

Reny Orosman Matheus Zerpa

**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA MICROBIOTA EN
CERVEZAS ÁCIDAS DE FERMENTACIÓN
ESPONTANEA EN CERVESES LA PIRATA**

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

Dirigido por Dra. María Jesús Torija y Msc. Arán León

Máster en BEBIDAS FERMENTADAS

Facultat d'Enologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

**Tarragona
01 de Septiembre de 2021**

TABLA DE CONTENIDO.

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCIÓN.....	2
III.	OBJETIVOS.....	10
IV.	METODOLOGÍA.....	11
	IV.1 Preparación de fermentadores.....	12
	IV.2 Toma de muestras y análisis de densidad y pH.....	15
	IV.3 Toma de muestras y siembra en medios de cultivo.....	15
	IV.4 Aislamiento e Identificación de microorganismos.....	16
V	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	18
	V.1 Parámetros indicativos de Fermentación.....	18
	V.2 Observación de microorganismos por Microscopía Óptica.....	22
	V.3 Crecimiento de Colonias en placas de medios de cultivo.....	23
	V.4 Identificación de microorganismos: Pruebas Moleculares para Levaduras y Pruebas Bioquímicas Orientativas para Bacterias.....	26
VI.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	34
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	35
VIII.	ANEXOS.....	37
	Anexo 1 Toma de muestras fisicoquímicas.....	37
	Anexo 2 Análisis de densidad y pH.....	37
	Anexo 3 Toma de muestras microbiológicas.....	38
	Anexo 4 Preparación de medios de cultivo.....	38
	Anexo 5 Siembra en medios de cultivo.....	39
	Anexo 6 Aislamiento de microorganismos.....	41
	Anexo 7 Evaluación por Microscopía Óptica y observación de colonias en placa	41
	Anexo 8 Tinción de GRAM y Catalasa.....	42
	Anexo 9 PCR y Electroforesis Horizontal en gel de Agarosa.....	43
	Anexo 10 Imágenes ampliadas el microscopio óptico y las colonias en placa....	45

CAPITULO I. RESUMEN

Las cervezas ácidas de fermentación espontánea son de los estilos más antiguos, raros y únicos en el mundo. Representante por excelencia de este estilo de cerveza es la Cerveza Lambic, la cual tiene un peculiar método de elaboración, tradición de más de 400 años y solo puede ser producida en Bélgica, su lugar de origen.

En este trabajo se estudió de forma preliminar la microbiota existente en la cerveza de fermentación espontánea proveniente del ambiente del entorno de Cerveces La Pirata, la utilidad o pertinencia de dicha microbiota para elaborar cervezas ácidas de fermentación espontánea y la estación del año idónea para realizar este proceso en la cervecería. Como consecuencia de los resultados obtenidos se evaluó la aleatoriedad/incertidumbre de la fermentación espontánea del mosto cervecero.

Para lograr estos objetivos se colocó a enfriar por una noche de forma natural, mosto cervecero recién hervido, de 14° Plato sin lúpulo, en el entorno de Cerveces La Pirata con el fin que se inoculara de forma espontánea la microbiota del ambiente. Luego los fermentadores se colocaron en un lugar específico de la cervecería y se realizó seguimiento fisicoquímico y microbiológico a la fermentación. Este procedimiento se hizo en las estaciones de invierno y primavera por duplicado (dos fermentadores en cada estación del año).

Los resultados de densidad y pH en los fermentadores mostraron que tanto en la estación de invierno como en la de primavera uno de los fermentadores colocados presentó atenuación aparente inferior al 12% mientras que el otro mayor al 90%, lo que nos da un indicio de lo aleatorio o impredecible que puede ser el proceso de fermentación espontánea. También se observó en los fermentadores con buena atenuación, que la velocidad de atenuación fue mayor en el fermentador de primavera, lo que supone un efecto de la temperatura de esa época del año sobre la velocidad de atenuación. El pH de todos los fermentadores estuvo dentro de los rangos habituales para las cervezas ácidas de fermentación espontánea.

Los microorganismos presumiblemente encontrados en los fermentadores evaluados fueron Levaduras *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. pastorianus* o *S. bayanus*); Levaduras *No Saccharomyces* (varios géneros y/o especies entre ellas *Brettanomyces bruxellensis*); Bacterias Lácticas como *Lactobacillus* y *Pediococcus* y Bacterias Acéticas como *Acetobacter*. Estos microorganismos son de interés y pertinencia para la elaboración de cervezas ácidas de fermentación espontánea.

Los fermentadores colocados en Primavera además de una mayor velocidad de atenuación, presentaron Mohos en la muestra de mosto al día siguiente del enfriamiento natural, posiblemente por las condiciones de temperatura y humedad del ambiente, que nos lleva a pensar que quizás no es la mejor época del año para llevar a cabo fermentaciones espontáneas dado que los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos pueden sufrir alteraciones y dichas "fermentaciones salvajes" podrían generar perfiles organolépticos indeseados en la cerveza obtenida.

CAPITULO II. INTRODUCCIÓN

“Se necesitan algunos meses para obtener un producto bebible, algunos años para obtener un producto agradable y toda una vida para hacer el mejor producto”.

-Frank Boon of Brouwerij Boon-

Las cervezas de fermentación espontánea tienen cada vez más adeptos en el mundo cervecero. Es posible que exista un poco de arrogancia en quienes dicen ser los acérrimos seguidores de estos estilos debido a que no es sencillo apreciar el gusto por estas cervezas cuando se prueban por primera vez. Lo normal es que se requiera de un consumidor algo capacitado para entender y disfrutar a tope estas cervezas, por eso si decimos que nos gustan las lámbicas, de alguna manera estamos dejando claro que no somos novatos en esto (Anegon, 2015).

El origen de las cervezas de fermentación espontánea está en Bélgica, concretamente en la región de Flandes, de donde proceden los estilos paradigmáticos de este tipo de cervezas como las lámbicas o las gueuze. En realidad, prácticamente todas las cervezas eran de fermentación espontánea en mayor o menor medida hasta 1857, año en que Pasteur descubrió la levadura como responsable de la fermentación.

La forma de elaborar las cervezas de fermentación espontánea (como las lámbicas tradicionales) y que la diferencia de los otros tipos de cerveza es, que tras la fase de hervido el mosto se trasiega a piscinas de enfriado (coolship) donde son inoculadas de manera natural por los microorganismos del ambiente durante la noche. Luego se trasiega el mosto a barricas de roble o castaño donde comienza una fermentación que puede durar hasta tres años.

