

# CONTROL MICROBIOLÓGICO DURANTE EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA CERVEZA



TRABAJO DE FIN DE GRADO

JOSÉ JAVIER DUARTE CHACÓN

JULIO DE 2022

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE FARMACIA





**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**



**FACULTAD DE FARMACIA**



**TRABAJO DE FIN DE GRADO**

**CONTROL MICROBIOLÓGICO DURANTE EL PROCESO DE  
ELABORACIÓN DE LA CERVEZA**

**GRADO EN FARMACIA**

**AUTOR: JOSÉ JAVIER DUARTE CHACÓN**

**TUTOR: ELOISA PAJUELO DOMINGUEZ**

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**SEVILLA, JULIO DEL 2022**

**TRABAJO DE REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>PÁG. 2</b>
<b>2. PALABRAS CLAVE</b> .....	<b>PÁG. 2</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>PÁGS. 3-10</b>
3.1. HISTORIA DE LA CERVEZA .....	PÁGS. 3-5
3.2. CONCEPTO DE CERVEZA .....	PÁG. 6
3.3. VALOR NUTRICIONAL DE LA CERVEZA .....	PÁGS. 6-7
3.4. DATOS DE PRODUCCIÓN .....	PÁGS. 7-8
3.5. DATOS DE CONSUMO .....	PÁG. 9
3.6. CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DURANTE LA ELABORACIÓN .....	PÁGS. 9-10
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>PÁG. 10</b>
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	<b>PÁG. 10</b>
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>PÁGS. 10-31</b>
6.1. INGREDIENTES DE LA CERVEZA .....	PÁGS. 10-15
6.1.1. FUENTE DE ALMIDÓN .....	PÁGS. 11-12
6.1.2. LÚPULO .....	PÁGS. 12-13
6.1.3. AGUA .....	PÁGS. 13-14
6.1.4. LEVADURA .....	PÁGS. 14-15
6.2. PROCESO DE ELABORACIÓN .....	PÁGS. 15-16
6.3. CONTAMINANTES DURANTE EL PROCESO DE ELABORACIÓN .....	PÁGS. 17-28
6.3.1. BACTERIAS CONTAMINANTES .....	PÁGS. 19-26
6.3.2. HONGOS CONTAMINANTES .....	PÁGS. 27-28
6.3.3. PROTOZOOS CONTAMINANTES .....	PÁG. 28
6.4. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DURANTE EL PROCESO DE ELABORACIÓN .....	PÁGS. 28-31
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>PÁG. 32</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>PÁGS. 32-37</b>

## 1.RESUMEN

La cerveza es un alimento que se comenzó a producir varios siglos antes de Cristo y que, hasta día de hoy, ha sido de gran importancia para el ser humano, ya sea por ser más segura de beber que el agua en ciertas épocas, o por el papel que desempeña en estos tiempos tanto en el mercado internacional como para los consumidores. Aunque los ingredientes básicos son agua, lúpulo, malta de cebada y levadura, actualmente existen muchos tipos de cerveza creados a partir de diferentes materias primas. Este alimento siempre ha sido considerado seguro para la salud por sus características. Sin embargo, puede llegar a contaminarse por microorganismos y puede ser nocivo. Los microorganismos causantes del deterioro de la cerveza pueden ser hongos y levaduras, bacterias (tanto Gram positivas como Gram negativas) e incluso protozoos, pero los más destacados de entre todos ellos son las bacterias ácido-lácticas, dando especial importancia al género *Lactobacillus*. Aun así, no hay que dejar de lado la importancia que tienen otros géneros de bacterias ácido-lácticas, como *Pediococcus*, y no pertenecientes a este grupo, como son los géneros *Pectinatus*, *Megasphaera* o las bacterias ácido-acéticas. Incluso se debe dar importancia a otro tipo de microorganismos como son las levaduras salvajes. Hasta el día de hoy, se ha buscado identificar si estos microorganismos se hallaban en la cerveza durante la producción de la misma para que no se produzcan pérdidas económicas y de tiempo durante el proceso. Para ello existen principalmente dos grupos de pruebas, unas basadas en el cultivo de microorganismos (las más usadas por su facilidad), y otras basadas en la biología molecular, las cuales están en alza en los tiempos que corren, particularmente los estudios metagenómicos basados en los nuevos métodos de secuenciación de nueva generación (NGS o New Generation Sequencing).

**2.PALABRAS CLAVE:** Brewing; Beer spoilage; Beer microbiology; Lactic acid bacteria; Microbial spoilage detection.

### **3.INTRODUCCIÓN**

#### **3.1.HISTORIA DE LA CERVEZA**

La Historia del ser humano ha estado marcada desde hace mucho por los alimentos obtenidos por procesos fermentativos llevados a cabo por levaduras. Alimentos como el pan datan del 4000 a.C., siendo elaborados por la civilización egipcia. Además, en el Antiguo Testamento de la Biblia, datado alrededor del 1000 a.C., se encuentra descrita la obtención de vino por fermentación de las uvas. Otros alimentos como el vinagre, el yogur y el queso, todos obtenidos por fermentaciones en las que intervienen levaduras, se crearon por procedimientos artesanales provenientes de tiempos antiguos (Acevedo-Díaz et al., 2016).

Otro de estos alimentos es la cerveza. Algunos autores datan el comienzo de la elaboración de la cerveza en el período Neolítico, durante la era la antigua Mesopotamia, aproximadamente con el comienzo de la civilización sumeria, sobre los siglos IV-V A.C (Acevedo-Díaz et al., 2016). Sin embargo, otros autores sostienen que no está tan claro que la cerveza surgiera en dicha civilización, sino que piensan que podría haber surgido en un sitio y luego extenderse hacia el resto de las civilizaciones, o bien que diferentes civilizaciones podrían haber descubierto los métodos para elaborar cerveza de forma independiente. Esto se debe a que, en todo el mundo, se han encontrado predecesores de lo que hoy conocemos como cerveza (Nelson, 2005), nombrados como tal porque se usaba la fermentación de vegetales muy diversos (Abbott, 2018).

En la época de la Europa precristiana, la cerveza se consideraba un regalo de los dioses. Esto se debe a que no conocían las levaduras, ya que no se pueden ver a simple vista, pero había “algo” que transformaba el mosto dulce en una bebida alcohólica. Además, esta idea se reforzaba con el hecho de que, si un productor de cerveza no guardaba un poco del lote anterior (que ya contenía la levadura), dejaba el mosto en una zona abierta y, como por arte de magia, el mosto se acababa transformando en cerveza porque las levaduras presentes en el ambiente caían al mosto y realizaban la fermentación (Abbott, 2018).

No se preserva mucha información escrita sobre la elaboración de la cerveza de antes del período de la antigua Roma debido a que muchos no sabían leer ni escribir y a que era una tarea doméstica, por lo que se transmitía por generaciones, siendo innecesario escribirlo (Abbott, 2018). Sin embargo, hay indicios de que en la antigua Grecia y en la antigua Roma se consumía cerveza, sobre todo en las clases bajas, ya que las altas tendían a beber vino. La cerveza era

considerada una bebida de bárbaros porque los germánicos y los celtas la consumían (Cabras, 2016).

A partir de esta época comenzó a haber más información, y gracias a esto y a otros descubrimientos botánicos, podemos saber que, desde el período romano hasta alrededor del siglo VII, la cerveza se fabricaba a pequeña escala y de forma doméstica, siendo sobre todo las mujeres las principales elaboradoras. Posteriormente se introdujo a la producción por fincas, aumentando la cantidad de cerveza producida, pero elaborada de la misma forma que la doméstica. El volumen de cerveza producida variaba según la finca para satisfacer las necesidades de los trabajadores y miembros de ésta. Sin embargo, la producción doméstica no desapareció (Weiss Adamson, 2004).

Alrededor del siglo VIII-IX, los monjes del norte de Europa (Islas Británicas, Alemania, Escandinavia y los Países Bajos) comenzaron a elaborar cerveza en los monasterios para su propio consumo y para el consumo de campesinos y peregrinos, debido a que el agua casi siempre estaba contaminada y era más sano y seguro beber cerveza. Además, en estos países las condiciones y el clima frío no eran idóneas para el crecimiento de las uvas, pero sí favorecían el crecimiento de la cebada (Cabra, 2016). Los monjes tuvieron que dedicar bastante tiempo a elaborar cerveza, ya que buscaban cubrir una alta demanda. Por ello, muchas abadías se transformaron en los sitios principales y más especializados en la producción y comercio de cerveza (Weiss Adamson, 2004). Posteriormente comenzaron a producir cerveza también para la alta sociedad, vendiéndola en los llamados “monastery pubs” (Cabra, 2016).

En este punto de la Historia de la cerveza, es importante realizar una distinción entre “Ale” y “Beer”. La diferencia entre ambas radica en que la “Ale” no empleaba el lúpulo como aditivo en su fabricación, por lo que era más dulce y tenía un menor tiempo de almacenaje. El término “Beer” (derivado del latín *Bibere*, que significa “para beber”) surgió cuando el lúpulo fue introducido en el proceso de elaboración de la cerveza. Aunque algunos autores indican que fue introducido por monjes del norte de Italia sobre el siglo VI o VII (Weiss Adamson, 2004), otros indican que fueron monjes germánicos (Cabra, 2016), y otros dictan que tanto monjes como elaboradores artesanales lo usaban mucho antes del comienzo de la edad media, pero el primer escrito que muestra este uso del lúpulo data del 768 en el monasterio de Saint-Denis, Francia. Aunque la “Ale” tenía una caducidad mucho más temprana que “Beer”, hasta el siglo VIII se prefería elaborar ale en la mayoría de las casas europeas. Esta diferencia es histórica y se

propuso para acabar con las confusiones generadas debido al uso indiscriminado de ambos términos en documentos históricos. No se debe confundir con las definiciones actuales de ambos términos (Abbott, 2018).

La elaboración de cerveza fabricada con lúpulo se fue extendiendo, especialmente por el territorio que ocupan hoy en día Bélgica y Holanda. Desde el siglo VIII hasta el siglo XIV, la demanda de cerveza no paró de aumentar. Por ello, a partir del siglo XIV, la producción de cerveza pasó a ser un negocio rentable. Debido a esto y al desarrollo tecnológico, económico y social, se incrementó la escala de la producción y surgieron más tabernas y cervecerías. Esto produjo que la producción doméstica disminuyera (Abbott, 2018).

Debido al crecimiento de la producción de cerveza y a casos de adulteración, se comenzó a regular su elaboración y venta. Además, por la especialización, en Europa se reconoció como profesión el ser elaborador de cerveza. Sin embargo, aunque la cerveza era conocida en Inglaterra antes del año 1300, no fue aceptada hasta el 1500 porque los fabricantes de “Ale” se oponían debido al temor de que surgiera una nueva bebida más duradera y barata (Abbott, 2018).

En el siglo XIX, con el desarrollo de la tecnología, el descubrimiento de la pasteurización y el uso de la refrigeración, se pudo controlar mejor el proceso de elaboración de la cerveza para crear cervezas estandarizadas que tuviesen las mismas características, y además se pudieron elaborar a gran escala. Todo esto sumado a la mejora de las vías de transporte y a un buen empaquetado, hizo que la cerveza se extendiera globalmente como un producto importante, aumentando su importancia en los mercados (Fig. 1) (Cabra, 2016).



Figura 1. Línea del tiempo de la Historia de la cerveza. Elaborada por el autor.

Aunque actualmente las cervecerías industriales son las principales, desde aproximadamente el 2015 se muestra una tendencia positiva hacia la creación de cervecerías artesanales, observando, por ejemplo, en los Estados Unidos, un aumento del 16,7% en el número de este tipo de cervecerías en el paso del año 2015 al 2016 (Rodhouse y Carbonero, 2017).

