAL es un paso fundamental, pues se han encontrado estudios que indican que la adaptación de bacterias que fueron aisladas de un ambiente cervecero a un medio que se asemeje a la cerveza permite que éstas a través de continuos pases para mantenerlas viables no pierdan sus genes que confieren resistencia al lúpulo (Susuki *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2008)

### 4.2 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO DE CERVEZAS



**Figura 9.** Muestras de cervezas utilizadas, a temperaturas y descarbonatadas

Se seleccionaron 11 cervezas artesanales, para la inoculación artificial de las BAL: Castaña (B1), Pale Ale M (B2), San Miguel (B3), Morena (B4), Viejo Madrid (B5), Stout (B6), Trigo (B7), Rubia (B8), IPA Dry (B9), Super 8 IPA (B10) y Uva (B11).

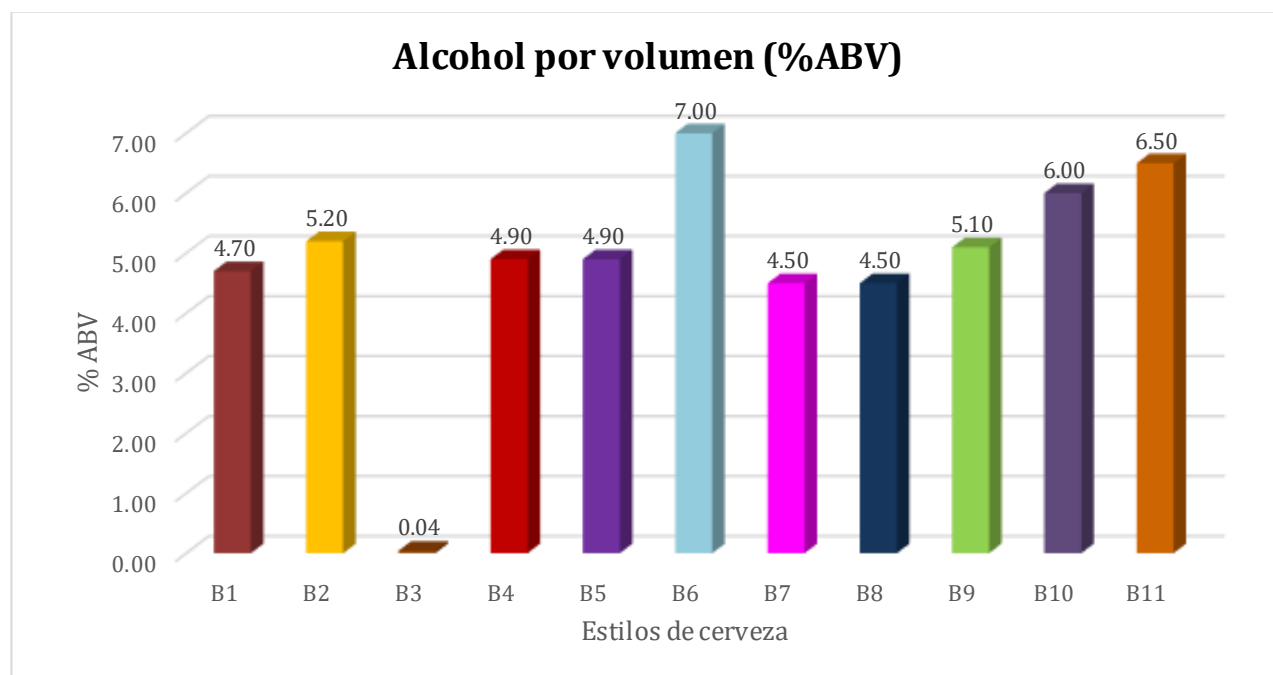
En la Tabla 12, se muestran los resultados de los 4 parámetros físico-químicos evaluados en las once cervezas utilizadas.

**Tabla 12.** Características físico-químicas (media  $\pm$  desviación estándar) de las cervezas utilizadas en la evaluación de la capacidad de deterioro de la cerveza por los aislamientos de BAL.

Cerveza	Código de la cerveza	pH	% ABV	BU	% YFE
Castaña	B1	4.50 $\pm$ 0.01	4.7 $\pm$ 0.04	15 $\pm$ 0.21	0.96 $\pm$ 0.01
Pale Ale M	B2	4.32 $\pm$ 0.01	5.2 $\pm$ 0.06	19 $\pm$ 0.57	0.99 $\pm$ 0.02
San Miguel	B3	4.15 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	13 $\pm$ 0.28	1.93 $\pm$ 0.01
Morena	B4	4.49 $\pm$ 0.01	4.9 $\pm$ 0.05	19 $\pm$ 0.35	0.72 $\pm$ 0.06
Viejo Madrid	B5	4.63 $\pm$ 0.01	4.9 $\pm$ 0.02	17 $\pm$ 0.35	0.29 $\pm$ 0.02
Stout	B6	4.46 $\pm$ 0.01	7.0 $\pm$ 0.08	16 $\pm$ 0.35	2.45 $\pm$ 0.06
Trigo	B7	4.33 $\pm$ 0.01	4.5 $\pm$ 0.07	12 $\pm$ 0.57	1.49 $\pm$ 0.04
Rubia	B8	4.68 $\pm$ 0.01	4.5 $\pm$ 0.09	19 $\pm$ 0.28	0.69 $\pm$ 0.03
IPA Adry 5.1	B9	4.44 $\pm$ 0.01	5.1 $\pm$ 0.10	33 $\pm$ 0.35	2.24 $\pm$ 0.06
Super8 IPA	B10	4.61 $\pm$ 0.01	6.0 $\pm$ 0.11	21 $\pm$ 0.35	0.32 $\pm$ 0.02
Uva	B11	3.47 $\pm$ 0.01	6.5 $\pm$ 0.14	7 $\pm$ 0.57	1.63 $\pm$ 0.08

ABV: alcohol por volumen; BU: unidades de amargor; YFE: extracto fermentable por levaduras

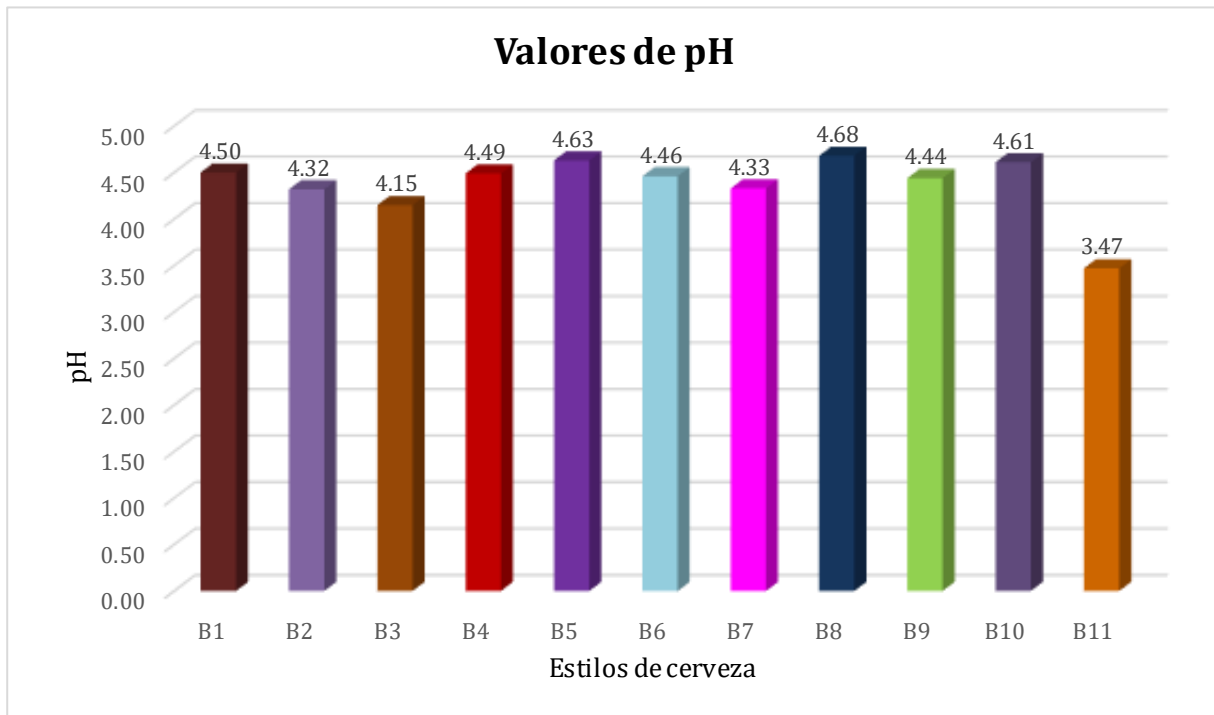
Respecto al contenido de alcohol de las cervezas seleccionadas, el valor mínimo fue de 0.04 % ABV, que corresponde a la cerveza B3 sin alcohol, mientras que el máximo de 7.0 % ABV de la cerveza B6. La Figura 10 muestra los % ABV de las muestras de cerveza.



**Figura 10.** Alcohol por volumen de las once cervezas seleccionadas.

### 4.2.1 pH

Los valores de pH como se observan en la Figura 11 van de 3.47 a 4.68. El valor más ácido lo presentó B11 y la menos ácida corresponde a B8.

