

5. INVESTIGACIÓN Y CIENCIA

BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS QUE DETERIORAN LA CERVEZA

Karla Jiménez Morato¹, Maritere Domínguez Rojas^{2}, Magaly Rodríguez Saavedra³*

¹Pasante de la Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

^{2*}Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, UNAM, Av. Primero de Mayo S/N, Santa María Guadalupe las Torres, 54740 Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México

³Investigadora 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; maritere.dominguez@cuautitlan.unam.mx

Palabras clave: cerveza, bacterias ácido-lácticas, HorA, HorC y aminos biógenos

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 aminos biógenos (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 α -isoácidos) que actúan como ionofóros (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*, *Pediococcus* 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 α -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 (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 *hitA* 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), quienes, a través de enzimas descarboxilan 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, a temperatura ambiente y descarbonatadas

Para el proyecto se seleccionaron seis microorganismos de cepas de 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 que se observan en la Figura 2. Los aislamientos de BAL de *Lactobacillus*, *Pediococcus* 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 *Pediococcus* 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 (*horA* y *horC*). A diferencia de los dos aislamientos de *L. brevis* (CIAL-BL1 y CIAL-BDI) que presentaron los genes *horA* y *horC*, 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.

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

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

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 inoculada	Cerveza deteriorada	gen 16S rRNA	Resistencia al lúpulo			
			<i>horA</i>	<i>horC</i>	<i>hitA</i>	ORF5
CIAL-B1	B1 y B2	+	-	-	-	+
CIAL-BF1	B1,B2,B4,B6,B7 y B8	+	-	-	-	-
CIAL-PF	B1 y B2	+	-	-	-	-
CIAL-B3	B1 y B2	+	-	-	-	-
CIAL-B6	B1 y B2	+	-	-	-	+
CIAL-BD1	Todas excepto B11	+	+	+	-	+
CIAL-BL1	Todas excepto B11	+	+	+	+	+

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

BAL	GENES DE AB			Cuantificación de AB en cerveza B1 (mg L ⁻¹)	
	<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*

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:

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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/pdfs/BOE-A-2016-11952.pdf>

5. 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.
6. 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.
7. Behr J, et al. Mechanisms of hop inhibition: hop ionophores. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2009; 57(14): 6074-6081.
8. 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.
9. Barbieri F, et al. Biogenic amine production by lactic acid bacteria: a review. *Foods*, 2019; 8(1): 1-17.
10. 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.