Una de las razones por las que este tipo de cervezas se consideran tan especiales se basa en una explicación razonable: y es que con estos estilos se podría sacar a la luz el concepto de «terroir», una de las grandes quimeras de los cerveceros. No es fácil justificar la idea de «terroir» en las cervezas puesto que por lo general los ingredientes proceden de fuera de la zona donde se elaboran. A diferencia del vino, las materias primas en la cerveza suelen tener orígenes remotos, muchas veces en malterías o en campos de cultivo de lúpulo de otros países. **Pero si se deja fermentar la cerveza al aire a disposición de las levaduras y bacterias del entorno, entonces sí estamos añadiendo un factor «local» al producto, el alma del «terroir», la característica de dicha tierra que puede no repetirse en ningún otro lugar, como es el caso de las Lambic.**

Los microorganismos que hacen especial a la cerveza de fermentación espontánea son: levaduras (*Saccharomyces* y *No Saccharomyces* como *Brettanomyces*) y bacterias (*Enterobacterias*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Acetobacterias*).

Las levaduras son microorganismos eucariotas unicelulares (hongos microscópicos) clasificados como ascomicetos o basidiomicetos, generalmente caracterizados por dividirse asexualmente por gemación o bipartición y por tener estados sexuales que no están adjuntos a un esporocarpio (cuerpo fructífero).

Las levaduras son importantes por su capacidad para realizar la fermentación (predominantemente alcohólica) de azúcares o hidratos de carbono, produciendo distintas sustancias.

Los géneros de levadura que son importantes para las cervezas de fermentación espontánea son los géneros *Saccharomyces* y *No Saccharomyces* (*Brettanomyces*, *Candidas*, *Pichias*, etc.).

- **Levaduras *Saccharomyces*:** Actualmente el grupo *Saccharomyces* sensu stricto está formado por un grupo de 8 especies de levaduras estrechamente relacionadas (*S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. uvarum*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. arboricola*, *S. eubayanus* y *S. jurei*) y de dos híbridos naturales (*S. bayanus*, *S. pastorianus*). La variación genética de las Levaduras *Saccharomyces* es alta a nivel de cepa, tanto en términos fenotípicos como moleculares.

Las especies de levaduras de interés para la elaboración de cerveza son *Saccharomyces cerevisiae* y *pastorianus*.

- ***Saccharomyces cerevisiae*:** Es la especie de levadura más importante y conocida, actualmente es la levadura mejor estudiada tanto en sus características fisiológicas como genéticas, de hecho fue la 1era levadura a la que se secuenció su genoma completo (Goffeau et al., 1996). Está levadura es la utilizada para la elaboración de cervezas de alta fermentación (Cervezas tipo Ale) y tiene la capacidad de fermentar en un amplio rango de temperaturas (entre 16°C y 35°C).
- ***Saccharomyces pastorianus*:** es un híbrido de *Saccharomyces eubayanus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Es la levadura utilizada en la elaboración de cervezas de baja fermentación (Cervezas tipo Lager) en donde las temperaturas de fermentación son más bajas pero la tasa de crecimiento celular para estas levaduras es adecuada en un rango entre los 6°C y 18°C

- **Levaduras No *Saccharomyces*:** A este grupo pertenecen todas las levaduras de géneros distintos a *Saccharomyces*. En cervezas de fermentación espontánea las levaduras *No Saccharomyces* de mayor interés son *Brettanomyces* pero también podemos encontrar levaduras oxidativas como *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Kloeckera* y *Pichia* (Sparrow, 2005).
 - ***Brettanomyces/Dekkera*:** Levadura salvaje importante en la fabricación de cerveza y vino ya que es resistente al etanol (alcohol), por lo que puede crecer tras el comienzo de la fermentación. Una característica de esta levadura es que es una superviviente nata incluso en ambientes escasos de nutrientes, como en la madera. La beta-glucosidasa es una enzima producida por *Brettanomyces* que le permite reproducirse en presencia de un sacárido presente en la madera, la celobiosa. La enzima reduce la celobiosa y produce glucosa aportando energía a las células (Anegon, 2015).
 - ***Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Kloeckera* y *Pichia*:** Levaduras consideradas de efecto oxidativo en la fermentación espontánea ya que pueden producir copiosas cantidades de ácido acético cuando hay presencia de oxígeno. Estas levaduras flotan hacia la superficie formando un velo junto a *Brettanomyces* que eventualmente protegerá a la cerveza de la entrada de otros microorganismos y de oxígeno.

Las bacterias son microorganismos que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (por lo general entre 0,5 y 5 μm de longitud) y diversas formas, incluyendo esferas (cocos), barras (bacilos), filamentos curvados (vibrios) y helicoidales (espirilos y espiroquetas). Las bacterias son células procariotas, por lo que, a diferencia de las células eucariotas (como las levaduras) no tienen el núcleo definido ni presentan, en general, orgánulos membranosos internos. Generalmente poseen una pared celular y esta se compone de peptidoglicano (también llamado mureína). Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles.

Las bacterias de mayor interés en la elaboración de cervezas de fermentación espontánea son bacterias lácticas, acéticas y enterobacterias. Curiosamente en el mundo cervecero estas bacterias se asocian en general a cervezas contaminadas. De hecho la bacteria *Lactobacillus brevis*, una bacteria habitual en cervezas contaminadas, es resistente al efecto antibiótico del lúpulo.

Dentro de las bacterias de interés para la elaboración de cervezas de fermentación espontánea tenemos:

- ***Lactobacillus***: Género de bacterias anaerobias/aerobias facultativas que producen ácido láctico y dióxido de carbono (Makarova et al., 2006). Pueden fermentar en presencia o ausencia de oxígeno pero prefieren hacerlo bajo niveles reducidos o cero de éste. Usualmente son consideradas contaminantes de la cerveza aunque en las cervezas de fermentación espontánea tales como la Flanders (y las Lambic en menor medida) es deseable su presencia.
- ***Pediococcus***: Bacterias anaerobias que producen ácido láctico y diacetilo. Son bacterias Gram-positivas de la familia *Lactobacillaceae*, siendo las únicas bacterias del ácido láctico con forma de coco que se dividen a lo largo de dos planos de simetría. Tal como los *Lactobacillus* son consideradas contaminantes de la cerveza aunque en las cervezas de fermentación espontánea tales como las Lambic es deseable su presencia. De hecho son las responsables de la mayor parte de la producción de ácido láctico en lambic. Ciertos *Pediococcus* producen diacetilo, que proporciona un aroma a mantequilla o butterscotch a algunos vinos (como el Chardonnay) y algunos tipos de cerveza (Zumárraga et al., 2009).
- ***Acetobacter***: Bacteria que genera ácido acético. Es un tipo de caracterizado por su habilidad de convertir el alcohol (etanol) de la cerveza en ácido acético en presencia de oxígeno (Madigan et al., 2005).
- ***Enterobacter***: Son bacterias aerobias Gram Negativas, contienen más de 30 géneros y más de 100 especies que pueden tener morfologías de cocos o bacilos. La mayoría de las especies de *Enterobacter* fermentan la glucosa en ácido acético y láctico y luego éstos en acetato de etilo y otros subproductos como el dimetilsulfuro (DMS). Las enterobacterias se encuentran con relativa facilidad en el ambiente e históricamente son aceptadas por muchos practicantes de la fermentación espontánea.