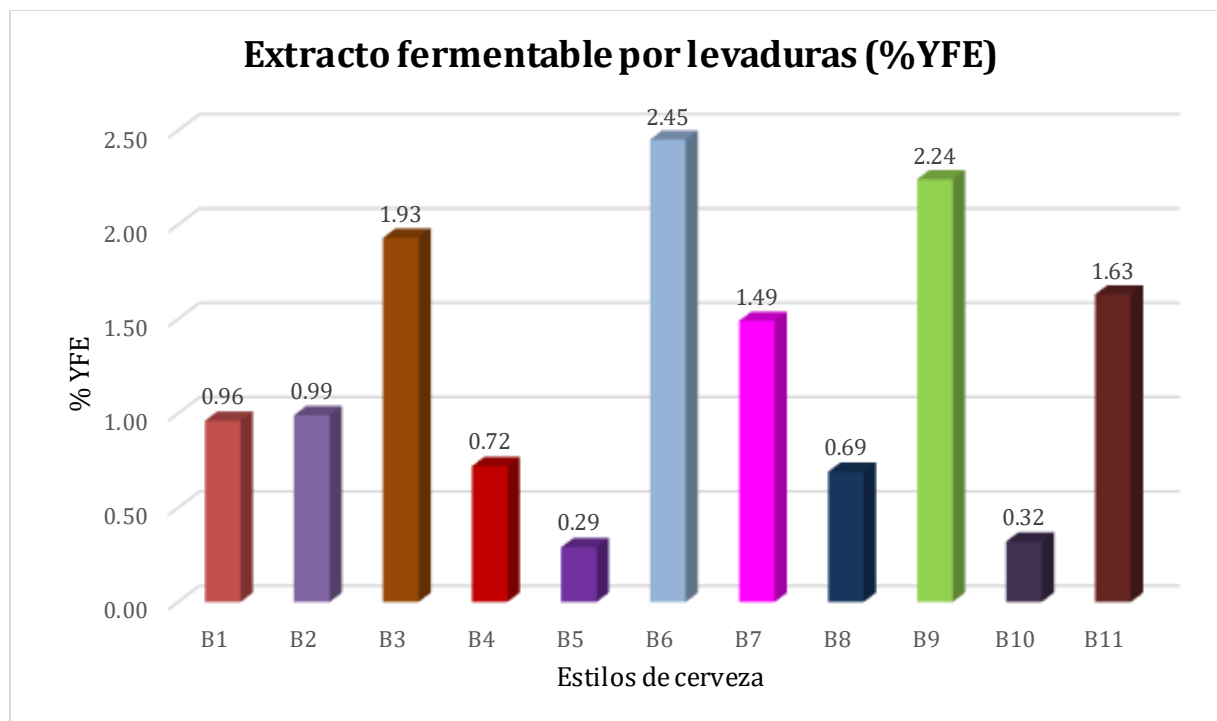


**Figura 11.** Valores de pH registrados en las once cervezas seleccionadas.

A través de diversas evaluaciones se ha propuesto un rango de pH que va de 3.5 a 5.5, que resulta positivo, pues otorga una ventaja competitiva ante la acción protectora antiséptica sobre el medio (González, 2017). Las levaduras usadas son ácido-tolerantes y se desarrollan perfectamente en valores de pH bajos, lo que no pueden hacer otros microorganismos (González, 2017). La única cerveza que se sale de estos parámetros propuesto es B11, sin embargo, se encuentra cerca de los límites propuestos, con un valor de 3.47, a pesar de ello, este valor al ser más ácido contribuye aún más a la protección de posibles contaminaciones bacterianas.

#### 4.2.2 Extracto fermentable por levaduras

El rango de valores del % YFE de las 11 cervezas es de 0.29 a 2.45, como se observa en la Figura 12

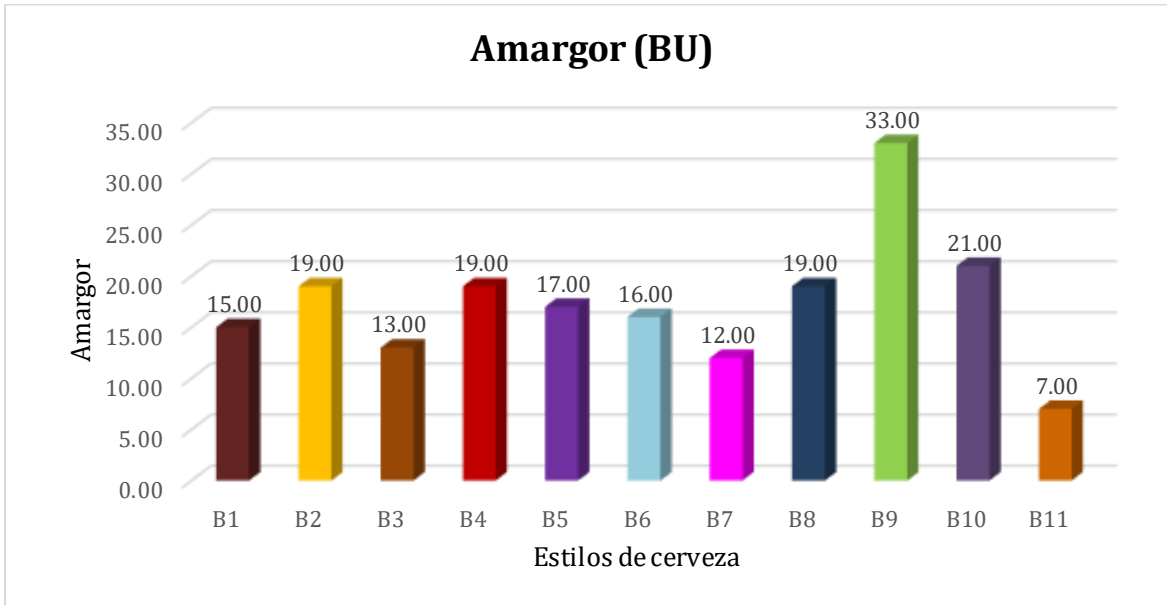


**Figura 12.** Valores del extracto fermentable por levaduras (% YFE) de las once cervezas seleccionadas.

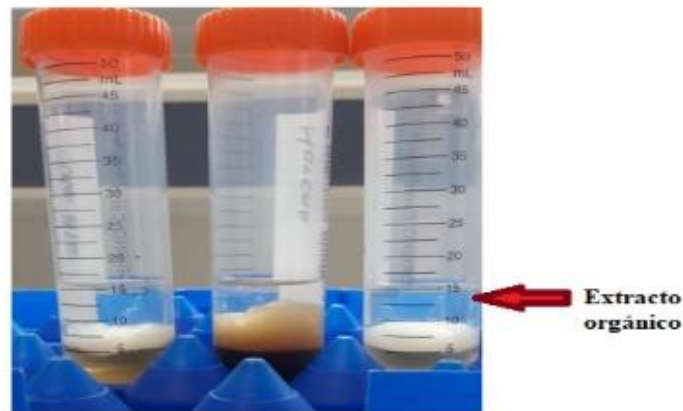
Las cervezas que presentan un valor de atenuación o extracto aparente más bajo son B5 (0.29), B10 (0.32) y B8 (0.69). Cuando el valor de azúcares residuales después de la fermentación es alta, representa un factor favorable para la alteración de la estabilidad microbiológica, ya que podrían ser metabolizados por microorganismos que provocan deterioro en la calidad de la bebida (Mosher, 2015).

#### 4.2.3 Amargor

Los valores de las unidades internacionales de amargor fueron desde 7 BU correspondiente a B11, hasta 33 BU perteneciente a B9. Los valores de  $\alpha$ -isoácidos son importantes pues como ya se ha venido mencionando éstos otorgan a la cerveza propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram positivas (Suzuki, 2011)



**Figura 13.** Valores de las Unidades Internacionales de amargor (BU) de las once cervezas seleccionadas.



**Figura 14.** Separación de la fase orgánica (iso- $\alpha$ -ácidos) y la acuosa, en la determinación de BU.

## 4.3 CRECIMIENTO DE BAL EN CERVEZA

### 4.3.1 Inoculación de BAL en cerveza

La inoculación se realizó a partir de las BAL adaptadas al medio BVG3. El número de bacterias inoculadas se comprobó a través de la siembra por spot en medio MRS, teniendo en la mayoría de los casos un inóculo  $\sim 10^5$  bacterias, como se observa en la Tabla 13.



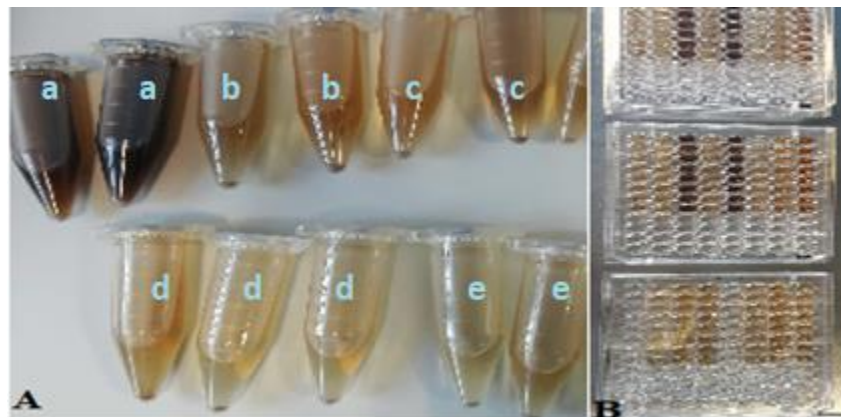
**Figura 15.** Siembra por spot para el conteo del inóculo de L1 en agar MRS.

**Tabla 13.** Concentración de BAL inoculadas en las cervezas

BAL	B1	CL	PF	B3	B6	D1	L1
[cerveza]	$3.53 \times 10^5$	$1.90 \times 10^5$	$3.17 \times 10^5$	$3.13 \times 10^5$	$8.00 \times 10^5$	$9.8 \times 10^4$	$1.30 \times 10^5$

#### 4.3.2 Medición del crecimiento de BAL en cerveza

Los resultados arrojados a los 30 días posteriores a la incubación indican que dos cepas de *L. brevis* D1 y L1 deterioraron diez cervezas de once, lo que corresponde a un 90.9 %, siendo cerveza B11 la única en la que no se evidenció crecimiento, esto podría deberse principalmente al pH bajo de esta cerveza (3.47). *L. plantarum* creció en seis cervezas (B1, B2, B4, B6, B7 y B8), mientras que las otras cuatro cepas restantes sólo crecieron en las cervezas B1 y B2 con BU de 15 y 19 y pH de 4.32 y 4.5 respectivamente, como se observa en la Tabla 15.