### **3.2.CONCEPTO DE CERVEZA**

Debemos distinguir entre qué se entiende por cerveza actualmente frente a lo que significaba antes del siglo VII. En la actualidad, tal y como sostiene la legislación española, la cerveza se define como “alimento resultante de la fermentación, mediante levaduras seleccionadas, de un mosto cervecero elaborado a partir de materias primas naturales” (Ministerio de la Presidencia y para las Administraciones Territoriales, 2016), siendo estas materias primas naturales la malta de cebada, el lúpulo, el agua y diferentes cepas de levaduras del género *Saccharomyces* (Pereira de Moura et al., 2018). Sin embargo, antiguamente, el término cerveza fue usado para nombrar una gran variedad de bebidas alcohólicas obtenidas por fermentación de diferentes frutas y cereales (Poelmans et al., 2012).

### **3.3.VALOR NUTRICIONAL DE LA CERVEZA**

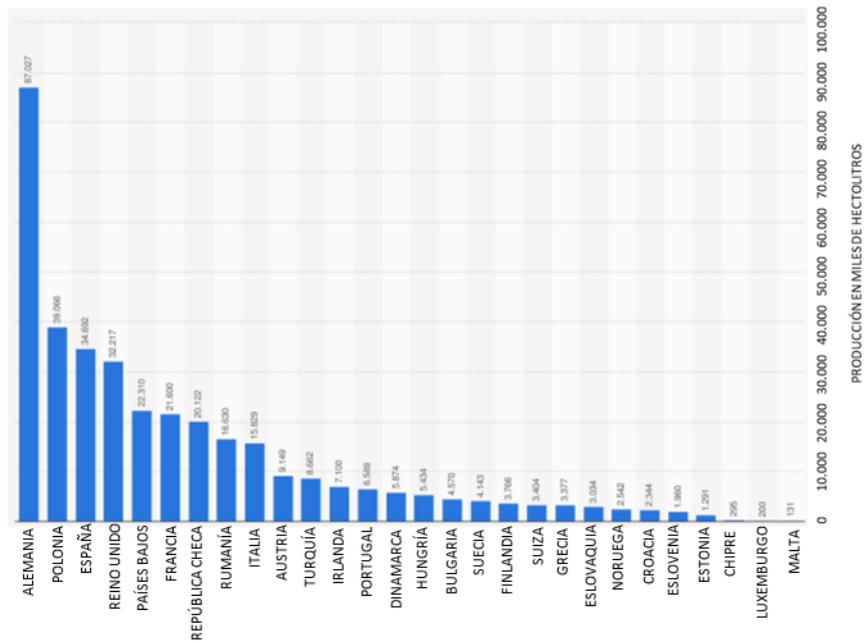
Al ser un alimento, tiene un valor nutricional. Los datos aportados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación indican que la cerveza aporta, cada 100 gramos de porción comestible, 33 Kcal, 0,3 gramos de proteína, 2,4 gramos de hidratos de carbono, 97,3 gramos de agua y diferentes minerales (como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  o  $\text{P}^{3-}$ ) y vitaminas (principalmente folatos). Además, tiene 3,1 gramos de alcohol (Fig. 2) (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2018), lo cual se refleja en un 3,5-5% v/v en alcohol (Menz et al., 2009). Aunque todas estas cantidades varían según los componentes, se conoce que la cerveza puede tener efectos beneficiosos en la salud si el consumo es moderado, pero también puede ser nociva y causar desórdenes alimenticios y de adicción si se toma de forma excesiva. Los beneficios de la cerveza se atribuyen sobre todo a su contenido en etanol, cuyo consumo moderado aumenta el colesterol tipo HDL, y a su contenido en compuestos fenólicos, que son antioxidantes y pueden disminuir la incidencia de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como aterosclerosis, cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Sohrabvandi et al., 2012).

**Tabla 1.** Composición nutricional de la cerveza (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2018).

	Por 100 g de porción comestible	Por caña (200 g)	Recomendaciones de hombres	Recomendaciones de mujeres
Energía (Kcal)	33	66	3.000	2.300
Proteínas (g)	0,3	0,6	54	41
Lípidos totales (g)	0	0	100-117	77-89
AG saturados (g)	0	0	23-27	18-20
AG monoinsaturados (g)	0	0	67	51
AG poliinsaturados (g)	0	0	17	13
ω-3 (g)	0	0	3,3-6,6	2,6-5,1
C18:2 Linoleico (ω-6) (g)	0	0	10	8
Colesterol (mg/1000 kcal)	0	0	<300	<230
Hidratos de carbono (g)	2,4	4,8	375-413	288-316
Fibra (g)	0	0	>35	>25
Agua (g)	97,3	195	2.500	2.000
Calcio (mg)	7	14,0	1.000	1.000
Hierro (mg)	0,01	0	10	18
Yodo (µg)	—	—	140	110
Magnesio (mg)	6	12,0	350	330
Zinc (mg)	0,02	0	15	15
Sodio (mg)	11	22,0	<2.000	<2.000
Potasio (mg)	43	86,0	3.500	3.500
Fósforo (mg)	20	40,0	700	700
Selenio (µg)	Tr	Tr	70	55
Tiamina (mg)	Tr	Tr	1,2	0,9
Riboflavina (mg)	0,03	0,06	1,8	1,4
Equivalentes niacina (mg)	0,4	0,8	20	15
Vitamina B <sub>6</sub> (mg)	—	—	1,8	1,6
Folatos (µg)	4,1	8,2	400	400
Vitamina B <sub>12</sub> (µg)	0,14	0,28	2	2
Vitamina C (mg)	0	0	60	60
Vitamina A: Eq. Retinol (µg)	Tr	Tr	1.000	800
Vitamina D (µg)	0	0	15	15
Vitamina E (mg)	0	0	12	12
Alcohol (g)	3,1	6,2		

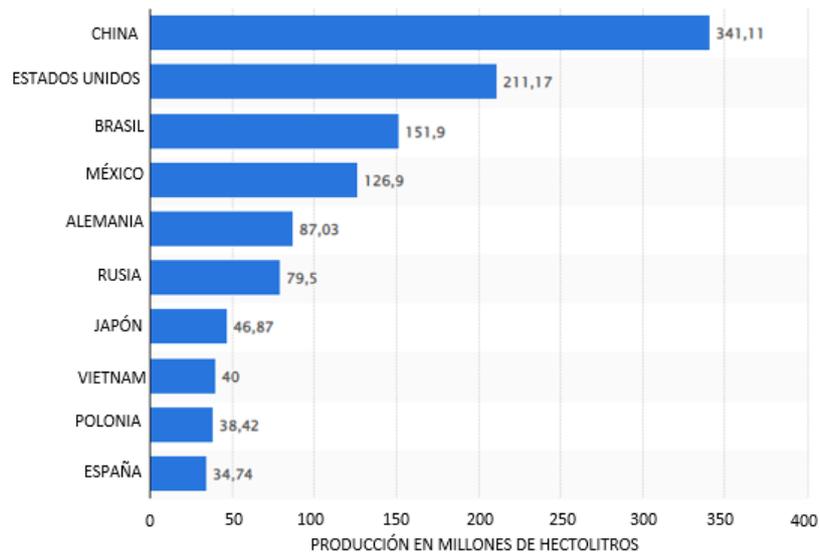
### 3.4.DATOS DE PRODUCCIÓN

Según los datos de elaboración de la cerveza arrojados por Brewers of Europe, el principal productor de cerveza a nivel europeo es Alemania, con una producción de 8.720.700.000 litros de cerveza en 2020. A este le sigue Polonia, con una producción 3.906.600.000 litros. España ocupa el tercer lugar en cuanto a producción de cerveza en Europa, con una cifra de 3.469.200.000 litros (Fig. 2) (Brewers of Europe, 2020).



**Figura 2.** Volumen de producción de cerveza en Europa en 2020 por país, en miles de hectolitros según los datos de Brewers of Europe (Statista, 2022).

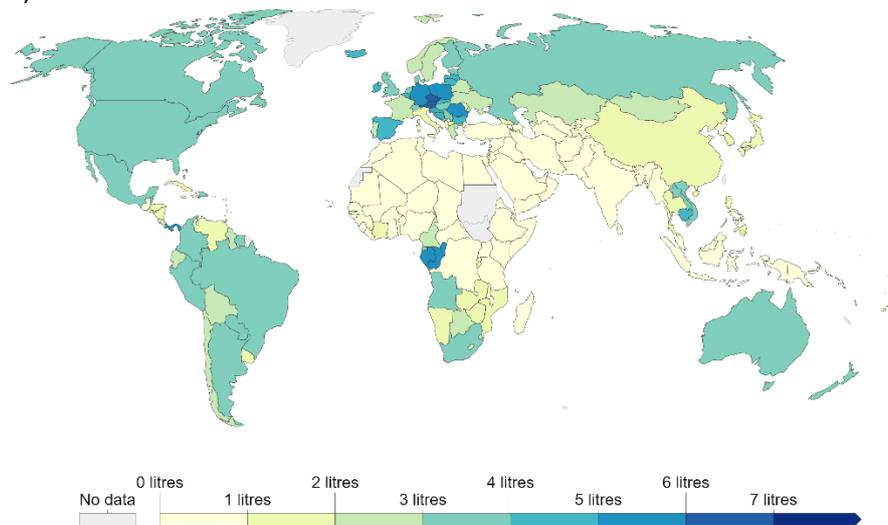
En el caso de la producción mundial, el primer puesto lo ocupa China (34.111.000.000 litros), seguido de Estados Unidos (21.117.000.000 litros), Brasil (15.190.000.000 litros) y México (12.690.000.000 litros). Alemania se encuentra en la quinta posición y España ocupa la décima (Fig. 3) (Barth-Haas Group, 2020).



**Figura 3.** Ranking de los países líderes en producción de cerveza en el mundo en 2020, en millones de hectolitros según los datos de Barth-Haas Group (Statista, 2021).

### 3.5.DATOS DE CONSUMO

Según un estudio publicado en American Addiction Centers, la cerveza tiene de media un contenido en alcohol del 5% por litro (Ackermann, 2021). Considerando este valor como referencia, en 2019 se midió el consumo de litros puros de alcohol en cerveza por persona. De estos valores se obtuvo que el país más consumidor de alcohol en forma de cerveza es la República Checa, con valores de 6,77 litros de alcohol puro por persona en cerveza al año. A este le sigue Austria, con 6,30 litros, y Polonia, con 5,72 litros. España se sitúa en el duodécimo puesto con un consumo de 4,67 litros de alcohol puro en forma de cerveza por persona (Fig. 4) (Ritchie et al., 2018).



**Figura 4.** Consumo de cerveza por persona medido en litros de alcohol puro (OurWorldInData, 2019).

De hecho, en España en el año 2020 se registró un gasto anual de 32,13 euros per cápita en cerveza, siendo el dato más alto desde 2011 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2020). Sabiendo que la población española alcanzaba los 47,35 millones de personas en 2020, en este año se gastó un total de más de 1.500 millones de euros en cerveza.

### 3.6.CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DURANTE LA ELABORACIÓN

En el proceso de elaboración de la cerveza, la contaminación microbiológica puede darse desde etapas muy tempranas, y esto se debe evitar para mantener la calidad de la cerveza y evitar su deterioro. Algunos de los microorganismos que pueden producir el deterioro de la cerveza son las bacterias ácido-lácticas y ácido-acéticas, y otros géneros como *Zymomonas* o familias como Enterobacteriaceae (Obi, 2018).

En este trabajo se van a revisar los aspectos microbiológicos de la cerveza y su elaboración, incluyendo tanto a las levaduras y bacterias implicadas en su fabricación como a los microorganismos contaminantes de este proceso. Además, trataremos métodos de detección y eliminación de estos contaminantes microbianos para que la elaboración y calidad microbiológica de la cerveza sea la mejor posible.