Identificación de levaduras y bacterias: Actualmente son diversos los métodos para la identificación de levaduras y bacterias, los cuales varían en función del tiempo, especificidad, sensibilidad, costes, etc. De esta manera, cada laboratorio puede adoptar los más acordes a su capacidad y disponibilidad.

Métodos tradicionales para la identificación de levaduras y bacterias: Para clasificar, identificar o nombrar microorganismos desconocidos, tradicionalmente se ha utilizado la observación al microscopio y de colonias en placas. Los caracteres fenotípicos pueden establecer el género al que pertenece, basándonos en características morfológicas como la forma, tamaño de las células, apariencia de la colonia y la presencia de pigmentación.

El microscopio es un instrumento óptico con una o varias lentes que permiten obtener una imagen aumentada del objeto observado. En microbiología, el microscopio es uno de los equipos más empleados y la mayoría de las muestras, preparaciones y especímenes observados con este equipo son de origen microbiológico.

El crecimiento en placas de medios de cultivo selectivos o diferenciales nos dan un indicio cercano de la presencia de microorganismos específicos. Algunos de los medios de cultivo selectivos y/o diferenciales utilizados para determinar levaduras y bacterias son los siguientes (también serán los utilizados en este trabajo):

- **Medio Universal:** Medio compuesto de leche peptonizada, extracto de levadura, suero de tomate, fosfatos, cloruro de sodio, sales minerales, nitrógeno, vitaminas y factores de crecimiento. Además durante la preparación se adiciona cerveza que aporta alcohol y lúpulo, creando un ambiente muy favorable para el crecimiento de los microorganismos contaminantes de la cerveza. La fuente de carbono y energía la suministra la glucosa y los fosfatos tamponan el medio. El cloruro sódico y las otras sales minerales mantienen el equilibrio osmótico. La cerveza aumenta la acción selectiva y estimulante, ya que tanto el alcohol como los componentes del lúpulo eliminan la mayoría de los contaminantes del aire permitiendo el crecimiento de las levaduras propias del mosto y cerveza, incluso las cepas salvajes y las contaminantes.
- **WLN:** El medio nutritivo de Wallerstein (WLN) se emplea para el cultivo de levaduras y mohos que se encuentran en la industria cervecera y procesos industriales de fermentación. En el caso de la cerveza con un pH de 5,5 se pueden hacer recuentos de distintos tipos de levaduras de acuerdo a su morfología y pigmentación. Está compuesto de triptona (proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento), Dextrosa (carbohidrato fermentable que proporciona carbono y energía), Extracto de levadura (fuente de vitaminas, particularmente del grupo B), Fosfato monopotásico (tampón), Cloruros de potasio, calcio y férrico (proporcionan iones esenciales para el equilibrio osmótico) Sulfatos de magnesio y manganeso (fuentes de cationes divalentes), Verde de bromocresol (indicador de pH) y agar bacteriológico (agente solidificante).
- **Lisina:** Es un medio sintético para el aislamiento y cuantificación de levaduras silvestres que se encuentran en la elaboración de cerveza. En este medio, se suprimen las levaduras de cultivo como las *Saccharomyces cerevisiae* y *pastorianus* debido a que la única fuente de nitrógeno es la

Lisina y las levaduras *Saccharomyces* no crecen en medios con Lisina, permitiendo el crecimiento de otras levaduras, incluidas las salvajes que si pueden utilizar la Lisina como nutriente.

Tanto el medio Universal como el medio WLN se pueden hacer selectivos con la adición de reactivos que inhiban o promuevan, bien sea el crecimiento de determinados microorganismos o alguna reacción específica de una microbiota (como la Solubilización del CaCO_3 por algunas bacterias formadoras de ácido).

La adición de Cloranfenicol inhibe el crecimiento de bacterias como *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Acetobacter*, *Zymomonas*, microorganismos adaptados a la cerveza por lo que se utilizará este antibacterial para hacer selectivo los medios Universal y WLN para el crecimiento de levaduras.

La adición de Natamicina inhibe el crecimiento de mohos y levaduras. Este antifúngico se utiliza para hacer selectivo el medio Universal para bacterias anaerobias, aerobias y facultativas. En este trabajo las el medio con este reactivo se incubará en anaerobiosis con el fin de conseguir bacterias ácido lácticas.

La adición de CaCO_3 se utiliza para determinar la existencia de bacterias productoras ácidos capaces de solubilizarlo ya que éstas producirán zonas claras o halos alrededor de las colonias dado que el ácido sintetizado neutralizará el CaCO_3 . A diferencia de las bacterias ácido lácticas, las bacterias ácido acéticas son aerobias estrictas y no es necesario incubarlo en anaerobiosis, por tanto este medio se utilizará para determinar bacterias aerobias que produzcan ácido y solubilizan el CaCO_3 (como *Acetobacter*).

En la actualidad tanto la microscopía como la observación de colonias en placas se complementan y/o sustituyen con métodos bioquímicos y moleculares para la identificación de los microorganismos.

- **Métodos bioquímicos de identificación de bacterias.** En microbiología se emplean pruebas bioquímicas que permiten la identificación preliminar de bacterias (no aplicable para levaduras). Estas incluyen: la tinción Gram y la prueba de Catalasa.

La tinción Gram, se emplea para diferenciar el tipo de pared celular del microorganismo a tipificar. La tinción Gram colorea diferencialmente de violeta a las bacterias Gram positivas, cuya pared celular está compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano y de rojo a las bacterias Gram negativas, cuya proporción de peptidoglicano es alrededor del 10%. También permite el reconocimiento de la forma celular del microorganismo a estudiar (bacilos rectos, bacilos curvos y cocos).

La tinción de gram es uno de los métodos bioquímicos más importantes para la identificación de bacterias, ya que divide a éstas en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas, según las diferencias estructurales en la pared o envoltura, que permiten retener o no uno de los colorantes. La capacidad de retener este colorante es extremadamente limitada en la naturaleza, ya que la mayoría de las células animales y vegetales son Gram negativas.