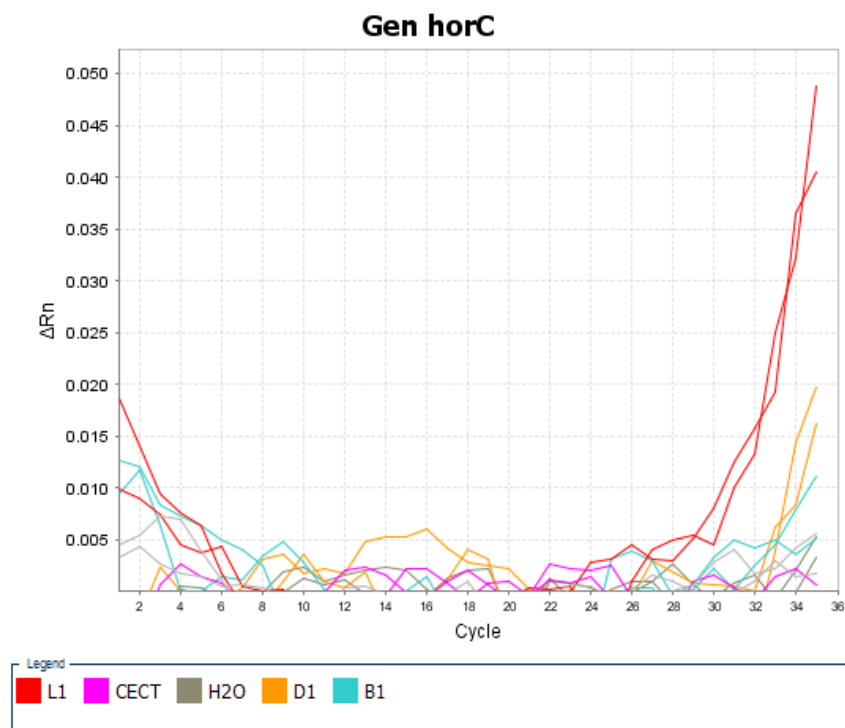
**Figura 16.** Imágenes correspondientes a la evaluación del crecimiento de BAL en los distintos estilos de cervezas. A: en el fondo del tubo se observa crecimiento de BAL (a: CL en cerveza B4; b: B1 en cerveza B2; c: B3 en cerveza B1; d: D1 en cerveza B8; e: L1 en cerveza B7). B: placa de 96 pocillos donde se evaluó el crecimiento por espectrofotometría (ver anexo 1).

#### 4.4 IDENTIFICACIÓN DE GENES QUE CONFIEREN RESISTENCIA AL LÚPULO

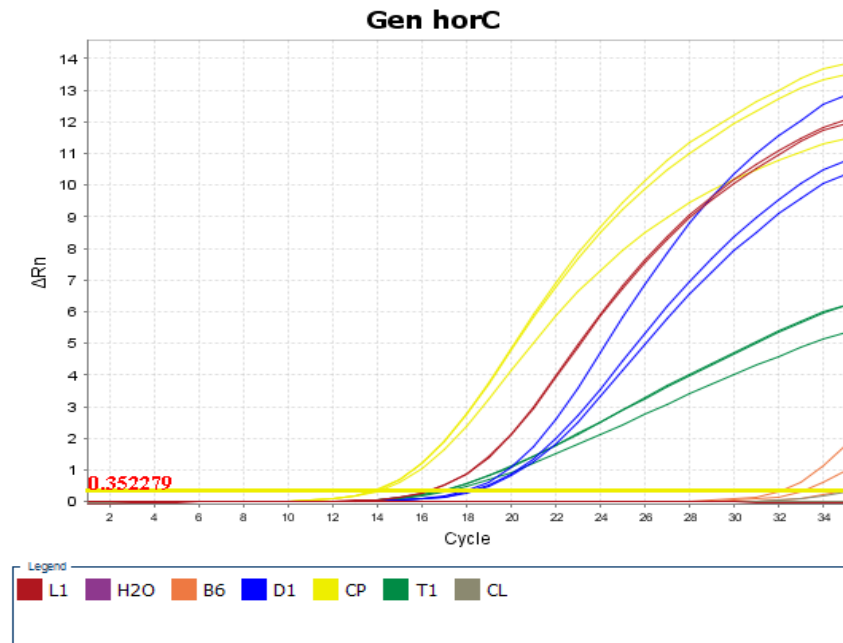
Los métodos actuales para detectar e identificar a las BAL no distinguen entre las bacterias benignas de aquellas capaces de deteriorar a la cerveza. Por esta razón se usó la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), donde se identificaron los organismos que causan deterioro a la cerveza, basados en la presencia de un gen o genes (*horA*, *horC*, *hitA* y ORF5) que se correlacionan fuertemente con la capacidad de un organismo de resistir al lúpulo y por ende tener la capacidad de crecer en cerveza.

- **Selección de primers y condiciones de la qPCR.**

En diversos estudios se indica que la capacidad deteriorante de las BAL en cerveza se debe a la presencia de genes como *horC*, *horA*, *hitA* y ORF5, basado en ello se colocaron a prueba dos métodos de qPCR, los resultados de la PCR siguiendo el método descrito por Sami *et al.*, 1997 y Susuki *et al.*, 2006 no fueron de ninguna forma convincentes (Figura 17). Sin embargo, cuando se usaron los primers y condiciones según Haakensen, M. *et al.*, en 2008 la amplificación de los genes fue contundente (Figura 18), de tal forma que las condiciones de este último autor se utilizaron para las pruebas posteriores.



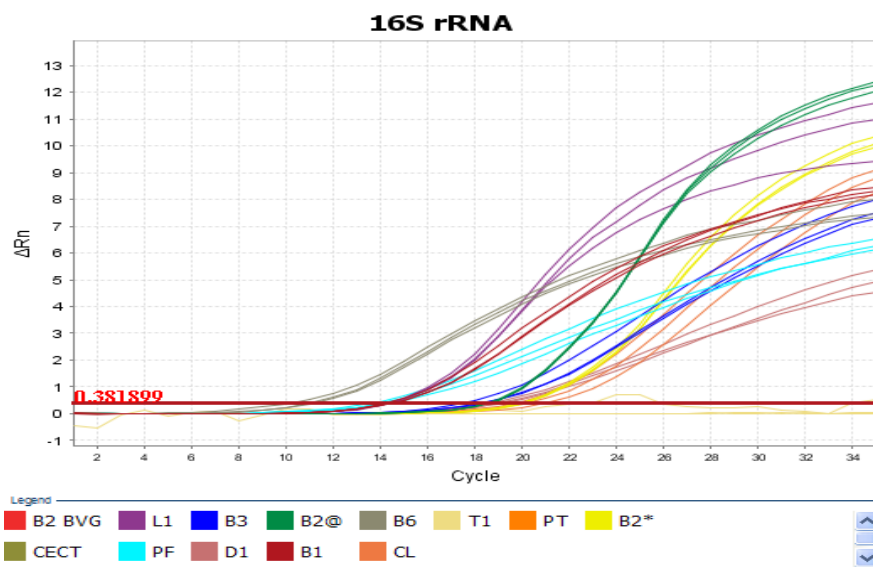
**Figura 17.** Curva de la qPCR para la detección de *horC* en L1, DI y B1, siguiendo el método descrito por Sami *et al.*, 1997 y Susuki *et al.*, 2006.



**Figura 18.** Curva de la qPCR para la detección *horC* en L1 y D1, siguiendo el método descrito por Haakensen, M. *et al.*, en 2008.

- **Control interno de la presencia de DNA bacteriano (16S rRNA)**

Para seguir el protocolo de la PCR y dar validez y veracidad a los resultados se incluyó un control indicador de la presencia de ADN bacteriano, el gen 16S rRNA (IS). La amplificación del gen que se muestra en la Figura 19, la misma que muestra la presencia de DNA bacteriano en las once muestras de cepas utilizadas en el estudio.



**Figura 19.** Curva de la qPCR del gen 16S rRNA de las once cepas descritas en la Tabla 4.



- **Cuantificación y pureza del ADN extraído (Nanodrop®)**

**Tabla 14.** Resultados de la cuantificación y pureza del DNA (Nanodrop®).

ADN de la BAL	ng/μL	A260/280	A260/230	Usando el equipo Nanodrop® se determinó la
B1	642.7	2.05	1.82	concentración y pureza de las muestras de
CL	183.6	2.15	1.76	ADN. La mayoría de las muestras mostraron
PF	1820.8	2.2	1.95	valores ligeramente por encima del límite
B3	488.6	2.21	2.22	superior del valor óptimo, 1.8 – 2.0 en la
B6	433.9	2.01	1.58	relación A260 / 280 (Palomo, 2005), lo cual
D1	272.5	2.19	1.67	
L1	574.3	2.34	1.99	

puede deberse por la presencia de ARN en la muestra. En cuanto a la relación A260/230 se considera que es puro cuando se sitúa en torno a 1.5 - 2.2 (Palomo, 2005), en este caso la mayoría de las muestras se encuentran dentro de este intervalo, a excepción de B3, lo que podría deberse a la presencia de sales o carbohidratos. A pesar de que algunas muestras no cumplieron con los límites óptimos de pureza no representaron algún problema en los resultados de la qPCR..

#### **4.4.1 Capacidad de deterioro de BAL en cerveza y presencia de genes relacionados con la resistencia al lúpulo.**

Los resultados de la capacidad de deterioro de la cerveza y la presencia de *horA*, *horC*, *hitA* y ORF5 se muestran en la Tabla 15. *L. brevis* (D1) posee *horA*, *horC* y ORF5, mientras *L. brevis* (L1) posee todos los genes analizados, ambas BAL deterioraron el 90.9% de las cervezas de prueba, dejando sólo la B11 sin deteriorar. Se debe tener en consideración que B11 es la cerveza con el pH más ácido (3.47).

Los resultados muestran que tres BAL que tienen ausencia de los cuatro genes analizados, *L. plantarum* (CL), *P. acidilactici* (PF) y *L. mesenteroides* (B3), éstas lograron deteriorar cervezas con menos de 20 BU. La cerveza B10 con 21 BU no presentó ningún crecimiento por las tres BAL anteriores, sin embargo, en ella sí crecieron D1 y L1. Los resultados de *L. plantarum* (CL) y su capacidad de deteriorar a seis cervezas, aunque las BU no sea mayor a 20 confirman que esta cepa es una bacteria potencialmente deteriorante de la cerveza, dependiendo el estilo cervecero. Schnidrbanger, 2018 y colaboradores presentaron estadísticas que indicaban que en el periodo de 2010 - 2016 cerca del 5 % del deterioro de las cervezas se debía a *L. plantarum*.