#### **4.OBJETIVOS**

Los objetivos fijados para este trabajo son:

1. Conocer los ingredientes de la cerveza.
2. Describir el proceso de elaboración de la cerveza.
3. Describir los microorganismos implicados en la fabricación de la cerveza y las distintas cepas de levaduras utilizadas.
4. Estudiar el problema de la contaminación microbiológica de la cerveza y determinar cuáles son sus principales causantes.
5. Determinar cómo se puede detectar y prevenir la contaminación durante el proceso de elaboración de la cerveza.

#### **5.METODOLOGÍA**

Para efectuar este trabajo de fin de grado en forma de revisión bibliográfica, se ha indagado en las bases de datos Google Scholar, Pubmed y Sci-Hub. Para ello, se han usado palabras claves como: Brewing, Beer spoilage, Beer microbiology, lactic acid bacteria, microbial spoilage detection.

Se han seleccionado preferiblemente artículos científicos y revisiones bibliográficas en inglés y, en segundo lugar, en castellano, de los últimos cinco años para obtener un trabajo actualizado sobre el tema a tratar. Aun así, también se han usado de años anteriores debido a su importancia en la materia y al contenido que brindan. Además, se han consultado bases de datos, libros, textos electrónicos e informes técnicos.

#### **6.RESULTADOS**

##### **6.1.INGREDIENTES DE LA CERVEZA**

Según la ley de pureza de la cerveza (llamada “Reinheitsgebot” en alemán), creada en Alemania en 1516 y modificada en 1993, para elaborar la cerveza se parte de 4 ingredientes principales,

que son malta de cebada, lúpulo, agua y levaduras. Cada uno de estos tiene diferentes funciones en la elaboración, y según sus cualidades, pueden hacer que las características de la cerveza varíen.

### 6.1.1.FUENTE DE ALMIDÓN

El grano o cereal que se utilice es el que actúa como fuente de almidón, ya que, aproximadamente, un 63% del peso seco del grano es almidón acumulado en el endospermo de la semilla en forma de gránulos (Wunderlich y Back, 2009). Se usa principalmente la cebada (*Hordeum vulgare*), aunque pueden usarse otros cereales como trigo (*Triticum aestivum*), centeno (*Secale cereale*) o espelta (*Triticum spelta*) (Anderson et al., 2019). Estos cereales, junto con otros como arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*) o avena (*Avena sativa*), se añaden solos o en combinación con la cebada y otros azúcares fermentables adicionales (azúcar cande, miel o melaza) para crear diferentes estilos de cerveza (Fig. 5) (Hughes, 2013).



**Figura 5.** Diferentes fuentes de almidón (A: Trigo torrefactado, B: Espelta, C: Arroz en copos, D: Avena en copos, E: Maíz en copos, F: Cebada tostada) y azúcares fermentables adicionales (G: Azúcar cande, H: miel, I: Melaza).

Tomada de Home Brew Beer (Hughes, 2013).

El hecho de poder elaborar cervezas a partir de cereales sin gluten como el arroz, el maíz o la avena, hace que los celíacos puedan consumir cerveza (Academia Catalana de Gastronomía y Nutrición, 2015). Pero, además de estas, existen cervezas elaboradas con cebada que son aptas

para celíacos por tener un contenido en gluten menor de 20 partes por millón (Federación de Asociaciones de Celíacos de España, 2018).

La fuente de almidón tiene como función principal el darle cuerpo a la cerveza, ya que es la que proporciona los azúcares que serán usados por las levaduras para generar el etanol mediante la fermentación. No obstante, del grano se obtienen otros compuestos que le confieren aroma, sabor y color a la cerveza (Anderson et al., 2019). En concreto, las proteínas determinan la viscosidad del mosto y la cerveza, los lípidos afectan a la estabilidad de la espuma, los polifenoles afectan al color, a la espuma, al sabor y a la formación de turbidez, y los minerales influyen en el pH (Wunderlich y Back, 2009). Además, también se obtiene nitrógeno en forma de aminos libres (“free amino nitrogen” o FAN), el cual es requerido por las levaduras en la etapa de fermentación. De hecho, una baja concentración de nitrógeno en forma de aminos libres conlleva a una disminución en el rendimiento de la fermentación.

Sin embargo, esta misma fuente de almidón también puede contener contaminantes microbiológicos que pueden causar el deterioro de la cerveza, como son bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pediococcus* y *Lactobacillus* o de la familia Enterobacteriaceae, u hongos del género *Fusarium* y sus micotoxinas, tales como las zearalenonas (Anderson et al., 2019) o el deoxinivalenol (DON), también conocido como vomitoxina (Bokulich y Bamforth, 2013).

### **6.1.2.LÚPULO**

Del lúpulo (*Humulus lupulus*) se extraen gran cantidad de sustancias, pero los compuestos más destacados en cuanto al proceso de elaboración de la cerveza son las resinas, los agentes aromatizantes y los polifenoles. Las resinas contienen los alfa-ácidos y beta-ácidos. Estos compuestos influyen en el amargor de la cerveza, sobre todo los alfa-ácidos cuando son transformados en iso-alfa-ácidos durante la etapa de ebullición o cocción (Wunderlich y Back, 2009). Además, estos compuestos tienen acción antimicrobiana (sobre todo anti-bacterias Gram positivas), por lo que se produzca el deterioro de la cerveza por acción microbiológica (Bokulich y Bamforth, 2013). Sin embargo, tanto los alfa como los beta-ácidos influyen en la estabilidad de la espuma y en la naturaleza bacteriostática tanto el mosto como de la propia cerveza. Los agentes aromatizantes se encuentran formando parte de los aceites esenciales del lúpulo (Wunderlich y Back, 2009). Estos agentes son compuestos volátiles y los más abundantes son el humuleno, el linalool, el mirceno y el beta-cariofileno (Anderson et al., 2019). Los polifenoles

son antioxidantes y tienen numerosos beneficios, ya que son muy variados y su composición depende de las condiciones de cultivo y la variedad de lúpulo que se utilice.

Actualmente el lúpulo se usa como aromatizante empleando variedades que tienen mayor contenido en aceites esenciales y menos en alfa-ácidos, o como agente que aporta amargor usando variedades que tienen mayor contenido en alfa-ácidos y menos en aceites esenciales (Wunderlich y Back, 2009). Si se usa como aromatizante se añade 30 minutos antes del final de la cocción o durante la fermentación añadiendo lúpulo seco, lo que se conoce como “dry hopping”. Sin embargo, si se usa como agente amargante, se añade al principio de la cocción para que el amargor suavice el sabor a alcohol (Hughes, 2013). Aun así, en ambos casos, la mayoría de los fabricantes usan el lúpulo en forma de pellet o de extracto (Fig. 6) (Wunderlich y Back, 2009).



**Figura 6.** Diferentes formas de presentación del lúpulo. Tomada de Home Brew Beer (Hughes, 2013).

### 6.1.3.AGUA

El agua es el componente mayoritario de la cerveza, siendo un 90% de esta (Anderson et al., 2019). Durante la elaboración de la cerveza se usa entre 4 y 7 veces más agua que la que tiene el producto acabado (Conduah et al., 2019). Sus estándares de calidad están legislados y debe ser potable, pura y libre de patógenos (Wunderlich y Back, 2009). Según sus características de pH, alcalinidad, concentración de iones metálicos y contenido microbiológico, puede dar lugar a diferentes sabores en la cerveza. También puede influir en su calidad la presencia de subproductos derivados de la desinfección del agua.

El pH normal del agua potable suele estar alrededor de 7,5, pero en las cervezas varía de 3 a 6 en función del tipo de cerveza (lager, ale o agria). En cuanto a la alcalinidad del agua, tiene una relación directa con el pH del mosto y de la cerveza, por lo que, si es muy alta, el pH del mosto y la cerveza aumentan. Esto puede interferir en el sabor del producto final, por lo que la alcalinidad máxima del agua para la elaboración de la cerveza es de 100mg/L de CaCO<sub>3</sub> (Anderson et al., 2019).

Cuando se habla de iones metálicos en el agua para elaboración de cerveza, hay que distinguir entre los que afectan a la seguridad del agua (estándares primarios, cuyos niveles máximos de deben cumplirse), los que afectan al gusto y pH (estándares secundarios, cuyos niveles máximos pueden no cumplirse), y otros no regulados que también pueden tener efecto en la cerveza. Los que afectan a la seguridad son los propios de subproductos derivados de la desinfección del agua (bromato, ácidos haloacéticos y trihalometanos) y los nitratos, nitritos y cloro. Los que afectan al gusto y al pH son cobre, cloruros, hierro, manganeso, silicatos, sulfatos y aluminio. Los otros iones no regulados son bromo, magnesio, fosfatos, potasio y calcio (Anderson et al., 2019). El calcio y el magnesio son los iones que más interfieren en el pH (Wunderlich y Back, 2009).

#### **6.1.4.LEVADURA**

Las levaduras son las encargadas de generar el etanol y el dióxido de carbono a partir de los azúcares (principalmente glucosa) aportados por la fuente de almidón que se use. Además, producen diferentes compuestos, como diacetilo, alcoholes superiores (como 2- y 3-metilbutanol o 2-feniletanol), 4-vinil-guayacol, dióxido de azufre, ésteres de acetato (como el acetato de etilo) o de ácidos grasos (como el acetato de isoamilo). Estos son importantes en los aromas y sabores de la cerveza. Por ejemplo, los alcoholes superiores dan aromas florales, y el 4-vinil-guayacol es la sustancia que caracteriza el aroma de las cervezas de trigo (Wunderlich y Back, 2009). Es importante elegir bien la cepa de levadura que se usa, ya que estas son un factor muy importante en la calidad de la cerveza y van a variar su perfil de sabores.

Las levaduras usadas en la producción de cerveza se dividen en levaduras de fermentación alta o de superficie (“top-fermenting yeast”) y levaduras de fermentación baja o de fondo (“bottom-fermenting yeast”) (Anderson et al., 2019). Se nombran levaduras de fermentación de superficie porque en los fermentadores tradicionales tienden a subir y se quedan en la superficie del mosto, mientras que las de fermentación de fondo no suben y quedan en el fondo (Bokulich y Bamforth, 2013). La fermentación de superficie es llevada a cabo por las diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que fermentación de fondo la realizan las diferentes cepas de *Saccharomyces pastorianus* (Anderson et al., 2019). Aunque las especies de *Saccharomyces* son las principalmente usadas, hay algunos tipos de cervezas que usan otros géneros como el género *Brettanomyces* (Wunderlich y Back, 2009).

Según el tipo de fermentación que se realice, se pueden distinguir 2 tipos de cerveza, que son las cervezas tipo ale y lager. La cerveza tipo ale se genera por una fermentación llevada a cabo por cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que las de tipo lager se generan por una fermentación llevada a cabo por cepas de *Saccharomyces pastorianus*. La temperatura a la cual realizan la fermentación estas 2 especies es la principal diferencia entre ellas. Las cepas de *Saccharomyces pastorianus* realizan la fermentación entre 15 y 25°C, mientras que las de *Saccharomyces cerevisiae* la realizan a una temperatura de entre 8 y 15°C (Shopska et al., 2022).

Existen otros tipos de cerveza además de estas dos. Uno de estos tipos de cerveza es conocida como “sour beer” o cerveza agria, la cual se obtiene por una exposición ambiental del mosto cervecero que da lugar a una fermentación espontánea debida a levaduras ambientales y a lactobacilos (Dyvsik et al., 2020). Otro de estos tipos se conoce como cerveza de fermentación por cultivo mixto (“mixed-culture fermentation beer”), ya que se obtiene por inoculación de un cultivo mixto de *Lactobacillus* spp., *S. cerevisiae* y *Pediococcus* spp. al mosto cervecero para que realicen una primera fermentación, y una posible posterior re-fermentación llevada a cabo por levaduras del género *Brettanomyces* (Bokulich y Bamforth, 2013).