Por su parte la prueba de Catalasa permiten determinar la presencia de la enzima catalasa. Se sabe que está presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas, que poseen el sistema citocromo. Los organismos que carecen del sistema citocromo, también carecen de la enzima y por lo tanto no pueden degradar el peróxido de hidrógeno.

- **Métodos moleculares de identificación de levaduras.** Las técnicas moleculares se basan principalmente en el estudio de las moléculas de ADN y ARN. Los datos obtenidos del estudio del genoma han contribuido al esclarecimiento de las relaciones filogenéticas entre los grupos taxonómicos de levaduras. Actualmente, algunas de estas técnicas moleculares son de las más utilizadas para la identificación de levaduras tal como los **Métodos basados en el análisis de regiones ribosomales**. Estas técnicas son las más empleadas en la actualidad debido a su eficacia y, por tanto, una de estas técnicas, el Análisis de perfiles de restricción de ADNr (RFLP-PCR del rDNA) será la empleada en este trabajo.

Análisis de perfiles de restricción de ADNr (RFLP-PCR del rDNA): Esta técnica (Restriction Fragment Length Polymorphisms) (Botstein et al., 1980) **se basa en la amplificación por PCR de estas regiones del ADN ribosómico y la posterior restricción del fragmento amplificado por endonucleasas.** Los productos de amplificación se visualizan en geles de agarosa. Esta técnica, se caracteriza por su fácil ejecución y su reproducibilidad. Una región ribosómica que es muy útil para diferenciar las levaduras a nivel de especie es la que incluye el gen 5.8S y las regiones intergénicas adyacentes ITS1 e ITS2.

El presente trabajo tiene por principal objetivo estudiar la microbiota cervecera que se encuentra en el ambiente de una Cervecería (Cerveces La Pirata) y poder verificar de forma preliminar si con dicha microbiota se pueden elaborar cervezas ácidas de fermentación espontánea.

Algunos Trabajos Finales de Grado/Máster sirvieron como antecedentes a este trabajo por lo cual hacemos mención:

- En el año 2018 Forcadell y col. estudiaron el aislamiento y la identificación de microorganismos del entorno Agrario de Lo Vilots SL. En el trabajo se pudo identificar levaduras *Saccharomyces cerevisiae*.
- En el año 2017 Ferrer y Col. estudiaron el aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* nativas de Alboraya para la producción de cerveza. En el trabajo se aisló e identificó una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* y además se aislaron e identificaron 2 cepas de levaduras *No Saccharomyces* (*Wickerhamomyces ciferrii*, *Meyerozyma caribbica*), todas procedentes de los campos de Alboraya.
- En el año 2018 Batle y col. estudiaron la selección y caracterización de levaduras autóctonas. En el trabajo se logró el aislamiento e identificación de hasta diez especies de levaduras autóctonas (*Rhodotorula aglutinar*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Cryptococcus magnus*, *Cryptococcus flavescens*, *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Torulasporea delbrueckii*, *Pichia membranaefaciens*, *Candida zemplinina* y *Saccharomyces cerevisiae*) a partir de uvas de tres parcelas diferentes y de microvinificaciones espontáneas.
- Figuerola y col. en el año 2019 estudiaron la Identificación y caracterización de levaduras autóctonas en la región vitivinícola del Priorat. En el trabajo se logró aislar un total de 288 levaduras procedentes de la piel de la uva y de microvinificaciones espontáneas de las uvas garnacha y cariñena de la D.O. Montsant y garnacha de la D.O.Q. Priorat. Se identificaron hasta 7 especies de levaduras diferentes: *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Starmerella bacillaris*, *Lachancea thermotolerans*, *Zygoascus meyeriae*, *Candida californica* y *Saccharomyces cerevisiae*. En la especie *S. cerevisiae* tipificaron un total de 7 cepas.

CAPITULO III. OBJETIVOS**III.1. GENERAL:**

Realizar la fermentación espontanea de mosto cervecero de 14 °P sin lúpulo en las instalaciones de Cerveces La Pirata para evaluar la microbiota cervecera en el ambiente del entorno.

III.2 ESPECÍFICOS:

- Determinar la existencia de microbiota cervecera en el entorno de Cerveces La Pirata, inoculada espontáneamente en el mosto en las estaciones de invierno y primavera.
- Identificar la microbiota cervecera inoculada espontáneamente en el mosto en las estaciones de invierno y primavera en el entorno de Cerveces La Pirata.
- Determinar si la microbiota cervecera identificada es de utilidad para la fermentación espontanea de mosto cervecero.

CAPITULO IV. METODOLOGÍA

Definiendo de manera muy general la metodología seguida en el trabajo de investigación, éste se desarrolló en dos etapas fundamentales:

- **Revisión bibliográfica y consultas a fuentes ligadas a los objetivos de la investigación.**

En esta etapa se revisó algunas fuentes bibliográficas sobre fermentación espontánea en cerveza, microorganismos tradicionales en este tipo de fermentación y siembra, aislamiento e identificación de éstos, también se consultó a personas, profesores y cerveceros relacionadas con los objetivos de la investigación.

- **Desarrollo experimental de los objetivos.**

Debido a que la investigación se desarrolla en base a tres objetivos específicos como son la existencia de microbiota, su identificación y utilidad en la elaboración de cervezas de fermentación espontánea y la factibilidad de fermentar en dos estaciones del año, la parte experimental también se desarrolló en base a la consecución de los objetivos propuestos y en el orden en que fueron descritos anteriormente, es por eso que definimos 3 fases principales de experimentación:

- La primera fase tiene que ver con la preparación y puesta en marcha de los fermentadores en las estaciones del año correspondiente (invierno y primavera). Cabe resaltar que el procedimiento seguido para esta actividad fue el mismo en cada estación del año, solo difieren el momento del calendario de puesta en marcha.
- En la segunda fase se trabajó con la toma de muestras para análisis fisicoquímicos (seguimiento de fermentación) y microbiológicos, éstos últimos contemplando la siembra y posterior aislamiento de microorganismos.
- La tercera fase contempló la identificación de los microorganismos aislados. Se realizaron pruebas bioquímicas orientativas para la identificación de bacterias y pruebas moleculares para la identificación de levaduras.

A continuación se presenta un diagrama de flujo de la metodología a seguir en el desarrollo de las dos primeras etapas de la investigación.