En cuanto a *Leuconostoc* sp. se sabe que la incidencia de contaminación en cerveza es menor a 1 % (Suzuki, *et al.*, 2008). En nuestro estudio *Leuconostoc citreum* (B1) y *L. paracasei* (B6) mostraron ORF5; a pesar de ello, sólo pudieron deteriorar dos cervezas, B1 y B2, al igual que aquellas cepas

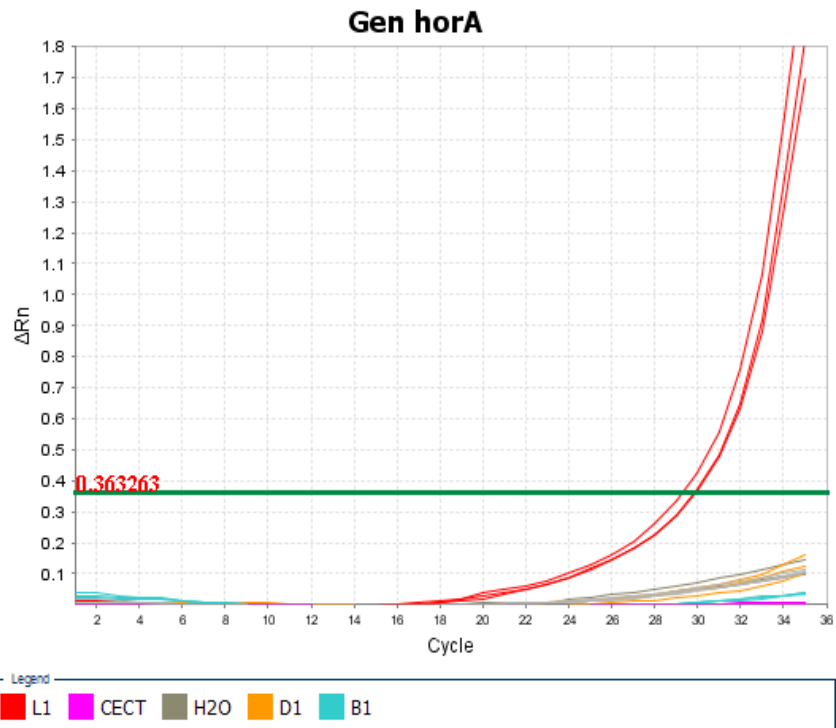
que no presentaron ningún gen analizado, por lo que se deduce que ORF5 no es determinante en conferir a las BAL una resistencia al lúpulo, tal como lo menciona Haakensen, 2008 y colaboradores, aludiendo que hay correlación negativa de este gen con la habilidad de crecimiento en cerveza para el género *Pediococcus*. Se ha llegado a encontrar que ORF5 se localiza en el mismo plásmido que *horC* en *Pediococcus* sin embargo estos dos genes pueden ocurrir de manera independiente (Haakensen. M., *et al.*, 2008).

Los aislados de BAL que no presentaron los genes *horC* y *horA* solo lograron crecer en las cervezas con menos de 20 BU, a diferencia de aquellas que si poseían los genes. Las cervezas de estilo pilsner / lager podrían aparentemente ser más propensas al deterioro, pues la gran mayoría tiene menos de 25 BU, en contraste con algunos estilos elaborados principalmente de manera artesanal como las Indian Pale Ale (IPA), que puede alcanzar más de 50 BU debido al uso popular de lúpulos más amargos (Rodhouse & Carbonero, 2019); sin embargo, el enfrentarse con bacterias que muestren resistencia al lúpulo y prácticas que no contemplan filtración ni pasteurización las IPA podrían también ser susceptibles a la contaminación microbiana por cepas resistentes al lúpulo.

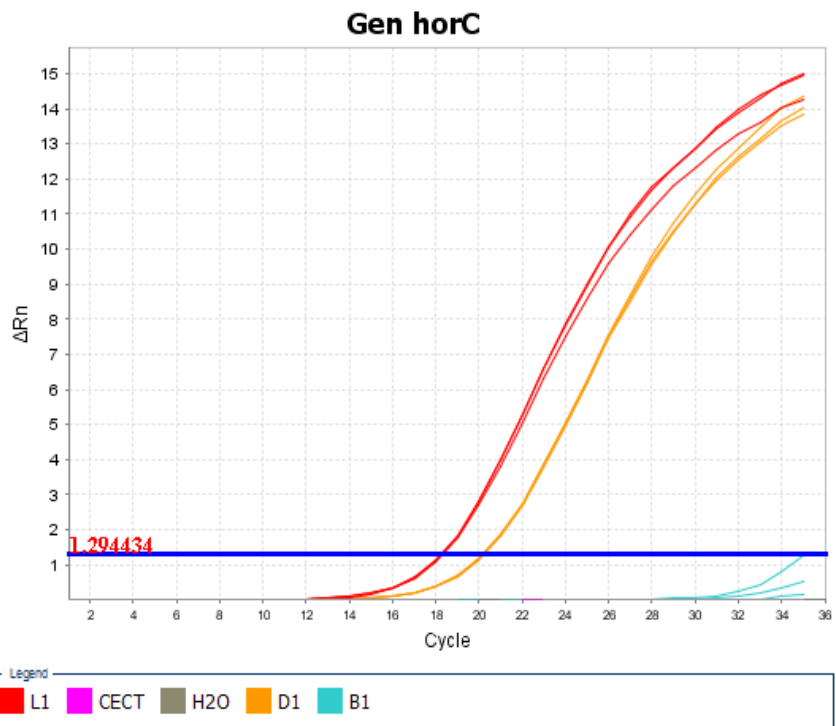
Para determinar la contribución de cada uno de los genes en la habilidad de deterioro de la cerveza se aplicó la regresión logística binaria, arrojando que *horA* y *horC* son los genes que muestran mayor correlación con el crecimiento en cerveza. Se tiene que enfatizar que ambos genes estuvieron presentes en los aislamientos que crecieron en la mayoría de las cervezas ensayadas, por lo que no fue posible discriminar cuál de los genes contribuye más a la capacidad de deterioro de la bebida, lo cual va acorde con distintas afirmaciones de grupos de trabajo especializados en el estudio de las BAL y la cerveza (Haakensen *et al.*, 2008; Haakensen *et al.*, 2009; Bergsveinson, *et al.*, 2015).

**Tabla 15.** Capacidad de deterioro de las BAL a la cerveza y genes que confieren resistencia al lúpulo

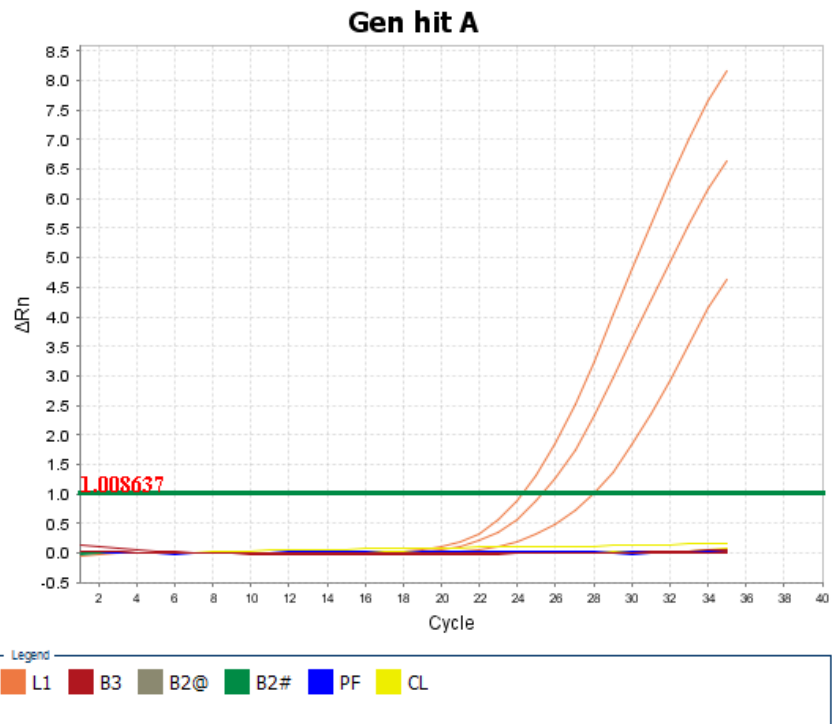
Bacteria inoculada	Cerveza deteriorada	IS (control interno)	Resistencia al lúpulo			
			<i>horA</i>	<i>horC</i>	<i>hitA</i>	ORF5
B1	B1 y B2	+	-	-	-	+
CL	B1, B2, B4, B6, B7 y B8	+	-	-	-	-
PF	B1 y B2	+	-	-	-	-
B3	B1 y B2	+	-	-	-	-
B6	B1 y B2	+	-	-	-	+
D1	Todas excepto B11	+	+	+	-	+
L1	Todas excepto B11	+	+	+	+	+



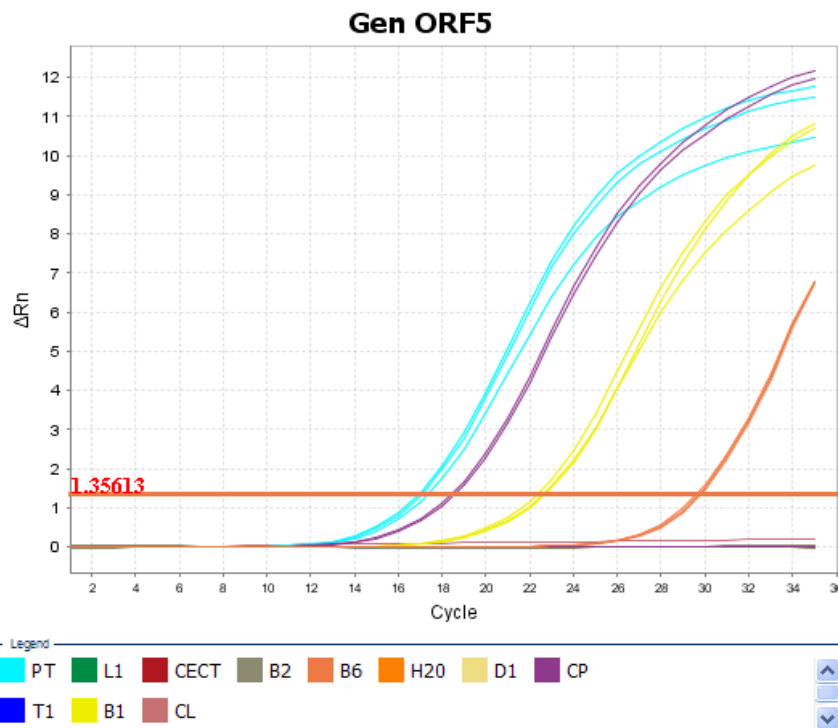
**Figura 20.** Curva de la qPCR, donde se detecta la amplificación de *horA* en L1.