El pH es diferente en los distintos tipos de cerveza, siendo de 4-5 para la cerveza lager, de 3-6 para la cerveza ale, y de 3,3 o menor para la cerveza agria (Anderson et al., 2019).

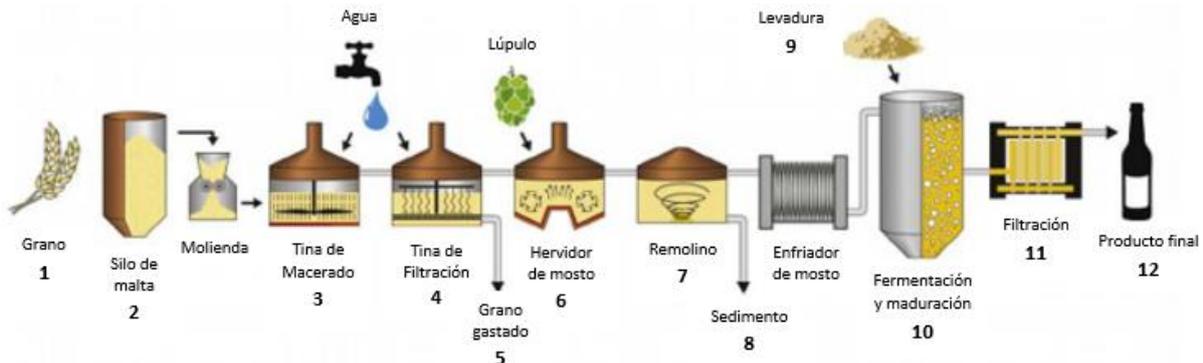
El hecho de inocular bacterias como *Lactobacillus* spp. o *Pediococcus* spp. o levaduras como *Brettanomyces* de manera intencionada en la fermentación puede ser paradójico, ya que son microorganismos considerados como contaminantes. Sin embargo, esto se hace de forma controlada para que aporten acidez u otras características agradables para algunos consumidores, que a su vez no pueden ser aportadas por las levaduras del género *Saccharomyces* (Escuela Cervecera, 2018).

## **6.2.PROCESO DE ELABORACIÓN**

Para comenzar con el proceso de elaboración de la cerveza, lo primero que se debe hacer es crear el mosto cervecero, que es una solución que contiene los azúcares extraídos y descompuestos de la malta de cebada, y otros nutrientes esenciales para el crecimiento de las levaduras. Tras obtener el mosto cervecero, las levaduras usan los compuestos presentes en este para obtener energía. Para ello, realizan la fermentación alcohólica, mediante la cual

transforman la glucosa en etanol y dióxido de carbono, pero a su vez se activan otras rutas bioquímicas que generan compuestos adicionales.

Este proceso es mucho más largo y complejo, teniendo diferentes etapas que son la molienda de la malta de cebada, el macerado, la separación y ebullición o cocción del mosto, la clarificación, el enfriado y aireado, la fermentación y maduración, el filtrado, el acondicionamiento, la estabilización y por último el envasado (Fig. 7).



**Figura 7.** Pasos del proceso de elaboración de la cerveza. Traducido a partir de la imagen de Anderson et al., 2019.

La molienda se realiza con el fin de mejorar el proceso de extracción, ya que se hace que el almidón del endospermo de las semillas esté más accesible para las enzimas de la malta. Tras obtener la mezcla de molienda, se agrega agua para que se activen las enzimas de la malta. Después se realiza la separación del mosto o macerado, que consiste en una filtración en la cual se eliminan restos de cáscaras, plantas y otros materiales insolubles. A continuación, se realiza la cocción o ebullición del mosto cervecero para que se dé la esterilización e inactivación de las enzimas, para formar sustancias que dan color y aromas, para extraer e isomerizar los alfa-ácidos, para eliminar sustancias volátiles indeseadas y para acidificar el mosto entre otros objetivos. El lúpulo se añade al comienzo de la cocción para mejorar el rendimiento del proceso de extracción de alfa-ácidos. Después se realiza la clarificación del mosto, eliminando los restos de lúpulo y demás sedimento. Ahora se airea y se realiza la fermentación con las levaduras del género *Saccharomyces*. Durante este proceso se forma etanol, dióxido de carbono y otros compuestos que aportan sabor y aroma como ésteres, ácidos orgánicos o dicetonas. Luego se realiza una segunda fermentación para saturar la cerveza de dióxido de carbono, mejorar la estabilidad de la espuma de la cerveza, eliminar compuestos que aportan aromas indeseados y más. Una vez madurada la cerveza, se filtra, se estabiliza y por último se envasa y acondiciona (Sinha, 2007).

### 6.3. CONTAMINANTES DURANTE EL PROCESO DE ELABORACIÓN

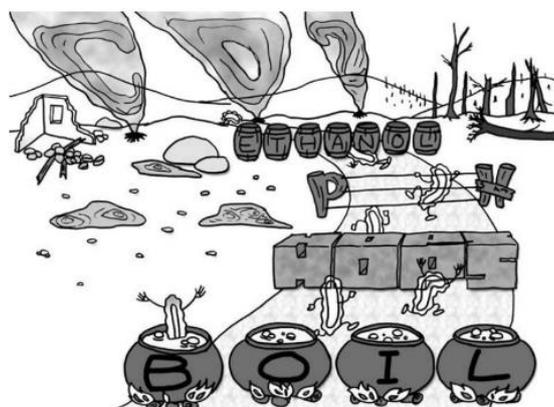
En el proceso de elaboración de la cerveza, como en el de todos los alimentos obtenidos por procesos de fermentación, los microorganismos juegan un papel fundamental. En este caso, no solo es importante la especie y cepa de *Saccharomyces* que realiza la fermentación alcohólica de los azúcares presentes en el mosto, sino que también intervienen otros microorganismos que determinan la calidad final del producto. Estos participan en todas las etapas del proceso de elaboración, ya que se encuentran tanto en los ingredientes iniciales como en el producto final, pasando por todas las etapas (Fig. 8) (Bokulich y Bamforth, 2013).



Figura 8. Microbiota del proceso de elaboración de la cerveza. Imagen traducida del texto de Bokulich y Bamforth, 2013.

Sin embargo, la cerveza es un alimento que, desde el punto de vista microbiológico, se contamina poco porque es microbiológicamente estable, por lo que ha sido reconocida desde hace cientos de años como una bebida segura (Sakamoto y Konings, 2003). Este hecho se debe tanto a factores intrínsecos como extrínsecos (Menz et al., 2009). Los factores intrínsecos son su bajo pH (de entre 3,8 y 4,7) (Sakamoto y Konings, 2003) que está condicionado por la gran cantidad de dióxido de carbono disuelto, la presencia de etanol (entre 3,5-5,5% v/v, aunque puede llegar hasta 10% v/v), la presencia de los alfa-iso-ácidos cedidos por el lúpulo (que tienen acción antimicrobiana) y la falta de oxígeno y otros nutrientes necesarios para el crecimiento de patógenos. Los factores extrínsecos son las etapas del proceso de elaboración de la cerveza que

disminuyen el riesgo de contaminación microbiana, como el macerado, la cocción del mosto y la filtración, sumando a estos un almacenamiento en frío una vez que el producto está acabado (Fig. 9) (Menz et al., 2009).



**Figura 9.** Factores que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos en la cerveza. Tomada de Menz et al., 2009.

Estos factores que actúan como obstáculos del crecimiento microbiano pueden afectar más a un tipo de contaminantes que a otros, destacando por ejemplo a los iso-alfa-ácidos del lúpulo, que inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas, o los bajos niveles de oxígeno, que afectan sobre todo a los patógenos aeróbicos y las bacterias Gram negativas. Además, cada uno de ellos inhibe el crecimiento de los patógenos mediante diferentes mecanismos (Tabla 2) (Menz et al., 2009).

**Tabla 2.** Factores inhibidores del crecimiento de microorganismos, tipo de microorganismos a los que afectan principalmente y mecanismo de acción. Traducida a partir del texto de Menz et al., 2009.

Obstáculos para el crecimiento microbiano	Objetivos primarios	Mecanismo de inhibición del crecimiento
Etanol	Todos los patógenos	Inhibe funciones de la membrana celular
Bajo pH	Todos los patógenos	Afecta a enzimas y permeasas
Compuestos extraídos del lúpulo	Bacterias Gram positivas	Inhibe funciones de la membrana celular
Dióxido de carbono	Patógenos aeróbicos	Crea condiciones anaeróbicas, disminuye el pH, afecta a enzimas y a la membrana celular
Falta de oxígeno	Patógenos aeróbicos y bacterias Gram negativas	Crea condiciones anaeróbicas
Falta de nutrientes	Todos los patógenos	Priva de nutrientes
Macerado	Bacterias Gram negativas	Causa destrucción térmica
Cocción del mosto	Todos los patógenos	Causa destrucción térmica

A estos factores se suman algunos, intrínsecos y extrínsecos, que no son aplicables a todos los tipos de cerveza. En el caso de los factores intrínsecos, la presencia de dióxido de azufre en algunos tipos de cerveza inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas afectando a varios sistemas metabólicos. En el caso de los factores extrínsecos, la pasteurización y la filtración afectan a todo tipo de patógenos, mientras que el acondicionamiento en las botellas afecta a patógenos aeróbicos porque se crea un ambiente anaeróbico (Menz et al., 2009).

Aun así, existen microorganismos capaces de causar el deterioro de la cerveza a diferentes niveles, provocando cambios sensoriales o turbidez debido a su presencia, metabolismo o productos. Entre estos microorganismos se encuentran bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos, levaduras salvajes (Sakamoto y Konings, 2003) y algunos protozoos (Bokulich y Bamforth, 2013).

Estos contaminantes pueden provenir de diferentes fuentes, siendo las principales las materias primas (cebada, agua, lúpulo y levadura), seguidas del ambiente del lugar donde se elabore la cerveza. Por ejemplo, en la vaina que recubre al grano de cebada se suelen encontrar microorganismos como *Eubacteria*, *Actinomycetes*, levaduras, algunos filamentos de hongos como los del género *Fusarium* (Priest y Campbell, 2003) y bacterias ácido-lácticas, pudiendo contaminarse en el campo, durante el almacenado o durante el malteado. Además, pueden encontrarse micotoxinas como zearalenonas o aflatoxinas, por lo que se prefiere usar cebada pre-malteada como punto de partida para evitar todos estos contaminantes (Rodhouse y Carbonero, 2017). Existen muchos otros contaminantes como por ejemplo algunos géneros de enterobacterias o levaduras del género *Candida* (Bokulich y Bamforth, 2013).

### **6.3.1. BACTERIAS CONTAMINANTES**

En cuanto a bacterias que causan deterioro en la cerveza, podemos encontrar tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas. Dentro de las Gram positivas destacan los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*, aunque existen más, pero con menor relevancia. Mientras tanto, de las Gram negativas destacan las enterobacterias (familia Enterobacteriaceae), las bacterias ácido-acéticas y los géneros *Pectinatus*, *Megasphaera*, además de otros menos importantes como *Zymomonas*, *Zymophilus* o *Selenomonas* (Sakamoto y Konings, 2003) (Obi, 2017).

### ***Bacterias Gram positivas***

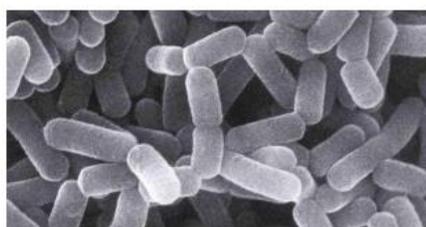
En principio, los compuestos extraídos del lúpulo inhiben el crecimiento de las bacterias Gram positivas. Sin embargo, algunos géneros pertenecientes a este grupo de bacterias han desarrollado cierta tolerancia frente a los iso-alfa-ácidos, por lo que pueden crecer en la cerveza (Bokulich y Bamforth, 2013).