DIAGRAMA DE FLUJO DEL ESQUEMA METODOLÓGICO SEGUIDO EN LA INVESTIGACIÓN

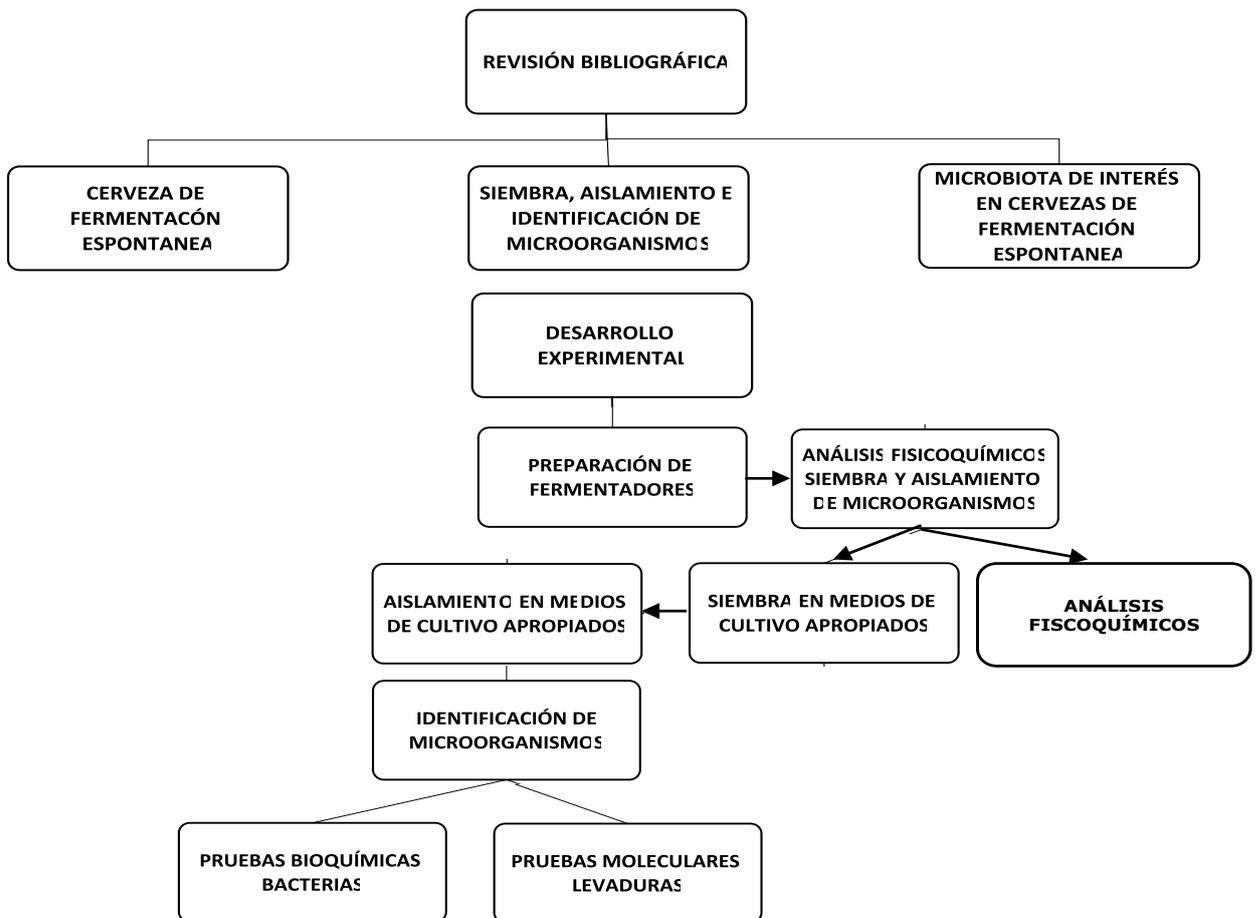


Fig.1 Esquema metodológico de la investigación.

IV.1 PREPARACIÓN DE FERMENTADORES

Los fermentadores utilizados para esta investigación fueron fermentadores comerciales de plástico de 30 litros de capacidad como el que se observa en la figura 2. Dichos fermentadores cuentan con tapa que otorga buena hermeticidad, válvula tomamuestra y airlock para seguimiento de la formación de gas carbónico.



Fig.2 Fermentador plástico de 30 litros con válvula tomamuestras y airlock

A los fermentadores se les realizó limpieza y desinfección con Sosa Caústica al 4% v/v y Ácido Peracético al 1% v/v respectivamente y sus respectivos aclarados con agua fresca cuando correspondía.

El mosto utilizado para las pruebas de cada estación del año correspondió a un mismo tipo de cerveza (Viakrucis) y se tomó luego del hervido por 60 minutos. A ninguno de los mostos se le adicionó lúpulo y las especificaciones básicas de los mismos las observamos en la tabla 1.

Tabla 1. Especificaciones de densidad y pH en los mostos correspondientes a los fermentadores de invierno y primavera.

Estación del año	Fermentador	Fecha	Volumen (L)	Adición de Lúpulo	Densidad (g/ml)	pH	°Plato (%)
Invierno	1	01-feb	15	No	1,0562	5,48	13,85
	2		15	No	1,0563	5,45	13,88
Primavera	1	13-may	15	No	1,0568	5,66	14,00
	2		15	No	1,0565	5,64	13,90

Los mostos en los fermentadores 1 y 2 correspondientes a la estación de invierno fueron colocados en enfriamiento natural el 01 de febrero a las 17:30. Para evitar la introducción de algún tipo de insecto se les colocó una malla limpia y desinfectada y se trasladaron a unos 20 metros de la entrada a la cervecería en donde hay un espacio con árboles y vegetación (ver figura 3).

Las temperaturas ambientales durante el enfriamiento estuvieron entre 10°C y 1°C como se puede observar en la figura 4. Si consideramos que el mosto se colocó en enfriamiento natural a las 17:30 del día 01/02/21 y se trasladó el día siguiente (02/02/21) a las 08:30 al sitio específico de la cervecería para fermentación (lugar de la cervecería separado del área de producción y donde sería la ubicación hipotética tanto del coolship como de las barricas para fermentación espontánea), el mosto fue expuesto durante 15 horas al ambiente con la siguiente distribución de temperatura: ±5 horas entre 10°C y 3°C, ±8 horas entre 3°C y 1°C y ±2 horas entre 1°C y 4°C por lo que la temperatura promedio efectiva de enfriamiento del mosto fue ±3,6°C. La humedad relativa estuvo cercana a 0% en ese día (en la Figura 4B corresponde al color grisáceo que se traslapa con el color del fondo del gráfico).