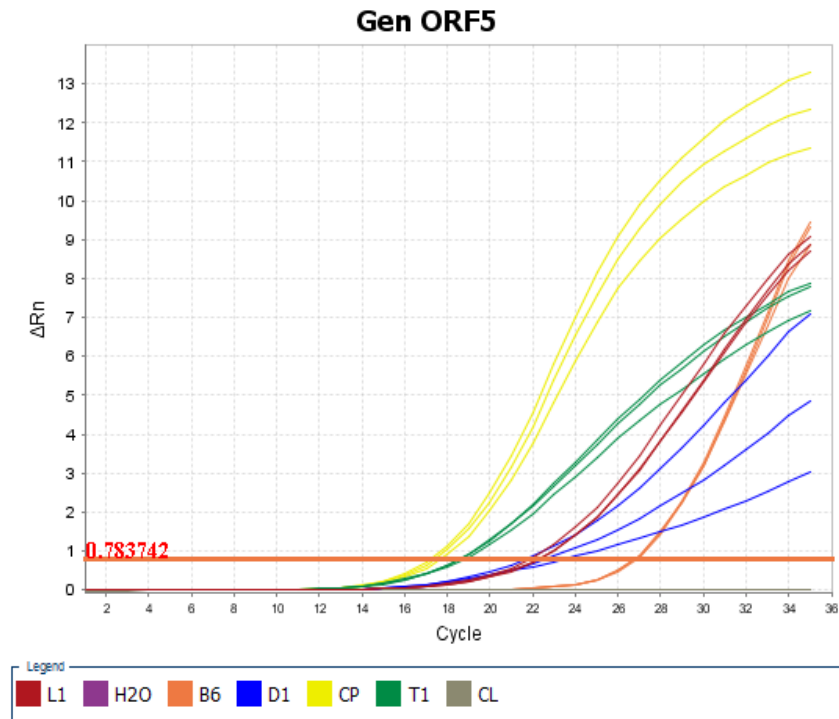
**Figura 21.** Curva de la qPCR, donde se detecta la amplificación de *horC* en L1 y D1



**Figura 22.** Curva de la qPCR, donde se detecta la amplificación de *hitA* en L1



**Figura 23.** Curva de la qPCR, donde se detecta la amplificación de ORF5 en B1 y B6



**Figura 24.** Curva de la qPCR, donde se detecta la amplificación de ORF5 en D1 y L1.

#### 4.5 PRODUCCIÓN DE AB EN CERVEZA Y PRESENCIA DE GENES DE AMINOÁCIDOS DESCARBOXILASA.

En la Tabla 16 se muestra la presencia de genes relacionados con la síntesis de AB (*tdc*, *odc* y *hdc*) en las BAL adaptadas a la cerveza, así como la cuantificación de AB que se encontraron a niveles detectables en la cerveza B12 (putrescina y tiramina) y los casos de diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre concentraciones de AB en cervezas inoculadas y la cerveza control. Se observó que la capacidad de producir AB no se distribuye homogéneamente dentro de la misma especie, lo que va de acuerdo con la hipótesis de que la presencia de genes que codifican enzimas aminoácido descarboxilasas es un rasgo característico de la cepa en BAL (Álvarez & Moreno-Arribas, 2014), lo que sugiere que la transferencia horizontal de genes puede explicar su diseminación entre cepas (Lucas *et al.*, 2008; Marcobal *et al.*, 2006).

En la cerveza control B12 (sin inóculo), únicamente se detectó putrescina ( $4.2 \text{ mg L}^{-1}$ ), esto no es raro pues se ha observado que tal AB ésta naturalmente presente en las cervezas, pudiendo provenir de materias primas (principalmente de la malta), así como de los procesos de fermentación (Kalac, & Krizek, 2003; Loret *et al.*, 2005; Poveda, 2019), por lo que en este caso su presencia se asocia más a la materia prima que al metabolismo por BAL.

Algunos de los aislados presentaban los genes *tdc*, *odc* y *hdc* y no sintetizaron AB (histamina, tiramina y putrescina), por lo que se sugiere que aparte de que las BAL presenten el gen que les permite actividad descarboxilasa, es necesario que las condiciones ambientales sean apropiadas, así como contar con la disponibilidad de aminoácidos precursores, pH y temperatura (Linares *et al.*, 2012). También se ha sugerido que la no producción de AB está asociada con la presencia de genes silenciosos (Álvarez & Moreno-Arribas, 2014) o mutaciones en la biosíntesis de los genes (Ladero, Fernández, Calles-Enríquez, Sánchez-Llana, Cañedo, Martín & Álvarez, 2012).

Se encontró un aumento significativo de los niveles de putrescina y tiramina (4.4 y 4.62 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente) en la cerveza B12 inoculada con *L. brevis* (L1), así como un aumento en el nivel de putrescina en la B12 inoculada con *L. brevis* (D1) de 4.4 mg L<sup>-1</sup>. Concentraciones similares de estas AB en cerveza se han informado en estudios previos (Kalač *et al.*, 2002; Almeida, Fernandes & Cunha, 2012; Poveda, Ruiz, Sesena & Palop, 2017). La putrescina es la AB más destacada detectada en otras bebidas fermentadas como vino (Marcobal *et al.*, 2006) y sidra (Garai, Duenas, Irastorza & Moreno-Arribas, 2007), lo que sugiere su importancia en relación con la seguridad alimentaria independientemente de la bebida fermentada.

Los expertos en AB sugieren que en el caso de bebidas alcohólicas, el impacto tóxico de las AB no está conectado con las altas concentraciones en las bebidas, sino en el consumo de grandes cantidades de cerveza, vino o cidra en un plazo corto de tiempo, adicionalmente el alcohol reduce la actividad de la mono y diamino oxidasas, además se puede presentar alguna inhibición del proceso de desintoxicación ya sea por drogas o por cuestiones genéticas, lo que representaría un riesgo mucho mayor a la salud (Moreno-Arribas & Polo, 2008; Nalazek-Rudnicka & Wasik, 2017)

**Tabla 16.** Genes relacionados con la síntesis de AB y su cuantificación en la cerveza B12

BAL	GENES DE AB			Cuantificación de AB en cerveza B12 (mgL <sup>-1</sup> )	
	<i>tdc</i>	<i>odc</i>	<i>hdc</i>	Putrescina	Tiramina
B1	+	-	-	4.2	N.D
CL	-	+	+	4.2	N.D
PF	-	-	-	4.5	N.D
B3	-	-	-	4.3	N.D
B6	+	+	+	4.4	N.D
D1	+	+		8.6*	N.D
L1	+	+	+	8.6*	5.6*

\*Diferencia significativa (P<0.05)

La cuantificación de Tiramina en L1 final fue de 4.62, tomando en cuenta que sin inoculo de BAL presentaba 0.985 mgL<sup>-1</sup> de la amina.

N.D: No detectada

## 5. CONCLUSIONES

Los aislamientos de BAL de *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* mostraron diferentes capacidades de crecimiento en los diferentes estilos cerveceros de prueba. Las cervezas que fueron inoculadas con cepas de *Pediococcus* y *Leuconostoc* en su mayoría no se deterioraron (a excepción de las bebidas con un pH mayor 4.15 y con BU menor a 20), esto puede deberse a que estas cepas carecen de los principales genes relacionados con la resistencia al lúpulo (*horA* y *horC*) a diferencia de las dos cepas de *L. brevis* (L1 y D1) que presentaron los genes *horA* y *horC*, que incluso pudieron crecer en condiciones más ácidas y lupuladas, y en concentraciones de alcohol más altas, así como también presentaron concentraciones considerables de putrescina y tiramina, por lo que *L. brevis* llega a considerarse como una bacteria potencial en el deterioro de la cerveza.

Las cervecerías artesanales deben considerar estos hallazgos, especialmente en el control microbiológico, para evitar riesgos para la calidad y la salud del consumidor, pues una cerveza artesanal es más susceptible debido a que no se realizan procesos de filtrado y/o pasteurizado en su producción. Hasta donde se sabe, este es el primer informe sobre el monitoreo de BAL, desde dos puntos de vista, la calidad de la cerveza y la seguridad alimentaria.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, (2020). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y nutrición. España. [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/home/aecosan\\_inicio.htm](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/home/aecosan_inicio.htm)
- Almeida, C., Fernandes, J. O., & Cunha, S. C. (2012). A novel dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) gas chromatography-mass spectrometry (GC–MS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer. *Food Control*, 25(1), 380-388.
- Álvarez, M. A., & Moreno-Arribas, M. V. (2014). The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends in Food Science & Technology*, 39(2), 146-155.
- American Society of Brewing Chemists ASBC. (2008f). Beer-23A *Bitterness Units (BU)* (9na ed.). Saint Paul, Estados Unidos
- American Society of Brewing Chemists ASBC. (2008b). Beer-3 *Apparent extract* (9na ed.). Saint Paul, Estados Unidos
- American Society of Brewing Chemists ASBC. (2008e). Beer-1A *Preparation of sample for chemical and physical analysis* (9na ed.). Saint Paul, Estados Unidos
- American Society of Brewing Chemists ASBC. 2008c). Beer-8A *Total acidity by potentiometric titration* (9na ed.). Saint Paul, Estados Unidos
- Back, W. (1994). Secondary contaminations in the filling area. *Brauwelt Int.*, 12, 326-333.
- Barbieri, F., Montanari, C., Gardini, F., & Tabanelli, G. (2019). Biogenic amine production by lactic acid bacteria: a review. *Foods*, 8(1), 17.
- Bearson, S., Bearson, B., & Foster, J. W. (1997). Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS microbiology letters*, 147(2), 173-180.
- Behr, J., & Vogel, R. F. (2009). Mechanisms of hop inhibition: hop ionophores. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(14), 6074-6081.
- Bergsveinson, J., Baecker, N., Pittet, V., & Ziola, B. (2015). Role of plasmids in *Lactobacillus brevis* BSO 464 hop tolerance and beer spoilage. *Applied and environmental microbiology*, 81(4), 1234-1241.
- Bokulich, N. A., & Mills, D. A. (2012). Differentiation of mixed lactic acid bacteria communities in beverage fermentations using targeted terminal restriction fragment length polymorphism. *Food microbiology*, 31(1), 126-132.