Entre las bacterias Gram positivas que deterioran la cerveza (Tabla 3), el grupo frecuente es el de las bacterias ácido-lácticas (“lactic-acid bacteria” o “LAB”) (Bokulich y Bamforth, 2013). Hoy en día, la contaminación de la cerveza, sobre todo la artesanal, con este grupo de bacterias sigue siendo un problema (Rodríguez-Saavedra et al., 2020). Las bacterias ácido-lácticas producen el deterioro de la cerveza principalmente por sobre acidificación de la cerveza, formación de turbidez y producción de diacetilo (compuesto que aporta un olor característico a manteca no natural a la cerveza). Además, pueden producir exopolisacáridos con los cuales pueden servir como punto de partida para la generación de biofilms y con los que también aumentan la viscosidad y turbidez de la cerveza, pudiendo llegar a dar una textura oleosa o gelatinosa como la baba (“slime”) (Bokulich y Bamforth, 2013) (Fraunhofer et al., 2018). Sumado a todo esto, las bacterias ácido-lácticas pueden generar bioaminas en su metabolismo, las cuales pueden pasar a la cerveza y causar problemas de salud (Rodríguez-Saavedra et al., 2020)

El género más extendido de bacterias ácido-lácticas es el género *Lactobacillus*, seguido del género *Pediococcus*. De estos dos géneros destacan como contaminantes de la cerveza diferentes especies, siendo las principales *Pediococcus damnosus*, *Lactobacillus brevis* (siendo esta la especie principal) (Obi, 2017), *L. paracasei*, *L. backii* (Rodríguez-Saavedra et al., 2020) y *L. lindneri*. Aun así, existen otras especies de estos dos géneros capaces de deteriorar dicho alimento (Tabla 3). Las bacterias pertenecientes a estos 2 géneros son responsables de aproximadamente el 70% de los incidentes microbiológicos que deterioran la cerveza (Sakamoto y Konings, 2003).

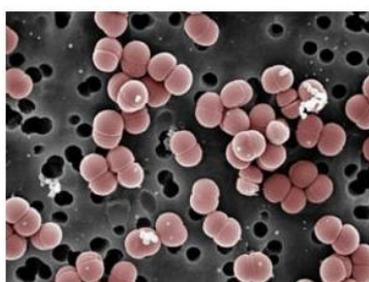
*L. brevis* es la bacteria del género *Lactobacillus* (Fig. 10) más frecuentemente detectada como contaminante de la cerveza, causando más de la mitad de los incidentes causados por este género. Es una bacteria generalmente resistente a los compuestos extraídos del lúpulo, que crece a una temperatura óptima de 30°C y a un pH de entre 4 y 5. Esta bacteria ácido-láctica deteriora la cerveza por generar una sobre acidificación debido a su capacidad para fermentar tanto el almidón como las dextrinas presentes en el mosto (Sakamoto y Koning, 2003)

(Rodhouse y Carbonero, 2017). Tras esta, dentro del género *Lactobacillus* cabe destacar a *L. lindneri*, responsable de un 15 a 25% de los casos de deterioro de la cerveza por este género. Esta especie es muy resistente a los compuestos extraídos del lúpulo y, aunque su temperatura óptima de crecimiento va de 19 a 23°C, es capaz de sobrevivir a los tratamientos con alta temperatura mejor que otras especies de su género. Dentro de este género, *L. casei* es la especie que más destaca en cuanto a la producción de diacetilo (Sakamoto y Koning, 2003).



**Figura 10.** Morfología del género *Lactobacillus* (*L. casei*). Tomada de la tesis de Lizeth García Torres en el Instituto Potosino de investigación científica y tecnológica, 2015.

Por otro lado, del género *Pediococcus* (Fig. 11) destacamos a *P. damnosus*. Es una bacteria que se encuentra tanto en fábricas de cerveza como de vino, pero no en otras industrias alimentarias ni en la naturaleza. Su temperatura óptima de crecimiento va de 22 a 25°C, es un microorganismo microaerófilo y crece mejor en medios donde solo hay dióxido de carbono (Obi, 2017). Esta especie deteriora la cerveza principalmente por la producción de diacetilo, aportándole el aroma a mantequilla tan característico. Además de esto, es capaz de producir exopolisacáridos y puede crecer a bajar temperaturas tanto en cervezas tipo ale como en tipo lager (Bokulich y Bamforth, 2013). También puede alterar la estabilidad de la espuma y puede aumentar el nivel de bioaminas como la histamina en la cerveza (Obi, 2017).



**Figura 11.** Morfología del género *Pediococcus*. Tomada de The Brewers Journal, 2016.

Otros géneros que pueden causar deterioro de la cerveza y han sido aislados en esta son *Leuconostoc* sp. (encontrado en el mosto cervecero, en la cerveza ya fermentada y en la maquinaria necesaria para la elaboración de la cerveza) (Rodríguez-Saavedra et al., 2020), *Micrococcus kristinae* (Sakamoto y Konings, 2003), que fue renombrada como *Kocuria kristinae* y a partir de 2018 fue de nuevo renombrada como *Rothia kristinae* (NCBI, 2022) y 4 especies de

la familia Bacillaceae que tienen un gen que les confiere resistencia a los compuestos extraídos del lúpulo (gen *horA*), las cuales son *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus epidermidis* y *Paenibacillus humicus* (Bokulich y Bamforth, 2013).

Algunos géneros de bacterias como *Streptococcus* o *Enterococcus* no han sido aislados en la cerveza (Bokulich y Bamforth, 2013). Sin embargo, si se han aislado nuevos contaminantes como *Staphylococcus xylosus* (Yu et al., 2019).

**Tabla 3.** Bacterias contaminantes Gram positivas. Elaboración propia.

Género	Especie	Referencia
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. brevis</i>	Obi, 2017
	<i>L. lindneri</i>	Sakamoto y Konings, 2003
	<i>L. casei</i>	Sakamoto y Koning, 2003
	<i>L. backii</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. coryneformis</i> , <i>L. parabuchneri</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. fructivorans</i> , <i>L. paucivorans</i> , <i>L. paracollinoides</i>	Sakamoto y Konings, 2003 ; Bokulich y Bamforth, 2013 ; Rodríguez-Saavedra et al., 2020
<i>Pediococcus</i>	<i>P. damnosus</i>	Obi, 2017
	<i>P. inopinatus</i> , <i>P. dextrinicus</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>P. parvulus</i> , <i>P. claussenii</i> , <i>P. acidilactici</i>	Sakamoto y Konings, 2003 ; Bokulich y Bamforth, 2013
<i>Leuconostoc</i>	-	Rodríguez-Saavedra et al., 2020
<i>Rothia</i>	<i>R. kristinae</i>	Sakamoto y Konings, 2003 ; NCBI, 2022
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i> , <i>B. licheniformis</i>	Bokulich y Bamforth, 2013
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. xylosus</i>	Bokulich y Bamforth, 2013 ; Yu et al., 2019
<i>Paenibacillus</i>	<i>P. humicus</i>	Bokulich y Bamforth, 2013

### **Bacterias Gram negativas**

Las bacterias Gram negativas causantes de deterioro en la cerveza se dividen en 2 categorías. La primera comprende a las bacterias Gram negativas aerobias y anaerobias facultativas, donde se encuentran las bacterias ácido-acéticas, el género *Zymomonas* y algunas especies de enterobacterias, mientras que la segunda comprende las especies anaerobias, que son los géneros *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Zymophilus*, *Selenomonas* y otros menos importantes

(Ashtavinayak y Elizabeth, 2016), todos pertenecientes a la familia Veillonellaceae (Tabla 4) (Bokulich y Bamforth, 2013). Mientras que las bacterias pertenecientes a la primera categoría hoy en día no representan una gran amenaza en la elaboración de la cerveza por la reducción de oxígeno en las cervezas (gracias a la tecnología actual), la segunda categoría ha aumentado su incidencia en problemas de deterioro de la cerveza (Sakamoto y Konings, 2003).

De ambas categorías, el género *Pectinatus*, perteneciente a la segunda categoría, es el reconocido como principal causante de deterioro de la cerveza entre las bacterias Gram negativas, puesto que provoca un 20-30% de los incidentes, sobre todo en cervezas no pasteurizadas (Obi, 2017). Las especies más importantes dentro de este género son *P. cerevisiiphilus*, *P. frisingensis* (Fig. 12) y *P. haikarae*. Son anaerobios estrictos que pueden crecer a una temperatura de entre 15 y 40°C, siendo la temperatura óptima los 32°C. Además, pueden crecer en un pH de entre 3,5 y 6, siendo el óptimo de 4,5. Estas bacterias causan el deterioro de la cerveza mediante la formación de turbidez y la producción de un olor característico a huevos podridos debido a la producción de sulfuro de hidrógeno, metil-mercaptano y una combinación de ácidos grasos. Sumado a esto, producen ácido propiónico, acético, succínico y láctico (el cual pueden fermentar aumentando ligeramente el pH) y acetoína (Sakamoto y Konings, 2003) (Rouse y van Sinderen, 2008) (Obi, 2017).

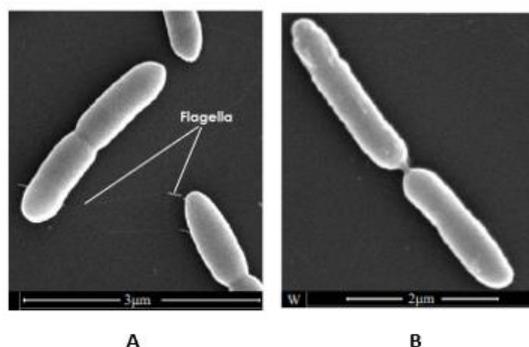
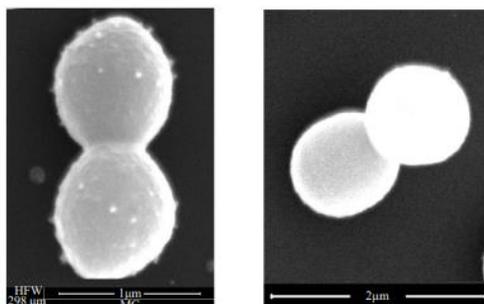


Figura 12. Morfología de *P. cerevisiiphilus* y *P. frisingensis*. Tomada de Ashtavinayak y Elizabeth, 2016.

El segundo género más destacado de las bacterias Gram negativas productoras del deterioro de cerveza es el género *Megasphaera*. La primera especie conocida en este ámbito fue *M. cerevisiae* (Fig. 13), la cual causó del 3 al 7% de los casos de contaminación microbiana de la cerveza entre 1980 y 2002 en Europa (Ashtavinayak y Elizabeth, 2016). Esta es anaerobia estricta, crece en un pH superior a 4,1 y con valores de temperatura de entre 15 y 37°C, siendo su temperatura óptima de 28°C. Su crecimiento se ve frenado con concentraciones de etanol de entre 2,8-5,5 peso/volumen (ya que por encima de dicho valor puede continuar su crecimiento). *M. cerevisiae* deteriora la cerveza mediante la formación de turbidez debido a la

sobreproducción de ácido butírico y a la producción, aunque en menor cantidad, de otros compuestos como ácido acético, ácido valérico, acetoína y otros. Además, también produce sulfuro de hidrógeno, el cual aporta mal olor a la cerveza (Sakamoto y Konings, 2003). Posteriormente, se encontraron otras dos especies del género *Megasphaera* causantes de deterioro de la cerveza, llamadas *M. paucivorans* y *M. sueciensis*. Todas las especies del género *Megasphaera* coinciden en que afectan principalmente a cervezas no pasteurizadas y con un bajo contenido en alcohol (Ashtavinayak y Elizabeth, 2016).