Fig.3 Colocación de fermentadores: A) Para enfriamiento natural durante una noche;

B) Para fermentación en el área dispuesta de la cervecería

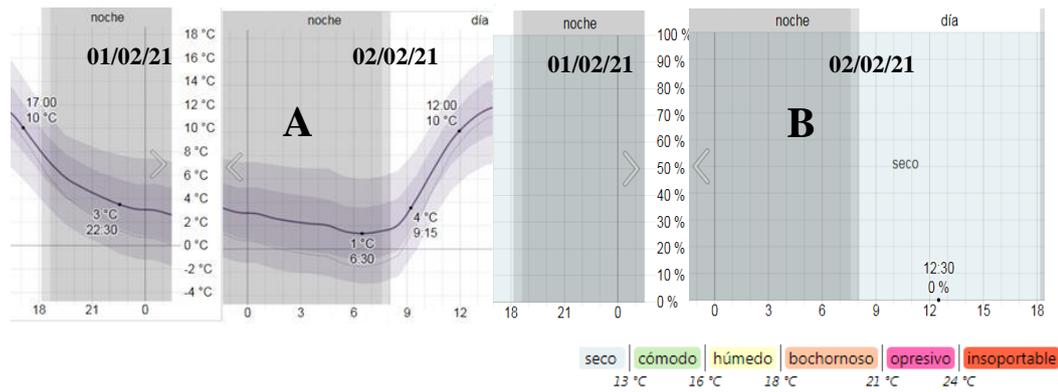


Fig.4 Condiciones ambientales en el enfriamiento del mosto en la estación de invierno:
A) Temperatura; B) Humedad

Los mostos en los fermentadores 1 y 2 correspondientes a la estación de primavera fueron colocados en enfriamiento natural el 13 de mayo a las 17:30. Al igual que los colocados en invierno, para evitar la introducción de algún tipo de insecto se les colocó una malla limpia y desinfectada y se trasladaron al mismo lugar en donde se ubicaron los de invierno. Las temperaturas ambientales durante el enfriamiento estuvieron entre 20°C y 9°C como se puede observar en la figura 5. Si consideramos que el mosto se colocó en enfriamiento natural a las 17:30 del día 13 de mayo y se trasladó el día siguiente (14/05/21) a las 08:30 al sitio específico de la cervecería para fermentación, el mosto estuvo expuesto durante 15 horas al ambiente con la siguiente distribución de temperatura: ± 2 hora entre 20°C y 19°C, ± 6 horas entre 19°C y 12°C y ± 7 horas entre 12°C y 9°C y por lo que la temperatura promedio efectiva de enfriamiento del mosto fue $\pm 13,7^\circ\text{C}$. La humedad relativa estuvo cercana a 10% en ese día (en la Figura 5B corresponde al color verdoso).

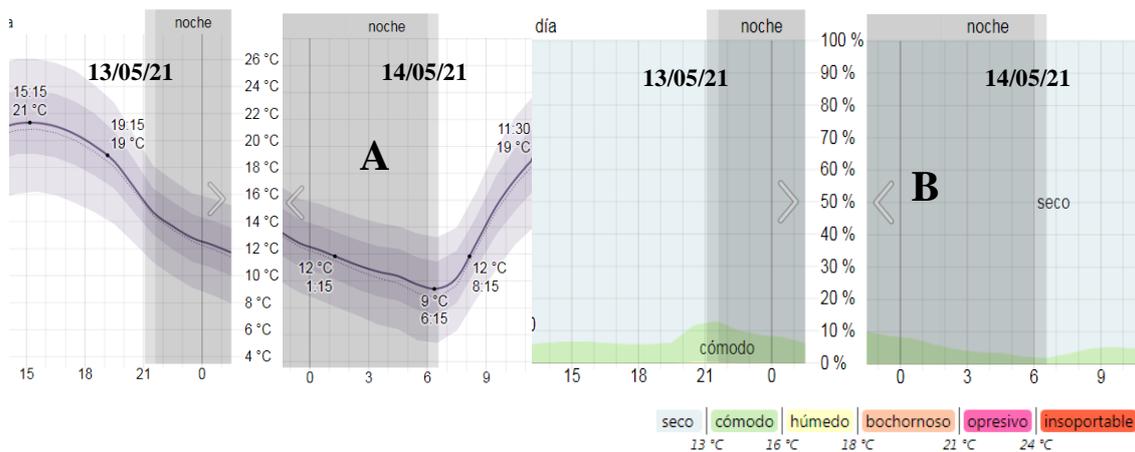


Fig.5 Condiciones ambientales en el enfriamiento del mosto en la estación de primavera:
A) Temperatura; B) Humedad

IV.2 TOMA DE MUESTRAS Y ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS DE pH y DENSIDAD.

Se tomaron muestras para ensayos fisicoquímicos con la siguiente frecuencia de muestreo:

- **Fermentadores de Invierno:** Se tomaron muestras de los fermentadores recién llenos y al día siguiente del enfriamiento natural, luego se muestrearon semanalmente hasta la semana 4 y a partir de allí se muestreo cada 15 días hasta el día 102 de fermentación.
- **Fermentadores de Primavera:** Al igual que los fermentadores de invierno, se tomaron muestras recién llenos y al día siguiente del enfriamiento natural, luego se tomaron 2 muestras por semana hasta la semana 4 y a partir de allí se muestreo cada 15 días hasta el día 50 de fermentación.
- El seguimiento a la fermentación se realizó a través de análisis de densidad (°Plato) y pH con el transcurrir del tiempo. La descripción detallada del procedimiento de muestreo fisicoquímico y los ensayos de densidad y pH se encuentran en los Anexos 1 y 2 respectivamente.

IV.3 TOMA DE MUESTRAS Y ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS.

Se tomaron asépticamente (Anexo 3) muestras para análisis microbiológicos, los cuales constaron de siembra en medios de cultivo: Medio Universal+Clorafenicol, WLMN+Clorafenicol, Lisina, Medio Universal+Natamicina y Medio Universal+Natamicina+CaCO₃+Verde de Bromocresol con la siguiente frecuencia de muestreo:

- **Fermentadores de Invierno:** Se muestrearon los fermentadores recién llenos y al día siguiente del enfriamiento natural, luego se muestrearon cada 15 días hasta la semana 6 y a partir de allí se muestreo cada mes hasta el día 102 de fermentación. El total se realizaron 7 muestreos microbiológicos.
- **Fermentadores de Primavera:** Igual que los fermentadores de invierno, se muestrearon recién llenos y al día siguiente de enfriamiento natural, luego se tomaron muestras por semana hasta la semana 3 cada 15 días hasta el día 50 de fermentación. El total fueron 6 muestreos microbiológicos.