- Boletín Oficial del Estado. (2016) Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta. Recuperado de <https://www.boe.es/boe/dias/2016/12/17/pdfs/BOE-A-2016-11952.pdf>
- Calles-Enríquez, M., Eriksen, B. H., Andersen, P. S., Rattray, F. P., Johansen, A. H., Fernández, M., ... & Alvarez, M. A. (2010). Sequencing and transcriptional analysis of the *Streptococcus thermophilus* histamine biosynthesis gene cluster: factors that affect differential *hdcA* expression. *Applied and environmental microbiology*, 76(18), 6231-6238.
- Cárdenas, H. A. R. (2003). Determinación de Parámetros Físico-Químicos para la Caracterización de Cerveza Tipo Lager Elaborada por Compañía Cervecería Kunstmann S.A. (Doctoral dissertation, Universidad Austral de Chile).
- Colignon, M. F., & Roldán, G. E. (2018). Automatización de proceso para elaboración de cerveza artesanal (tesis de pregrado) Universidad Tecnológica Nacional de Panama. <https://ria.utn.edu.ar/handle/20.500.12272/2873>
- Coton, E., & Coton, M. (2005). Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine-and tyramine-producing bacteria. *Journal of microbiological methods*, 63(3), 296-304.
- Coton, M., Romano, A., Spano, G., Ziegler, K., Vetrana, C., Desmarais, C., ... & Coton, E. (2010). Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiology*, 27(8), 1078-1085.
- De España, C. (2016). Informe socioeconómico del sector de la cerveza en España 2016.
- De México, C. (2018). Estado de la agroindustria cervecera en México 2018.
- Drider, D. (2016). *Bacterias ácido lácticas: fundamentos y aplicaciones* (No. 664.024 D779b). Alfaomega.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2011). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *Efsa Journal*, 9(10), 2393.
- Elsanhoty, R. M., & Ramadan, M. F. (2016). Genetic screening of biogenic amines production capacity from some lactic acid bacteria strains. *Food Control*, 68, 220-228.
- Garai, G., Duenas, M. T., Irastorza, A., & Moreno-Arribas, M. V. (2007). Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. *Letters in Applied Microbiology*, 45(5), 473-478.
- García García, J. H. (2017). Distribución de bacterias contaminantes de cerveza *Lactobacillus* y *pediococcus* en el ambiente de elaboración de cerveza (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., Taccari, M., Aquilanti, L., & Clementi, F. (2015). The occurrence of beer spoilage lactic acid bacteria in craft beer production. *Journal of food science*, 80(12), M2845-M2852.

- Giles-Gómez, M., García, J. G. S., Matus, V., Quintana, I. C., Bolívar, F., & Escalante, A. (2016). In vitro and in vivo probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque, a Mexican traditional alcoholic beverage. *SpringerPlus*, 5(1), 708.
- Gómez García, A. (2014). *Mejora y optimización del proceso de elaboración de la cerveza dentro de una industria cervecera* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).
- González, M. (2017). Principios de Elaboración de las Cervezas Artesanales. Recuperado de [http://www.vinodefruta.com/descargas/Libro\\_Principios\\_de\\_Elaboracion\\_de\\_Cervezas\\_Artesanales\\_Ebook.pdf](http://www.vinodefruta.com/descargas/Libro_Principios_de_Elaboracion_de_Cervezas_Artesanales_Ebook.pdf)
- Granchi, L. G., Talini, D., Rigacci, S., Guerrini, S., Berti, A., & Vicenzini, M. (2006). Detection of putrescine-producer *Oenococcus oeni* strains by PCR. In *8th Symposium on lactic acid bacteria, The Netherlands*.
- Haakensen, M., Schubert, A., & Ziola, B. (2008). Multiplex PCR for putative *Lactobacillus* and *Pediococcus* beer-spoilage genes and ability of gene presence to predict growth in beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 66(2), 63-70.
- Haakensen, M., Vickers, D. M., & Ziola, B. (2009). Susceptibility of *Pediococcus* isolates to antimicrobial compounds in relation to hop-resistance and beer-spoilage. *BMC microbiology*, 9(1), 190.
- Hill, A., y Priest, F. (2018). Microbiology and microbiological control in the brewery. En G. Stewart, I. Russell y A. Anstruther (Eds.), *Handbook of brewing* (3ra ed., pp. 530-545). Florida, Estados Unidos: CRC Press
- Hunter, R. A., & Dompkowski, E. J. (2018). Quantifying Beer Bitterness: An Investigation of the Impact of Sample Preparation. *Journal of Chemical Education*, 95(11), 2009-2012.
- Ingham, C. J., Beerthuyzen, M., & van Hylckama Vlieg, J. (2008). Population heterogeneity of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 microcolonies in response to and recovery from acid stress. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(24), 7750-7758.
- Kalac, P., & Krízek, M. (2003). A review of biogenic amines and polyamines in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 109(2), 123-128.
- Kalač, P., Šavel, J., Křížek, M., Pelikánová, T., & Prokopová, M. (2002). Biogenic amine formation in bottled beer. *Food Chemistry*, 79(4), 431-434.
- Karovičová, J., & Kohajdová, Z. (2005). Biogenic amines in food. *Chem. Pap*, 59(1), 70-79.
- Ladero, V., Fernández, M., Calles-Enríquez, M., Sánchez-Llana, E., Cañedo, E., Martín, M. C., & Alvarez, M. A. (2012). Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci?. *Food microbiology*, 30(1), 132-138.
- Linares, D. M., del Río, B., Ladero, V., Martínez, N., Fernández, M., Martín, M. C., & Álvarez, M. A. (2012). Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. *Frontiers in microbiology*, 3, 180.

- Loret, S., Deloyer, P., & Dandrifosse, G. (2005). Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: Data from Belgian samples. *Food Chemistry*, 89(4), 519-525.
- Lucas, P. M., Claisse, O., & Lonvaud-Funel, A. (2008). High frequency of histamine-producing bacteria in the enological environment and instability of the histidine decarboxylase production phenotype. *Applied and environmental microbiology*, 74(3), 811-817.
- Marcobal, A., de las Rivas, B., Moreno-Arribas, M. V., & Munoz, R. (2006). Evidence for horizontal gene transfer as origin of putrescine production in *Oenococcus oeni* RM83. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12), 7954-7958.
- Menz, G., Andrighetto, C., Lombardi, A., Corich, V., Aldred, P., & Vriesekoop, F. (2010). Isolation, identification, and characterisation of beer-spoilage lactic acid bacteria from microbrewed beer from Victoria, Australia. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(1), 14-22.
- Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F. J., Wagner, R. S., & Hutzler, M. (2016). Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 569-587.
- Ministro de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2018). Informe socioeconómico del sector de la cerveza en España 2018. España: Cerveceros. [https://cerveceros.org/uploads/5d1b32241b8be\\_\\_Informe%20SocioeconomicoCerveza\\_2018.pdf](https://cerveceros.org/uploads/5d1b32241b8be__Informe%20SocioeconomicoCerveza_2018.pdf)
- Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2008). Occurrence of lactic acid bacteria and biogenic amines in biologically aged wines. *Food microbiology*, 25(7), 875-881.
- Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C., Jorganes, F., & Muñoz, R. (2003). Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International journal of food microbiology*, 84(1), 117-123.
- Michael Mosher, M. M., & Kenneth Trantham, K. T. (2017). *Brewing science: A multidisciplinary approach*. Springer.
- Mosher, M. D., & Trantham, K. W. (2015). Introduction to Brewing Science Courses: Comparison of General Studies and Full Program Options. In *Ethanol and Education: Alcohol as a Theme for Teaching Chemistry* (pp. 55-67). American Chemical Society.
- Nalazek-Rudnicka, K., & Wasik, A. (2017). Development and validation of an LC–MS/MS method for the determination of biogenic amines in wines and beers. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 148(9), 1685-1696.
- Nannelli, F., Claisse, O., Gindreau, E., De Revel, G., Lonvaud-Funel, A., & Lucas, P. M. (2008). Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. *Letters in applied microbiology*, 47(6), 594-599.
- Palomo, F. J. G. (2005). Control de calidad en biobancos. *Carcinogenesis*, 26(5), 867-874.

- Pérez, K. (2019). Desarrollo de una herramienta para la calificación de la susceptibilidad a la contaminación microbiana en cervezas artesanales (tesis de master). Universidad Autónoma de Madrid, España.
- Poveda, J. M. (2019). Biogenic amines and free amino acids in craft beers from the Spanish market: A statistical approach. *Food control*, 96, 227-233.
- Poveda, J. M., Ruiz, P., Sesena, S., & Palop, M. L. (2017). Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria during a craft brewing process. *LWT-Food Science and Technology*, 85, 129-136.
- Ramírez, J., Rosas, U., Velazquez, G., Ulloa, J., & Arce, R. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. CONACYT.
- Río Lagar, B. D., Díaz, M., Pérez, M., Redruello, B., Linares, D. M., Ladero Losada, V. M., ... & Álvarez González, M. Á. (2018). Aminas biógenas: El lado oscuro de las bacterias lácticas.
- Rodhouse, L., & Carbonero, F. (2019). Overview of craft brewing specificities and potentially associated microbiota. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(3), 462-473.
- Rodríguez, J. M. P., & Muñoz, S. S. G. (2000). Efectos biológicos y productivos de los ionóforos en rumiantes. *Interciencia*, 25(8), 379-385.
- Ruiz, P., Celada, L., Seseña, S., & Palop, M. L. (2018). *Leuconostoc mesenteroides* in the brewing process: A controversial role. *Food Control*, 90, 415-421.
- Sami, M., Yamashita, H., Hirono, T., Kadokura, H., Kitamoto, K., Yoda, K., & Yamasaki, M. (1997). Hop-resistant *Lactobacillus brevis* contains a novel plasmid harboring a multidrug resistance-like gene. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(1), 1-6.
- Sakamoto, K., & Konings, W. N. (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International journal of food microbiology*, 89(2-3), 105-124.
- Schneiderbanger, J., Grammer, M., Jacob, F., & Hutzler, M. (2018). Statistical evaluation of beer spoilage bacteria by real-time PCR analyses from 2010 to 2016. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(2), 173-181.
- SCIMAT. (2019). *Leuconostoc lactis*. Recuperado de <https://www.sciencesource.com/archive/Leuconostoc-lactis-SS2108401.html>
- Sheahan, T. (2016). *Pediococcus* | Friend and Foe. Recuperado de <https://www.brewersjournal.info/pediococcus-friend-and-foe/>
- Simpson, W. J. (1993). Ionophoric action of trans-isohumulone on *Lactobacillus brevis*. *Microbiology*, 139(5), 1041-1045.
- Spedding, G. (2016). *Brewing materials and processes: a practical approach to beer excellence*. Lexington, Estados Unidos; Elsevier.
- Suarez, M. (2013) *Cerveza: componentes y propiedades*. Universidad de Oviedo. Oviedo, España. [http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/19093/8/TFM\\_%20Maria%20Suarez%20Diaz.pdf](http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/19093/8/TFM_%20Maria%20Suarez%20Diaz.pdf)

- Suzuki, K. (2011). 125th anniversary review: microbiological instability of beer caused by spoilage bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(2), 131-155.
- Suzuki, K. (2015). Gram-positive spoilage bacteria in brewing. *Brewing microbiology*, 141-173.
- Suzuki, K., Asano, S., Iijima, K., & Kitamoto, K. (2008). Sake and beer spoilage lactic acid bacteria—a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 114(3), 209-223.
- Suzuki, K., Iijima, K., Sakamoto, K., Sami, M., & Yamashita, H. (2006). A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, 112(2), 173-191.
- Suzuki, K., Ozaki, K., & Yamashita, H. (2004). Comparative analysis of conserved genetic markers and adjacent DNA regions identified in beer-spoilage lactic acid bacteria. *Letters in applied microbiology*, 39(3), 240-245.