**Figura 13.** Morfología de *Megasphaera cerevisiae*. Tomada de Ashtavinayak y Elizabeth, 2016.

Acabando con las bacterias Gram negativas de la segunda categoría, cabe destacar a los géneros *Zymophilus* y *Selenomonas*. Del género *Zymophilus* destacamos la especie *Z. raffinivorans*, que crece en valores de pH de entre 4,3 y 4,6 siempre que la concentración de alcohol sea menor al 5% peso/volumen. Al estar relacionada filogenéticamente con el género *Pectinatus*, causa el deterioro de la cerveza de una forma similar a este (Sakamoto y Konings, 2003). Mientras tanto, del género *Selenomonas* la especie importante en este ámbito es *S. lacitifex*, que puede crecer cuando la concentración de alcohol sea inferior al 4,5% peso/volumen. Este género también deteriora la cerveza de forma parecida, generando turbidez y mal olor (Ashtavinayak y Elizabeth, 2016).

Comenzando con las bacterias Gram negativas de la primera categoría (aerobias y anaerobias facultativas), cabe darle un lugar al género *Zymomonas*, concretamente a la especie *Z. mobilis* (Bokulich y Bamforth, 2013). Actualmente hay 3 subespecies, pero la única que deteriora la cerveza es *Z. mobilis* subsp. *mobilis*. Esta especie es anaerobia aerotolerante, no se presenta en cervezas tipo lager, no es capaz de usar la lactosa ni la maltosa (Ashtavinayak y Elizabeth, 2016), crece a un pH superior a 3,4 y con concentraciones de etanol inferiores al 10% peso/volumen (Bokulich y Bamforth, 2013). Su modo de deteriorar la cerveza es mediante la producción de acetaldehído y sulfuro de hidrógeno (Sakamoto y Konings, 2003), lo cual dota a la cerveza de un olor a huevos podridos (Bokulich y Bamforth, 2013).

Otro grupo de bacterias Gram negativas capaces de deteriorar la cerveza son las bacterias ácido acéticas (“Acetic acid bacteria” o “AAB”). Las bacterias de este grupo deterioran la cerveza debido a que transforman el etanol en acetato, lo cual da un sabor avinagrado a la cerveza (Sakamoto y Konings, 2003). Dentro de las bacterias ácido acéticas que deterioran la cerveza destacan los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* (Rouse y van Sinderen, 2008), concretamente las especies *A. aceti*, *A. pastorianus*, *A. hansii*, *A. liquefaciens* y *G. oxydans* (Bokulich y Bamforth, 2013) (Ashtavinayak y Elizabeth, 2016), aunque algunas más han sido citadas como presentes en el ambiente de algunas industrias cerveceras, tales como *G. cerevisiae* (Ashtavinayak y Elizabeth, 2016) y al menos diez especies del género *Acetobacter* (Obi, 2017). Estos géneros pueden crecer en medios muy ácidos y con alta cantidad de etanol. Además, son resistentes a los iso-alfa-ácidos del lúpulo (Rouse y van Sinderen, 2008). Aunque ya no son tan comunes debido a la tecnología actual, se suelen dar casos de contaminación con estas bacterias en las cervezas maduradas en barril, donde el oxígeno es más abundante (Bokulich y Bamforth, 2013).

Como último grupo notable entre las Gram negativas que dañan la calidad de la cerveza se encuentran las enterobacterias. Estas son bacterias anaerobias facultativas que actúan como indicadoras de higiene porque, si la cerveza se encuentra contaminada con estas, se debe a que el agua estaba en mal estado o a que se ha contaminado con otros líquidos en la red de tuberías (Ashtavinayak y Elizabeth, 2016). Dentro de este grupo se destacan los géneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Rahnella*, *Escherichia* y *Serratia* (Rodhouse y Carbonero, 2017) (Ashtavinayak y Elizabeth, 2016), pero ninguno de los géneros patógenos como *Salmonella* o *Shigella*. Son todos anaerobios facultativos, por lo que pueden crecer en ausencia de oxígeno, aunque no pueden hacerlo en ambientes con bajo pH o alto contenido en etanol. Entre estos géneros, los más importantes son el género *Hafnia*, concretamente la especie *Hafnia protea* (antes conocida como *Obesumbacterium proteus*) y el género *Rahnella*, destacando la especie *R. aquatilis* (antes conocida como *Enterobacter agglomerans*). *H. protea* es una bacteria no se encuentra en la cerveza una vez acabada porque no puede crecer en un ambiente con un pH menor de 3,9, pero sí que se puede encontrar en el paso de inoculación de la levadura al mosto y en las primeras etapas de la fermentación (compitiendo con las levaduras por los nutrientes). Esta ralentización de la fermentación también se puede dar por *R. aquatilis*. Tanto *H. protea* como *R. aquatilis* crecen a una temperatura máxima de 32-37°C, siendo la temperatura óptima de entre 25-28°C. Ambos producen compuestos (como el sulfuro de dimetilo o el disulfuro de dimetilo) que aportan a la cerveza un sabor a chirivía, que es una hortaliza parecida al apio. Además, *H. protea* puede producir N-nitrosamina, que es una

sustancia carcinogénica (Ashtavinayak y Elizabeth, 2016) (Obi, 2017). Además de las cervezas con alcohol, las cervezas sin alcohol (máximo 0,5% volumen/volumen) también pueden sufrir contaminación por enterobacterias, concretamente algunas como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterococcus faecium*, siendo estas mucho más peligrosas, aunque menos comunes (Menz et al., 2009).

**Tabla 4.** Bacterias contaminantes Gram negativas. Elaboración propia.

Categoría	Familia	Género	Especie	Referencia
Anaerobios estrictos	Veillonellaceae	<i>Pectinatus</i>	<i>P. cerevisiophilus</i> , <i>P. frisingensis</i> , <i>P. haikarae</i>	Sakamoto y Konings, 2003 ; Rouse y van Sinderen, 2008 ; Obi, 2017
		<i>Megasphaera</i>	<i>M. cerevisiae</i> , <i>M. paucivorans</i> , <i>M. sueciensis</i>	Ashtavinayak y Elizabeth, 2016
		<i>Zymophilus</i>	<i>Z. raffinovorans</i>	Sakamoto y Konings, 2003
		<i>Selenomonas</i>	<i>S. lactificax</i>	Ashtavinayak y Elizabeth, 2016
Aerobios y anaerobios facultativos	Enterobacteriaceae	<i>Hafnia</i>	<i>H. protea</i>	Menz et al., 2009 ; Ashtavinayak y Elizabeth, 2016 ; Rodhouse y Carbonero, 2017
		<i>Rahnella</i>	<i>R. aquatilis</i>	
		<i>Citrobacter</i>	-	
		<i>Enterobacter</i>	-	
		<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i>	
		<i>Proteus</i>	-	
		<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	
		<i>Serratia</i>	-	
	Acetobacteraceae	<i>Acetobacter</i>	<i>A. aceti</i> , <i>A. pastorianus</i> , <i>A. hansii</i> , <i>A. liquefaciens</i>	Bokulich y Bamforth, 2013;
		<i>Gluconobacter</i>	<i>G. oxydans</i> , <i>G. cerevisiae</i>	Ashtavinayak y Elizabeth, 2016
-	<i>Zymomonas</i>	<i>Z. mobilis</i>	Bokulich y Bamforth, 2013	

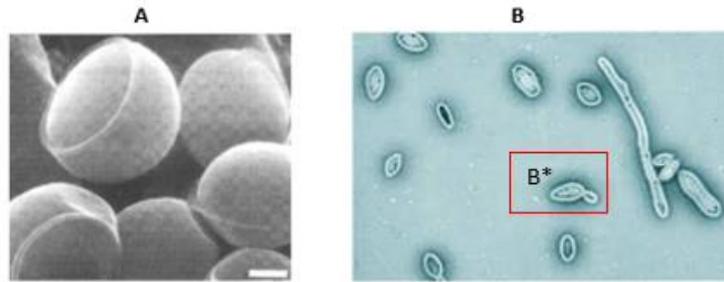
### 6.3.2.HONGOS CONTAMINANTES

Aunque se han detectado muchos hongos en diferentes fuentes de contaminación de la cerveza como la malta, solo algunos de ellos, que suelen ser patógenos de plantas, tienen peso a la hora de determinar la calidad de la cerveza (Bokulich y Bamforth, 2013). Los hongos del género *Fusarium* son los más destacados, concretamente las especies *Fusarium graminearum* y *F. culmorum* (Rouse y van Sinderen, 2008). Estas producen micotoxinas como el deoxinivalenol (DON) que, además de poder causar daño en humanos, pueden inhibir el crecimiento de las levaduras durante la fermentación (Bokulich y Bamforth, 2013).

Algunas especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* también han sido detectadas en cereales con los que se produce cerveza durante el almacenamiento. El peligro de la contaminación con hongos de estos géneros radica en que son capaces de producir Ocratoxina A, que es un compuesto carcinógeno en animales y del cual se sospecha que puede ser carcinógeno en humanos. Además, algunas especies de *Aspergillus* pueden producir Aflatoxinas como la Aflatoxina B1, que es un carcinógeno potencial para seres humanos (Rouse y van Sinderen, 2008).

Aun así, cabe destacar que dentro de este grupo de contaminantes también se encuentran las levaduras salvajes, las cuales tienen una mayor importancia en la calidad del producto. Las levaduras salvajes pueden ser aisladas en cualquier etapa del proceso, pero suelen contaminar la cerveza en la etapa de fermentación o en la de acondicionamiento del producto (Obi, 2017). Estas levaduras salvajes pueden deteriorar la cerveza de diferentes formas, como son la producción de compuestos fenólicos que dan mal sabor a la cerveza (conocidos como “phenolic off-flavour” o “POF”), la generación de turbidez o neblina, la generación de sedimento, y otras formas (Bokulich y Bamforth, 2013).

La levadura salvaje contaminante más común es *Pichia membranefaciens* (Fig. 14), la cual afecta tanto al vino como a la cerveza (Obi, 2017), seguida de levaduras del género *Candida* (Rouse y van Sinderen, 2008). También pueden ser los géneros *Brettanomyces* (Fig. 14) y *Dekkera*, aunque no suelen ser relevantes porque no pueden sobrevivir en las condiciones anaeróbicas en las que se produce la fermentación. Otro tipo de levaduras contaminantes son las aeróbicas, donde encontramos géneros como *Debbaromyces* y *Williopsis* (que producen sabores estéricos), o las fermentativas como los géneros *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspora* y *Zygosaccharomyces* (que producen neblina y turbidez) (Obi, 2017).



**Figura 14.** Morfología de *Pichia membranefaciens* (A), *Brettanomyces* sp. (B) y *Brettanomyces* sp. realizando la gemación (B\*). Tomadas de Info Wine, 2017 (A) y MycoCosm, 2022 (B).

Otra levadura que también causa comúnmente el deterioro de la cerveza es la especie *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*, la cual crece en cervezas tipo lager y ale (y a veces en cerveza agria) ya terminadas y embotelladas. Esta levadura es una levadura super atenuante, es decir, que crea sabores no agradables ni buscados, que genera niveles de alcohol diferentes a los requeridos y que, debido a su acción, y presencia, genera una cantidad extra de presión que puede llevar a que las botellas de cerveza exploten. A este grupo también pertenecen las levaduras del género *Brettanomyces* (Chai, 2022)

### 6.3.3. PROTOZOOS CONTAMINANTES

Los protozoos más destacados en la contaminación de la cerveza son aquellos del género *Cryptosporidium* y *Giardia*. Estos provienen sobre todo del agua usada para la filtración, ya que la que se usa para elaborar la cerveza va tratada y hervida durante 45 minutos, por lo que no se encuentra contaminada. Estos no son contaminantes muy comunes porque está estudiado que *Giardia* no sobrevive al etanol al 5% v/v ni al pH de 4,3 que tiene de media la cerveza (Menz et al., 2009), ni los ooquistes de *Cryptosporidium* a una temperatura de entre 4°C y 22°C más de 24 horas, ni a la alta cantidad de dióxido de carbono ni al bajo pH presente en la cerveza (Friedman et al., 1997).