La siembra en los distintos medios (Anexo 5) se realizó en superficie con extensión en placa, previa dilución de las muestras y luego se incubaron en las condiciones indicadas para cada medio de cultivo: 3 días a 28°C en aerobiosis para los medios Universal+Clorafenicol, WLMN+Clorafenicol y Lisina; 5 días a 28°C en aerobiosis para el Medio Universal+Natamicina+CaCO₃+Verde de Bromocresol y 5 días a 28°C en anaerobiosis para el Medio Universal+Natamicina.

El fundamento de esta técnica para determinar la existencia de microorganismos se basa en proveerlos de nutrientes (medios de cultivo) y condiciones favorables (temperatura, presencia/ausencia de oxígeno y tiempo de incubación) para su crecimiento. Para ello se utilizaron los medios de cultivos selectivos y/o diferenciales a los cuales se les agregaron reactivos inhibidores como la Natamicina (antifúngico) y el Cloranfenicol (antibiótico) con el fin de inhibir el crecimiento de Levaduras y Bacterias respectivamente. Para lograr un crecimiento aceptable para la separación e identificación del microorganismo la cantidad sembrada en la placa debe ser tal que nos permita obtener entre 30 y 300 ufc, es por eso que se realizan diluciones seriadas de las muestras (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}).

IV.4 AISLAMIENTO DE LEVADURAS E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

El aislamiento de levaduras (Anexo 6) se realizó seleccionando la colonia de interés en el medio de cultivo donde creció (Universal+Clorafenicol, WLMN+Clorafenicol y Lisina) y aislándola por siembra en superficie con extensión en placas de medio de cultivo YPD. Luego las placas se incubaron 3 días a 28°C para su crecimiento.

Cabe resaltar que para las bacterias no se realizó aislamiento sino que para la identificación se tomaron las colonias directamente de las placas de los medios de cultivo donde crecieron (Medio Universal+Natamicina, Medio Universal+Natamicina +CaCO₃+Verde de Bromocresol).

La identificación de los microorganismos se realizó a través de la observación al microscopio, observación de colonias en placa, pruebas moleculares para la identificación de levaduras (Análisis de Perfiles de Restricción del amplificado del ADN Ribosomal) y pruebas orientativas bioquímicas para la identificación de bacterias (Tinción GRAM y prueba de Catalasa).

Observación al microscopio y de colonias en placa (Anexo 7)

Una de las técnicas utilizadas para la diferenciación y/o identificación de los microorganismos fue la observación directa al microscopio (con lentes objetivo 10X, 40X). El principio en que se basa esta técnica es la observación de las diferentes morfologías de cada microorganismo y la comparación con lo reportado en la bibliografía o con el soporte de personal especializado y de acuerdo a esto determinar si la morfología vista al microscopio corresponde a levaduras o a bacterias. En esta técnica se toma asépticamente un volumen de 10 a 20 µl de

muestra y se coloca en una lámina portaobjetos, luego se cubre con un cubreobjetos y se observa al microscopio con los lentes objetivo 10X y 40X. Si la muestra tiene una alta carga de microorganismos se realizan diluciones seriadas hasta conseguir una concentración que permita la observación adecuada.

Otra de las técnicas de observación en este caso macroscópica es la de las colonias cultivadas en cada uno de los medios. La morfología de las colonias deriva de cada célula pero es una característica de la masa celular. Las características que se observaron fueron: Tamaño (grande, medio, pequeño), Consistencia (blanda, seca o viscosa), Forma: (dependiendo del borde y del espesor) y pigmentación (colores). De acuerdo a estas características pueden definirse distintos tipos de colonias.

Pruebas moleculares para identificar levaduras: RFLP-PCR (Anexo 8)

De las placas de YPD que contienen las colonias de levaduras aisladas se toma una muestra directa de la colonia y se le realiza una PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Para ello primero se realiza una rotura térmica de las células a través de una incubación a 95°C para extraer el ADN de la levadura. Luego se realiza una PCR utilizando primers para amplificar la zona 5.8 S-ITS del DNA ribosomal y poder hacer posteriormente una separación de las especies en bandas (bandas de 100 bp a 1000 bp) de un marcador (GeneRuler 100 bp DNA Ladder) utilizando la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa.

A los productos de la PCR se les hace una digestión a 37°C con la enzima de restricción *HinfI* y luego se realiza la separación de las especies en bandas con la electroforesis horizontal en gel de agarosa tal como se mencionó anteriormente.

Pruebas orientativas bioquímicas para la identificación de bacterias (Tinción GRAM y prueba de Catalasa) (Anexo 9)

De las placas de los medios Medio Universal + Natamicina, Medio Universal+ Natamicina+CaCO₃+Verde de Bromocresol se toma una muestra directa de la colonia y se extiende sobre un portaobjetos dejándola secar. Luego se fija la muestra con alcohol y se aplican tintes de violeta de genciana y rojo de safranina. Entre ambos tintes se coloca lugol (fijador de violeta), se lava con agua destilada y con una solución de etanol/acetona) y se debe dejar determinado tiempo en cada aplicación de reactivos. Luego de secar la muestra se observa al microscopio y se visualiza el color violeta (bacterias Gram +) o el color rojizo (bacterias Gram -).

CAPITULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1 Parámetros indicativos de Fermentación:

La medición de la densidad y pH de la cerveza con el avance de la fermentación son los parámetros por excelencia que se utilizan en las cervecerías para hacer seguimiento a la fermentación.

V.1.1 Seguimiento de la densidad en los fermentadores.

La Fig. 6 muestra el comportamiento de la densidad en función del tiempo en las estaciones de invierno y primavera en la fermentación del mosto por acción de la microbiota inoculada espontáneamente durante el enfriamiento natural.

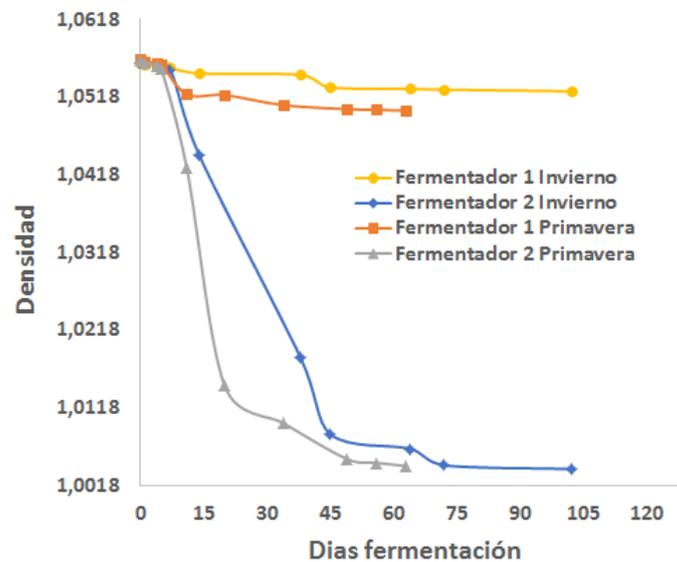


Fig.6 Seguimiento a la densidad en función del tiempo en las estaciones de invierno y primavera