## 7. ANEXOS

### Anexo 1. Tabla de medición del crecimiento de BAL en cerveza por espectrofotometría.

BAL	L1			B3			D1			B6		
CC	ADO	% CV	MRS	ADO	% CV	MRS	ADO	% CV	MRS	ADO	% CV	MRS
B1	0.266	1.864	-	0.097	1.458	-	0.332	3.834	-	0.076	7.443	-
B2	0.226	2.195	-	0.084	3.367	-	0.260	1.088	-	0.087	8.128	-
B3	0.097	5.129	-	<b>0.022</b>	9.867	S/C	<b>0.047</b>	4.562	C	<b>0.016</b>	13.686	S/C
B4	0.250	4.320	-	<b>0.045</b>	9.428	S/C	0.239	1.775	-	<b>0.036</b>	333.912	S/C
B5	0.212	3.335	-	<b>0.015</b>	9.428	S/C	0.108	1.973	-	<b>0.015</b>	9.428	S/C
B6	0.260	6.290	-	<b>0.012</b>	23.570	S/C	0.112	10.781	-	<b>0.001</b>	1838.478	S/C
B7	0.209	2.030	-	<b>0.004</b>	262.640	S/C	0.110	2.571	-	<b>-0.004</b>	-35.355	S/C
B8	0.121	2.934	-	<b>-0.006</b>	-47.140	S/C	0.117	1.821	-	<b>-0.006</b>	-47.140	S/C
B9	0.147	3.379	-	<b>0.014</b>	5.238	S/C	0.153	9.737	-	<b>0.004</b>	20.203	S/C
B10	0.167	0.847	-	<b>0.011</b>	0.000	S/C	0.169	1.259	-	<b>0.011</b>	0.000	S/C
B11	<b>0.010</b>	28.280	S/C	<b>-0.004</b>	-20.203	S/C	<b>0.007</b>	65.997	S/C	<b>-0.004</b>	-20.203	S/C

CC: código de cerveza; %CV: coeficiente de variación; ADO: promedio de  $\Delta DO_{590nm}$ ; MRS: Siembra en placas con MRS de aquellas muestras que presentaban un  $\Delta DO_{590nm} \leq 0.05$ ; C: crecimiento en placa; S/C: sin crecimiento en placa.

BAL	B1			CL			PF		
CC	ADO	% CV	MRS	ADO	% CV	MRS	ADO	% CV	MRS
B1	0.077	1.837	C	0.205	4.829	-	0.201	3.174	-
B2	0.072	3.928	C	0.091	0.781	S/C	0.184	1.537	-
B3	<b>0.052</b>	2.842	S/C	<b>0.021</b>	65.537	-	<b>0.013</b>	5.657	S/C
B4	<b>0.049</b>	5.772	S/C	0.111	101.925*	C	<b>0.039</b>	3.626	S/C
B5	<b>0.036</b>	45.813	S/C	<b>0.023</b>	3.143	S/C	<b>0.025</b>	5.657	S/C
B6	<b>-0.021</b>	-37.942	S/C	0.119	4.754	-	<b>0.015</b>	4.877	S/C
B7	<b>0.007</b>	47.140	S/C	0.141	4.530	-	<b>0.013</b>	32.636	S/C
B8	<b>0.015</b>	47.140	S/C	0.090	7.111	-	<b>0.019</b>	26.755	S/C
B9	<b>-0.008</b>	-70.711	S/C	<b>0.007</b>	20.203	S/C	<b>0.018</b>	7.857	S/C
B10	<b>0.019</b>	3.822	S/C	<b>0.014</b>	5.238	S/C	<b>0.013</b>	16.971	S/C
B11	<b>-0.016</b>	-13.686	S/C	<b>0.003</b>	28.284	S/C	<b>0.005</b>	47.140	S/C

CC: código de cerveza; %CV: coeficiente de variación; ADO: promedio de  $\Delta DO_{590nm}$ ; MRS: Siembra en placas con MRS de aquellas muestras que presentaban un  $\Delta DO_{590nm} \leq 0.05$ ; C: crecimiento en placa; S/C: sin crecimiento en placa.

\*Se comprobó el crecimiento de CL en la cerveza B4 en agar MRS, ya que obtuvo un coeficiente de variación de 101.925.

## Anexo 2.

La investigación que se realizó en el presente trabajo se publicó en la Revista de Divulgación Científica en Nutrición Ambiental y Seguridad Alimentaria (REDICINAYSA) de la Universidad de Guanajuato, llevando por nombre “Bacterias ácido-lácticas que deterioran la cerveza “ en formato electrónico en el bimestre Julio-Agosto-2020 (<https://www.ugto.mx/redicinaysa/images/publicaciones/2020/REDICINAYSA-VOL-9-NO-4-JULIO-AGOSTO-2020V2.pdf>). Donde el propósito de dicha revista con el propio va de la mano, pues funge como un foro de vinculación entre la población y los investigadores, con una estrategia en que todo conocimiento generado pueda ser compartido y transmitido al público en general, de manera que se contribuya a una sociedad informada en temas prioritarios de salud pública en salud, nutrición, alimentación y ambiente.

### 5. INVESTIGACIÓN Y CIENCIA

#### BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS QUE DETERIORAN LA CERVEZA

Karla Jiménez Morata<sup>1</sup>, Maritère Domínguez Rojas<sup>2\*</sup>, Magaly Rodríguez Saavedra<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pasante de la Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

<sup>2</sup>Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, UNAM, Av. Primero de Mayo 5/N, Santa María Guadalupe las Torres, 54740 Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México

<sup>3</sup>Investigadora del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Alimentación (CIAL-UAM-CSIC) en el departamento de Biotecnología y Microbiología de los Alimentos.

Contacto: [maridomin@gmail.com](mailto:maridomin@gmail.com); [maritere.dominguez@cuautitlan.unam.mx](mailto:maritere.dominguez@cuautitlan.unam.mx)

**Palabras clave:** cerveza, bacterias ácido-lácticas, *HorA*, *HorC* y aminas biógenas

#### Introducción

Las bebidas se toman para calmar la sed o por placer, proporcionan agua al cuerpo, refrescan y alimentan, la cerveza se considera una bebida estable microbiológicamente debido a la presencia de etanol (0.5-14 % v/v), presencia de sustancia amargas procedentes del lúpulo, valores de pH bajos y concentraciones reducidas de oxígeno, sin embargo, hay un grupo pequeño de bacterias alterantes resistentes a estas condiciones, siendo las bacterias ácido-lácticas (BAL) los microorganismos más comunes que pueden llegar a producir turbidez, olores y sabores desagradables trayendo consigo importantes pérdidas económicas para la industria cervecera.

Las cervezas artesanas son más susceptibles a las contaminaciones microbianas por no incluir en su elaboración los procesos de filtración ni pasteurización, como sí se realiza en las cervecerías industriales.

Desde el punto de vista de seguridad alimentaria, otro aspecto para tener en cuenta relacionado con BAL es la posible producción de aminas biógenas (AB). Donde una ingesta de altas concentraciones de AB puede inducir a reacciones adversas, tales como náuseas, dolores de cabeza, erupciones cutáneas, cambios en la presión sanguínea, etc.

Por lo expuesto, el siguiente artículo expone el crecimiento de las BAL en diferentes estilos cerveceros artesanales, así como su capacidad de producción de AB, tal proyecto se realizó en el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Alimentación (CIAL) en Madrid, España.

#### La cerveza artesanal

El Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre (BOE 17 de diciembre de 2016), define como cerveza al alimento resultante de la fermentación, mediante levaduras seleccionadas, de un mosto cervecero elaborado a partir de materias primas naturales

(4). La cerveza artesanal se diferencia de otras bebidas de malta por su fabricación ya que se realiza una segunda fermentación en botella y por lo general no contempla filtración ni pasteurización, además el uso de ingredientes no convencionales ricos en almidón agregados para obtener un aroma y sabor únicos en la cerveza, como frutas, hierbas, miel, especias y verduras, aumentan el riesgo de deterioro.

#### Características físico-químicas de la cerveza que la hacen estable microbiológicamente

La estabilidad microbiológica de la cerveza se debe principalmente al pH bajo que facilita la entrada de ácidos orgánicos débiles en las células, ocasionando acidificación intracelular, destrucción de sistemas enzimáticos y la reducción en la absorción de los nutrientes. Otro factor es la presencia de ácidos amargos del lúpulo (como los  $\alpha$ -isoácidos) que actúan como ionóforos (moléculas hidrófobas capaces de transportar iones y cationes como  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  a través de la membrana celular de procariontes y eucariontes) e inhiben el crecimiento de las bacterias sensibles al lúpulo, ya que intervienen en la generación de energía (ATP), así como en el transporte de nutrientes. El contenido de etanol causa daño a la membrana celular de las bacterias interfiriendo con el metabolismo que acaba con una lisis celular. El alto contenido de  $CO_2$  que llega a modificar la membrana celular, inactivación enzimática, desequilibrio de electrolitos intracelulares, y por último la presencia de sólo trazas de azúcares fermentables hacen que sea un ambiente hostil, donde solo pocos organismos pueden sobrevivir y desarrollarse.

#### Principales microorganismos contaminantes de la cerveza

El número de especies que se pueden encontrar en la cerveza es relativamente pequeño, estudios previos documentan que el 70% de las contaminaciones son ocasionadas por BAL, principalmente los géneros *Lactobacillus*, *Pedococcus* y *Leuconostoc*.