### 6.4. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA DURANTE EL PROCESO DE ELABORACIÓN

Es importante realizar la detección de contaminantes durante el proceso de elaboración para evitar gastos innecesarios, sabores no buscados e incidentes como botellas reventadas. Para ello se usan diferentes métodos de detección de microorganismos (Chai + PIKA, 2022). La detección de la contaminación microbiológica en la cerveza se puede llevar a cabo mediante las técnicas pertenecientes a cualquiera de los 2 grandes grupos existentes, los cuales son la microbiología tradicional y la microbiología basada en la biología molecular (Biomérieux, 2021).

### ***Microbiología tradicional***

La microbiología tradicional se basa en la capacidad que tienen los diferentes microorganismos (tanto bacterias como levaduras) para crecer en medios de cultivo artificiales. Algunos de los métodos de identificación de microorganismos englobados en este grupo son el recuento de microorganismos en placa, la filtración por membrana o la observación de los cambios de color del medio debidos al metabolismo de estos (Xu et al., 2020) (Biomérieux, 2021). Estos métodos tienen varias ventajas, como el bajo coste del equipo y la simplicidad. Sin embargo, también tienen ciertos inconvenientes, como son la falta de sensibilidad y especificidad, la incapacidad de cuantificar los microorganismos presentes en el producto y la posibilidad de falsos negativos por los microorganismos viables pero no cultivables (Biomérieux, 2021), estado dentro del cual pueden entrar las bacterias ácido-lácticas (reducen sus funciones metabólicas, cambian sus componentes de membrana y reducen el número de células de la colonia), causantes de casi el 70% de los incidentes (Xu et al., 2020). Todo esto puede conllevar a que no se tomen las decisiones adecuadas y, por tanto, a pérdidas innecesarias. Además, se necesita un operador bien entrenado, material y salas estériles (Biomérieux, 2021).

Dentro de este tipo de técnicas, la más usada es el recuento en placa. Este tiene una desventaja importante, la cual radica en que, al ser diferentes contaminantes, crecen en diferentes medios. Por ejemplo, las bacterias ácido-lácticas crecen en el medio Agar MRS (agar de Man, Rogosa y Sharpe), tardando 10 días en crecer, viéndose reducido este tiempo a 5 días si se añade catalasa al medio. Otras bacterias como *Bacillus cereus*, algunas del género *Enterobacter* o del género *Staphylococcus*, y hongos como *Candida*, crecen y se identifican en un Agar cromogénico (Xu et al., 2020).

Para contrarrestar la desventaja que supone la existencia de los microorganismos viables no cultivables, se ha desarrollado una forma de poder detectarlos mediante estas técnicas, aunque es complicado. Para ello se debe añadir naranja de acridina, usar el kit de viabilidad bacteriana Live/Dead BacLight y observarlas en microscopio de fluorescencia (Xu et al., 2020).

### ***Microbiología basada en la biología molecular***

La microbiología basada en la biología molecular incluye técnicas más modernas, como es la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esta técnica se basa en ampliar el material genético de los microorganismos presentes para detectarlos. Estos métodos tienen como ventaja principal la rapidez, ya que no hay que esperar una serie de días para el crecimiento de los

microorganismos, sino que dan los resultados en horas. A esto se le suma la facilidad a la hora de manejar el equipo (ya que no se necesita un gran entrenamiento para ello), la alta sensibilidad y selectividad, y la capacidad de medir diferentes parámetros. En contraposición, el equipo necesario para realizar una PCR es más caro, ya que se requiere de un termociclador, una centrifuga y un detector (Biomérieux, 2021).

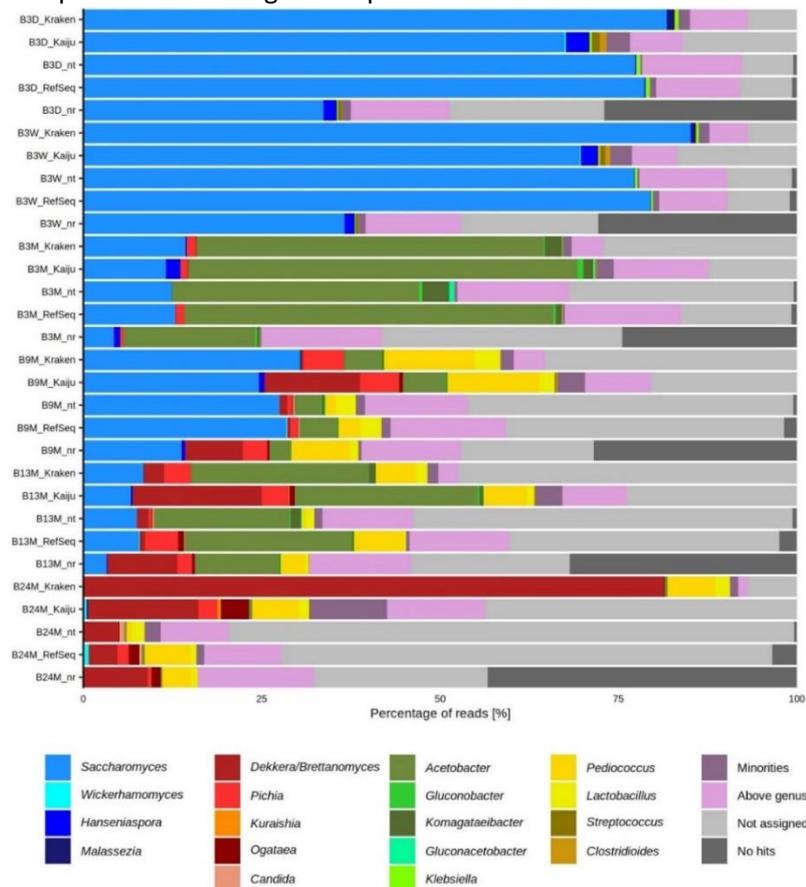
Hoy en día se está tendiendo más hacia el uso de las técnicas basadas en la biología molecular debido a sus ventajas (Biomérieux, 2021). De hecho, actualmente existen kits comerciales de detección de microorganismos en la cerveza mediante técnicas de análisis genómico, concretamente mediante PCR. Estos han sido desarrollados por la empresa Chai®, y existen kits para detectar y cuantificar *Lactobacillus* y *Pediococcus*, bacterias ácido-acéticas, *Pectinatus*, levaduras super atenuantes (*Brettanomyces* y *S. cerevisiae* var. *diastaticus*) y más (Chai + PIKA, 2022). Otras empresas también han desarrollado este tipo de kits, como por ejemplo Biomérieux, que introdujo en el mercado el Veriflow®, útil para detectar *Lactobacillus*, *Pediococcus* y otras bacterias ácido-lácticas, *Megasphaera*, *Pectinatus* y levaduras como *Brettanomyces* o *S. cerevisiae* var. *diastaticus* (Biomérieux, 2022).

Estos kits de detección no se aplican en cualquier etapa del proceso de elaboración, sino que existen recomendaciones sobre cuáles deben ser los puntos de control del proceso. Estos suelen ser la inoculación de la levadura, la fermentación, el paso a los tanques de maduración justo al acabar la fermentación, el llenado y embotellado y también se suele realizar el control en las cervezas ya envasadas (Chai + PIKA, 2022).

Aparte de la PCR, dentro de los métodos basados en la biología molecular y en la amplificación del material genético, existen otros como el LAMP (loop-mediated amplification, válido para detectar *Lactobacillus acidophilus*), el RCA (Rolling circle amplification, válido para detectar *Lactobacillus acetotolerans*), el SDA (strand displacement amplification) y el CPA (cross-priming amplification). Estos requieren múltiples enzimas o reactivos especiales, pero no cambios de temperatura como la PCR (Xu et al., 2020).

Además, existen las técnicas NGS (New Generation Sequencing) o de metagenómica, las cuales permiten la identificación de los microorganismos presentes en la cerveza, su cuantificación relativa y el estudio de la evolución de las poblaciones a lo largo del proceso. Para ello se aísla del ADN total de las muestras sin cultivar los microorganismos y se amplifica con cebadores

específicos basados en el 16S o 23S de bacterias o en el 18S de hongos y levaduras. Posteriormente, mediante un análisis bioinformático de los datos se revela el porcentaje de pertenencia del microorganismo a cada taxón y la evolución a lo largo del tiempo en el proceso de elaboración de la cerveza. Sumado a esto, este tipo de análisis permite conocer las capacidades metabólicas de estos microorganismos y las rutas metabólicas que seguirán. Con esta información se puede deducir si tendrán un comportamiento negativo que alterará la calidad de la cerveza. En la Figura 15 puede observarse el resultado de un análisis metagenómico, donde se ve la evolución durante el proceso de elaboración de cerveza. En este se observa el enriquecimiento en lecturas de material genético de *Saccharomyces* y cómo su población va desplazando a otros géneros presentes inicialmente en la cerveza (Fig. 15).



**Figura 15.** Análisis metagenómico de las poblaciones de microorganismos presentes en los diversos estadios de la elaboración de cerveza. Tomado de De Roos et al., 2020.

Cabe destacar que existen otros métodos no englobados dentro de ninguno de estos grupos, como es el caso del MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry), que es una espectrometría de masas válida para detectar especies como *Lactobacillus fermentum*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *Leuconostoc* spp. e incluso *Candida* spp. (Xu et al., 2020).

## 7.CONCLUSIONES

1. La cerveza es un alimento cuya fecha de origen no está del todo clara, pero se sabe que fue fabricada hace miles de años por diferentes culturas y que ha ido satisfaciendo diferentes necesidades a lo largo de la historia del ser humano.
2. Es uno de los alimentos más consumidos del planeta y, por ello, su mercado mueve una gran cantidad de dinero.
3. Sus ingredientes principales son agua, lúpulo, malta de cebada y levadura, aunque se pueden añadir o cambiar por otros diferentes para conseguir productos que agraden a todo tipo de consumidores.
4. A pesar de ser un alimento difícilmente contaminable debido a sus características, existen microorganismos capaces de crecer en la cerveza, causando su deterioro y llevando a pérdidas importantes de tiempo y dinero en la industria. Por ello, hay que establecer sistemas de vigilancia microbiológica en diferentes puntos del proceso de elaboración.
5. Los microorganismos causantes del deterioro de la cerveza son muy variados y pueden alterar sus características de diferentes formas, generando productos no válidos para el mercado debido a olores, sabores, texturas o características visuales no agradables para el consumidor.
6. Aunque existen diferentes tipos de métodos de detección, la corriente actual apunta hacia el uso más común de las técnicas basadas en la microbiología molecular debido a la gran diferencia de sensibilidad y al ahorro de tiempo que estas suponen respecto a las técnicas basadas en el cultivo de microorganismos.

## 8.BIBLIOGRAFÍA

1. Abbott M. Brewing in the Medieval Period: How Beer and Ale Developed into a Commercial Industry. HTS. 2018;407. Disponible en: <https://ir.library.oregonstate.edu/concern/defaults/jh343z53s>
2. Acevedo-Díaz JA y García-Carmona A. Uso de la historia de la ciencia para comprender aspectos de la naturaleza de la ciencia. Fundamentación de una propuesta basada en la controversia Pasteur versus Liebig sobre la fermentación. CTS. 2016;11(33):203-226. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=92447592011>
3. Ackermann K. Alcohol by volumen (ABV): Beer, wine and liquor [Internet]. 2021. [Consultado en marzo de 2022]. Disponible en: <https://www.alcohol.org/statistics-information/abv/>

4. Anderson HE, Santos IC, Hildenbrand ZL y Schug KA. A Review of the Analytical Methods used for Beer Ingredient and Finished Product Analysis and Quality Control. *Analytica Chimica Acta*. 2019. Disponible en: <https://sci-hub.hkvisa.net/10.1016/j.aca.2019.07.061#>
5. Ashtavinayak P y Elizabeth H. Review: Gram Negative Bacteria in Brewing. *Advances in Microbiology*. 2016;6(3):195-209. Disponible en: [10.4236/aim.2016.63020](https://doi.org/10.4236/aim.2016.63020).
6. Bamforth CW. Beer: Tap into the Art and Science of Brewing. *Journal of Chemil Education*. 2007;84(10):1609. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ed084p1609.1>
7. Barth-Haas Group. Ranking de los países líderes en producción de cerveza en el mundo en 2020 (en miles de hectolitros) [Internet]. 2020. [Consultado en marzo de 2022]. Disponible en: <https://es.statista.com/estadisticas/1147467/lideres-produccion-cerveza-mundial/>
8. Biomérieux. Part 5 – Beer spoilage detection: what technological choices? [Internet]. 2021. [Consultado en mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.biomerieux-industry.com/es/node/1187> <https://www.biomerieux-industry.com/products/veriflow>
9. Bokulich NA y Bamforth CW. The microbiology of malting and brewing. *MMBR*. 2013;77(2),157-172. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3668669/>
10. Brewers of Europe. Volumen de producción de cerveza en Europa en 2020, por país (en miles de hectolitros). [Internet]. 2020. [Consultado en marzo de 2022]. Disponible en: <https://es.statista.com/estadisticas/1147479/produccion-europea-por-pais/>
11. Cabras I y Higgins DM. Beer, brewing, and business history. *Business History*. 2016; 58(5):609-624. Disponible en: [10.1080/00076791.2015.1122713](https://doi.org/10.1080/00076791.2015.1122713)
12. Castellví S (Acadèmia Catalana de Gastronomia i Nutrició). Los cereales y el gluten. [Internet]. Cataluña: 2015. [Consultado en abril de 2022]. Disponible en: <https://acgn.cat/los-cereales-y-el-gluten/>
13. Chai+PIKA. Brewing quality solutions. Making Better Quality Decisions in Real-Time [Internet]. 2022. [Consultado en mayo de 2022]. Disponible en: [https://www.chaibio.com/beer-spoilage?utm\\_campaign=12617058473&utm\\_source=google&utm\\_medium=cpc&utm\\_content=509566329497&utm\\_term=beer%20spoilage&adgroupid=123857593350&gclid=EAlaIqObChMI-OTI9vzS9gIVtIKDBx3OWwWzEAAYASAAEgJty\\_D\\_BwE](https://www.chaibio.com/beer-spoilage?utm_campaign=12617058473&utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_content=509566329497&utm_term=beer%20spoilage&adgroupid=123857593350&gclid=EAlaIqObChMI-OTI9vzS9gIVtIKDBx3OWwWzEAAYASAAEgJty_D_BwE).  
<https://www.chaibio.com/saccharomyces-diastaticus-pcr-test-kit>.

- <https://www.chaibio.com/superattenuator-yeasts-pcr-test-kit>.
- <https://www.chaibio.com/pcr-test-kits/beer-spoilage/bacteria>
14. Conduah J, Kusakana K y Hohne PA. Energy efficiency improvements in a microbrewery in South Africa. *OI*. 2019;132–137. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/336284191\\_Energy\\_Efficiency\\_Improvements\\_in\\_a\\_Microbrewery\\_in\\_South\\_Africa#fullTextFileContent](https://www.researchgate.net/publication/336284191_Energy_Efficiency_Improvements_in_a_Microbrewery_in_South_Africa#fullTextFileContent)
  15. De Roos J, Verce M, Weckx S y De Vuyst L. Temporal Shotgun Metagenomics Revealed the Potential Metabolic Capabilities of Specific Microorganisms During Lambic Beer Production. *Frontiers in Microbiology*. 2020 ;11. Disponible en : <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01692>
  16. Dysvik A, La Rosa SL, Liland KH, Myhrer KS, Østlie HM, De Rouck G et al. Co-fermentation Involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* Species Tolerant to Brewing-Related Stress Factors for Controlled and Rapid Production of Sour Beer. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11:279. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00279>
  17. Escuela cervecera. ¿Cervezas con bacterias? [Internet]. 2018. [Consultado en mayo de 2022]. Disponible en: <https://blog.escuelacervecera.com/2018/10/29/cervezas-con-bacterias/>
  18. Federación de Asociaciones de Celíacos de España. Cervezas sin gluten [Internet]. 2018 [Consultado en abril de 2022]. Disponible en: <https://celiacos.org/cervezas-sin-gluten/>
  19. Fraunhofer ME, Geissler AJ, Wefers D, Bunzel M, Jakob F y Vogel RF. Characterization of  $\beta$ -glucan formation by *Lactobacillus brevis* TMW 1.2112 isolated from slimy spoiled beer. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;107(Part A):874–881. Disponible en: <https://sci-hub.hkvisa.net/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.063>
  20. Friedman DE, Patten KA, Rose JB y Barney MC. The potential for *Cryptosporidium parvum* oocyst survival in beverages associated with contaminated tap water. *Journal of Food Safety*. 1997;17:125-132. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/229451478\\_The\\_potential\\_for\\_Cryptosporidium\\_parvum\\_oocyst\\_survival\\_in\\_beverages\\_associated\\_with\\_contaminated\\_tap\\_water](https://www.researchgate.net/publication/229451478_The_potential_for_Cryptosporidium_parvum_oocyst_survival_in_beverages_associated_with_contaminated_tap_water)
  21. Hughes G. Home brew beer. 1ª ed. Reino Unido: Dorling Kindersley Limited; 2013.
  22. Menz G, Aldred P y Vrieskoop F. Beer in Health and Disease Prevention: Pathogens in Beer. 2009;403–413. Disponible en: <https://sci-hub.hkvisa.net/10.1016/B978-0-12-373891-2.00039-0>

23. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Cerveza. [Internet]. 2013. [Consultado en marzo de 2022]. Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/cerveza\\_tcm30-102898.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/cerveza_tcm30-102898.pdf)
24. NCMI. *Rothia kristinae* [Internet] [Consultado en abril de 2022]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=37923>
25. Nelson M. The Barbarian's Beverage: A History of Beer in Ancient Europe. London, England: Routledge; 2005. Disponible en: <https://books.google.at/books?id=NR5LeH291iOC>
26. Obi CN. Brewery contaminants, challenges and remedies – A review. Nigerian Journal of Microbiology. 2017;31(1):3926-3940. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/328031318\\_Brewery\\_Contaminants\\_Challenges\\_and\\_Remedies-A\\_Review](https://www.researchgate.net/publication/328031318_Brewery_Contaminants_Challenges_and_Remedies-A_Review)
27. Pereira de Moura F y Rocha dos Santos T. A comparative study of dry and wet milling of barley malt and its influence on granulometry and wort composition. Beverages. 2018;4(3):51. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/beverages4030051>
28. Poelmans E y Swinnen JF. A brief economic History of beer. The economics of beer. 2012;1. Disponible en: [https://www.researchgate.net/profile/Johan-Swinnen/publication/268043355\\_A\\_Brief\\_Economic\\_History\\_of\\_Beer/links/54d9d8650cf2970e4e7cea79/A-Brief-Economic-History-of-Beer.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Johan-Swinnen/publication/268043355_A_Brief_Economic_History_of_Beer/links/54d9d8650cf2970e4e7cea79/A-Brief-Economic-History-of-Beer.pdf)
29. Priest FG y Campbell I. Brewing microbiology. 3rd edición. Edinburgh: Springer; 2003. Disponible en: [file:///C:/Users/F541/Downloads/vdoc.pub\\_brewing-microbiology.pdf](file:///C:/Users/F541/Downloads/vdoc.pub_brewing-microbiology.pdf)
30. 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*, nº 304, de 17 de septiembre de 2016. Disponible en: [https://www.boe.es/diario\\_boe/txt.php?id=BOE-A-2016-11952](https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2016-11952)
31. Ritchie H y Roser M. Alcohol Consumption. [Internet]. 2018. [Consultado en marzo de 2022]. Disponible en: <https://ourworldindata.org/alcohol-consumption>
32. Rodhouse L y Carbonero F. Overview of craft brewing specificities and potentially associated microbiota. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2017. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2017.1378616>
33. Rodríguez-Saavedra M, González de Llano D y Victoria Moreno-Arribas M. Beer spoilage lactic acid bacteria from craft brewery microbiota: microbiological quality and food

- safety. Food Research International. 2020;138 A. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109762>
34. Rouse S y van Sinderen D. Bioprotective potential of lactic acid bacteria in malting and brewing. Journal of Food Protection. 2008;71(8):1724-1733. Disponible en: <https://sci-hub.hkvisa.net/10.4315/0362-028X-71.8.1724>
35. Sakamoto K y Konings WN. Beer spoilage bacteria and hop resistance. International Journal of Food Microbiology. 2003;89:105-124. Disponible en: [https://sci-hub.hkvisa.net/10.1016/s0168-1605\(03\)00153-3](https://sci-hub.hkvisa.net/10.1016/s0168-1605(03)00153-3)
36. Shopska V, Denkova-Kostova R y Kostov G. Modeling in Brewing—A Review. Processes 2022;10:267. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/pr10020267>
37. Sinha NK. Handbook of food products manufacturing. New York: Wiley-Intersciencie; 2007. Disponible en: <https://books.google.at/books?id=dZdhkaR9NzoC>
38. Sohravandi S, Mortazavian AM y Rezaei K. Health-Related Aspects of Beer: A Review. International Journal of Food Properties. 2012;15(2):350-373. Disponible en: [10.1080/10942912.2010.487627](https://doi.org/10.1080/10942912.2010.487627)
39. Weiss Adamson M. Food in medieval times. London: Greenwood Press; 2004. Disponible en: <https://ia801205.us.archive.org/24/items/tgReferencesfolder/Food%20in%20Medieval%20Times.pdf>
40. Wunderlich S y Back W. Beer in Health and Disease Prevention: Overview of manufacturing beer, Ingredients, processes, and quality criteria. Beer in Health and Disease Prevention. 2009;1–16. Disponible en: <https://sci-hub.hkvisa.net/10.1016/B978-0-12-373891-2.00001-8>
41. Xu Z, Luo Y, Mao Y, Peng R, Chen J, Soteyome T et al. Spoilage lactic acid bacteria in the brewing industry. Journal Microbiology and Biotechnology. 2020;30(7): 955–961. Disponible en: <https://www.jmb.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/jmb.1908.08069>
42. Yu Z, Luo Q, Xiao L, Sun Y, Li R, Sun Z et al. Beer-spoilage characteristics of *Staphylococcus xylosus* newly isolated from craft beer and its potential to influence beer quality. Food Science & Nutrition. 2019;7(12), 3950- 3957. Disponible en: [https://sci-hub.hkvisa.net/https://www.researchgate.net/publication/337300673\\_Beer-spoilage\\_characteristics\\_of\\_Staphylococcus\\_xylosus\\_newly\\_isolated\\_from\\_craft\\_beer\\_and\\_its\\_potential\\_to\\_influence\\_beer\\_quality/citations](https://sci-hub.hkvisa.net/https://www.researchgate.net/publication/337300673_Beer-spoilage_characteristics_of_Staphylococcus_xylosus_newly_isolated_from_craft_beer_and_its_potential_to_influence_beer_quality/citations)

43. Zamora F. Biochemistry of alcoholic fermentation. En: Zamora F. Wine Chemistry and Biochemistry. New York: Springer; 2008. 3–26. Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5_1)