#### Genes de resistencia al lúpulo presentes en BAL

Las BAL contaminantes de cerveza tienen algunas características en común, como la resistencia a los  $\alpha$ -isoácidos del lúpulo, la cual está dada por elementos genéticos como los transportadores multidrogas *horA*, *horC*, y los transportadores de cationes *hltA* y *ORFS*, los cuales se encuentran comúnmente en plásmidos (moléculas de material genético (ADN) que se replican independientes del cromosoma bacteriano). Presumiblemente las actividades de *HorA* y *HorC* provocan una entrada reducida de los ácidos amargos del lúpulo no disociados y permeables a la membrana citoplasmática y, por lo tanto, limitan el efecto antibacteriano de los compuestos derivados del lúpulo. En cuanto al gen *hltA* se ha propuesto que funciona como un mediador de la resistencia al lúpulo ya que juega un rol en captar cationes divalentes como el  $Mn^{2+}$ , el cual es importante para muchas proteínas que son dependientes de  $Mn^{2+}$ , las cuales están involucradas en la generación de energía y la homeostasis redox que es esencial para la salud normal y la supervivencia de la célula.

#### Producción de aminas biógenas en cerveza

Las aminas biógenas son compuestos orgánicos de bajo peso molecular producidos mayoritariamente por la descarboxilación (Reacción química en la cual ocurre la

eliminación del grupo carboxilo del ácido carboxílico) de ciertos aminoácidos por acción bacteriana. Las principales bacterias productoras de AB en alimentos fermentados son las BAL (9), que, a través de enzimas descarboxilas los aminoácidos precursores produciendo la AB correspondiente. En estudios previos, se han identificado alrededor de seis AB presentes en botellas de cerveza listas para su comercialización o en el punto de venta (tiramina, histamina, putrescina, cadaverina, agmatina y espermidina), siendo su origen principalmente de dos fuentes: por un lado, se pueden producir por la acción descarboxilasa de los microorganismos, y la otra es que, las AB pueden encontrarse naturalmente en las materias primas, principalmente en la malta.

Dado que las AB pueden actuar como agentes vasoactivos, su presencia de altas cantidades de AB en los alimentos fermentados puede ser contraproducente para la salud, además el etanol presente en la cerveza inhibe la monoaminoxidasa, que es la enzima necesaria para la eliminación de AB, de modo que, cuando se realiza un consumo elevado de cerveza en poco tiempo, puede producir una ingesta de AB que puede llegar a causar posibles efectos tóxicos a la persona.

Resultados del proyecto realizado para estudiar la capacidad alterante de BAL y su producción de AB en cerveza artesana



Figura 1. Muestras de cervezas utilizadas, atemperadas y descarboxinadas

Para el proyecto se seleccionaron seis microorganismos de cepas de BAL: *Lactobacillus brevis* (CIAL-BL1 y CIAL-BD1), *L. plantarum* (CIAL-BF1), *L. paracasei* (CIAL-B6), *Leuconostoc mesenteroides* (CIAL-B3) y *Pedococcus acidilactici* (CIAL-PF) que se adaptaron de forma secuencial en medios líquidos similares a la cerveza para posteriormente ser inoculadas en once tipos de cervezas artesanales que se observan en la Figura 2. Los aislamientos de BAL de *Lactobacillus*, *Pedococcus* y *Leuconostoc* mostraron diferentes capacidades de crecimiento en los diferentes estilos cerveceros de prueba que se muestran en la Figura 3. Las cervezas que fueron inoculadas con cepas de *Pedococcus* y *Leuconostoc* en su mayoría no se deterioraron (a excepción de las bebidas con un pH mayor 4.15 y con Unidades de amargor menores a 20), esto puede deberse a que estas cepas carecen de los principales genes relacionados con la resistencia al lúpulo (*hcrA* y *hcrC*). A diferencia de los dos aislamientos de *L. brevis* (CIAL-BL1 y CIAL-BD1) que presentaron los genes *hcrA* y *hcrC*, que incluso pudieron crecer en condiciones más ácidas y lupuladas, y en concentraciones de alcohol más altas pudiendo estropear el 90.9 % de las cervezas probadas.

BAL	GENES DE AB			Cuantificación de AB en cerveza B1 (mg L <sup>-1</sup> )	
	sr	odr	sr	Putrescina	Tiramina
B1	+	-	-	4.2	ND
CL	-	+	+	4.2	ND
PF	-	-	-	4.5	ND
B3	-	-	-	4.3	ND
B6	+	+	+	4.4	ND
D1	+	+	-	8.6*	ND
L1	+	+	+	8.6*	5.0*

Figura 4. Tabla de genes relacionados con la síntesis de AB y su cuantificación en cerveza.

#### Conclusiones

Es importante que se garantice que las personas gocen de seguridad al consumir una cerveza, esto desde el punto de vista de la inocuidad. Por lo que las cervecerías artesanales que son las más susceptibles a la contaminación deben considerar estos hallazgos, especialmente en el control microbiológico, para evitar riesgos en la calidad y la salud del consumidor, pues se sabe que a menudo carecen de los beneficios de un laboratorio microbiológico con los recursos necesarios para un monitoreo constante, por lo que les sería conveniente adoptar medidas sanitarias que favorezcan la producción de bebidas inocuas, para ello es esencial la propagación de información científica, hasta donde se sabe, este es el primer informe sobre el monitoreo de BAL, desde dos puntos de vista, la calidad de la cerveza y la seguridad alimentaria.

La investigación, así como la difusión de información relacionada con los microorganismos con capacidad deteriorante específicamente en cerveza es poca, sin embargo, necesaria, ya que en los últimos años su popularidad se ha ido acrecentando en especial las artesanales.

#### Referencias:

- Suzuki K, et al. A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. *Journal of the Institute of Brewing* 2006; 112 (2): 173-191.
- Poveda J, et al. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria during a craft brewing process. *LWT-Food Science and Technology*, 2017; 85: 129-136.
- Poveda J, et al. Biogenic amines and free amino acids in craft beers from the Spanish market: A statistical approach. *Food Control*, 2019; 96: 227-233.
- Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba la Norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta. *Boletín Oficial del Estado*. 2016. URL disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2016/12/17/pdf/BOE-A-2016-11992.pdf>

En cuanto a la producción de AB las cepas L1 y D1 presentaron concentraciones considerables de putrescina y tiramina como se observa en la Figura 4. Por lo que *L. brevis* llega a considerarse como una bacteria potencial en la descomposición de cerveza, por ello se debe prestar más atención en los procesos de limpieza e higiene de las cervecerías artesanales para evitar riesgos en la calidad y la salud del consumidor.

Cerveza	Código de la cerveza	pH	% ABV	BU	% YFE
Castaño	B1	4.50 ± 0.01	4.5 ± 0.04	1320.22	0.96 ± 0.01
Palo Alto M	B2	4.32 ± 0.01	5.2 ± 0.06	1840.57	0.96 ± 0.02
San Miguel	B3	4.15 ± 0.01	0.04 ± 0.01	1340.28	1.93 ± 0.01
Misena	B4	4.49 ± 0.01	4.8 ± 0.05	1960.35	0.72 ± 0.06
Viejo Madrid	B5	4.63 ± 0.01	4.9 ± 0.02	1740.35	0.29 ± 0.02
Scott	B6	4.46 ± 0.01	7.9 ± 0.08	1640.35	2.85 ± 0.06
Tingo	B7	4.22 ± 0.01	4.2 ± 0.07	1220.57	1.49 ± 0.04
Rubia	B8	4.68 ± 0.01	4.5 ± 0.09	1890.28	0.69 ± 0.03
IPA Ader 5.1	B9	4.44 ± 0.01	5.1 ± 0.10	1340.35	2.24 ± 0.06
Sagardí IPA	B10	4.82 ± 0.01	6.8 ± 0.11	2120.35	0.32 ± 0.02
Siva	B11	3.42 ± 0.01	6.5 ± 0.14	290.57	1.63 ± 0.08

ABV: alcohol por volumen; BU: unidades de amargor; YFE: extracto fermentable por levadura

Figura 2. Características físico-químicas (media ± desviación estándar) de las cervezas utilizadas en la evaluación de la capacidad de deterioro de la cerveza por los aislamientos de BAL.

Bacteria asociada	Cerveza deteriorada	Resistencia al lúpulo					
		genes hcrA	hcrC	hcrC'	hcrC''	hcrC'''	(hcrC''')
CIAL-B1	B1 y B2	+	-	-	-	-	-
	B1, B2, B3, B6, B7	+	-	-	-	-	-
CIAL-BF1	y B8	+	-	-	-	-	-
CIAL-PF	B1 y B2	+	-	-	-	-	-
CIAL-B3	B1 y B2	+	-	-	-	-	-
CIAL-B6	B1 y B2	+	-	-	-	-	-
CIAL-BD1	Todas excepto B11	+	+	+	+	+	+
	Todas excepto B11	+	+	+	+	+	+
CIAL-BL1	B11	+	+	+	+	+	+

Figura 3. Tabla de la capacidad de deterioro de las BAL a la cerveza y genes que confieren resistencia al lúpulo.

- Menz G, et al. Isolation, identification, and characterisation of beer-spoilage lactic acid bacteria from microbrewed beer from Victoria, Australia. *Journal of the Institute of Brewing*, 2010; 116(1): 14-22.
- Suzuki K, et al. 125th anniversary review: microbiological instability of beer caused by spoilage bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, 2011; 117(2): 131-155.
- Behr J, et al. Mechanisms of hop inhibition: hop ionophores. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2009; 57(14): 6074-6081.
- Garofalo C, et al. The occurrence of beer spoilage lactic acid bacteria in craft beer production. *Journal of food science*, 2015; 80(12): M2845-M2852.
- Barbieri F, et al. Biogenic amine production by lactic acid bacteria: a review. *Food*, 2019; 8(1): 1-17.
- Lucas P, et al. High frequency of histamine-producing bacteria in the enological environment and instability of the histidine decarboxylase production phenotype. *Applied and environmental microbiology*, 2008; 74(3): 811-817.



### Anexo 3.

El presente trabajo de investigación también formo parte del 4to. Simposio Iberoamericano “Los AGEs y la Salud”, celebrado de forma virtual los días 5 y 6 de noviembre de 2020, con el título “Bacterias lácticas: evaluación de la producción de aminas biógenas y su crecimiento en cerveza.