Nótese en los fermentadores 1 de las estaciones de invierno y primavera que aunque se observa un descenso en los valores de densidad, éstos no son muy acentuados, disminuyendo sólo en el caso del fermentador 1 de invierno pasados los 100 días de 1,0562 g/ml (13,85°Plato) a 1,0526 g/ml (13,00°Plato) y en el fermentador 1 de primavera pasados los 49 días de 1,0568 g/ml (14,00°Plato) a 1,0503 g/ml (12,45°Plato). Esto significa que en el fermentador 1 de invierno la atenuación al día 105 fue de 6,5% y en el de primavera fue de 11,5% lo que quiere decir que probablemente la microbiota presente en dichos fermentadores hasta esos días no metabolizó los azúcares fermentables presentes en el mosto.

A diferencia de los fermentadores 1 de invierno y primavera, los fermentadores 2 en ambas estaciones presentaron un descenso de la densidad típico de la fermentación de mosto cervecero. Observamos en el caso del fermentador 2 de invierno que pasados los 100 días la densidad disminuyó de 1,0563 g/ml

(13,88°Plato) a 1,0039 g/ml (1,09°Plato) y en el fermentador 2 de primavera de 1,0565 g/ml (13,92°Plato) a 1,0043 g/ml (1,12°Plato) pasados los 60 días. Esto significa que en el fermentador 2 de invierno la atenuación al día 105 era de 93% y en el de primavera a los 63 días era de 92% lo que quiere decir que la microbiota presente en dichos fermentadores metabolizó casi por completo los azúcares fermentables presentes en el mosto. Si consideramos por ejemplo una West Flanders Red que tiene una atenuación aparente aproximada al 98% o una Lambic tradicional cercana al 100%, y que ambos estilos normalmente finalizan su fermentación entre 1 a 3 años (Sparrow, 2005), estos resultados de atenuación aparente en los fermentadores 2 de invierno y primavera serían aceptables.

Dentro de los objetivos planteados no existe alguno que trate de la aleatoriedad e impredecibilidad que puede resultar del proceso de fermentación espontánea de mosto cervecero sin embargo los resultados de atenuación son prueba de tal afirmación y nos plantean la necesidad de mencionarlo como hallazgo importante en la investigación. Dos fermentadores idénticos, cuya limpieza y desinfección fue exactamente la misma, cuyo mosto introducido era exactamente el mismo en cantidad y calidad, que fueron colocados en el mismo momento y en el mismo sitio bajo las mismas condiciones y en dos estaciones del año distintas y **arrojaron resultados de atenuación aparente completamente diferente.**

Dado que se tuvo extremo cuidado en todo lo que era controlable dentro de la investigación, descartamos una causa atribuida al manejo de los fermentadores, pero independientemente de si la causa haya sido el tipo de microbiota inoculada espontáneamente en cada fermentador, su velocidad de crecimiento, la densidad poblacional o la prevalencia de microorganismos en la competencia, lo cierto es que entre dos muestras de mosto colocados a fermentar espontáneamente en las mismas condiciones existió una diferencia tangible y contundente que nos ratifica lo aleatorio e impredecible de este proceso de fermentación. Se investigó sobre posibles antecedentes o trabajos en donde haya ocurrido algo similar y no se pudo encontrar nada. También luego de observar esta tendencia se intentó investigar una posible causa como lo es la densidad poblacional de cada tipo de microorganismo presente en la cerveza a través del recuento de colonias en la Cámara de Neubauer o el recuento de colonias en placa, sin embargo no se logró tener resultados fiables que apoyaran esta teoría y en pro de no desviarnos de los objetivos planteados en nuestra investigación y dado el poco tiempo para desarrollarlos, se decidió no profundizar más en la investigación de las causas de la diferencia de atenuación sino que se recomendará como objetivo para la continuación a futuro del presente trabajo.

Otra observación importante que se puede sacar del gráfico de la Fig. 6 es que el

fermentador 2 de la estación de primavera que presentó buena atenuación tuvo atenuación una velocidad de atenuación mayor que la del fermentador 2 de invierno. Podemos observar que en los 1eros 20 la densidad del fermentador 2 de invierno descendió aproximadamente a 1,0400 g/ml (10°Plato) mientras que la densidad en el fermentador 2 de primavera a los 20 días estuvo en 1,0146 g/ml (3,72°Plato), es decir que atenuó más que el de invierno en dicho intervalo de tiempo, de hecho este fermentador de primavera alcanzó una atenuación superior al 90% a los 49 días y el de invierno alcanzó ese porcentaje de atenuación en el día 68. Esto podría tener su explicación en el hecho de que la temperatura ambiente durante la fermentación en primavera estaba considerablemente más alta que la de invierno y de allí que la velocidad de atenuación haya sido mayor en primavera.

V.1.2 Seguimiento de pH en los fermentadores.

La Fig. 7 muestra el comportamiento del pH en función del tiempo en las estaciones de invierno y primavera en la fermentación del mosto por acción de la microbiota inoculada espontáneamente durante el enfriamiento natural.

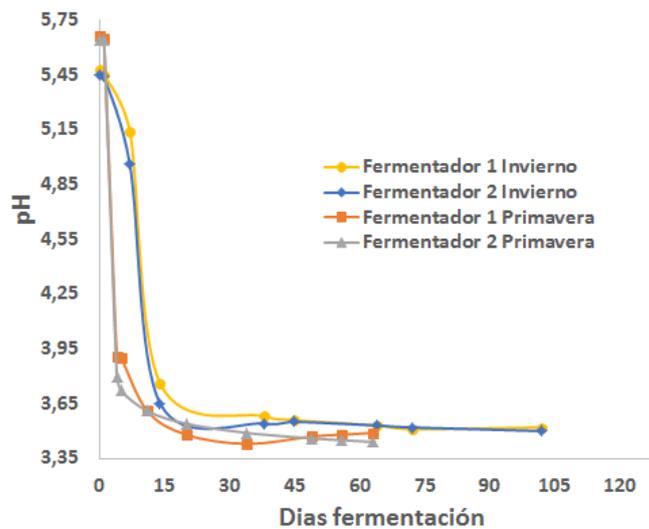


Fig.7 Seguimiento a la pH en función del tiempo en las estaciones de invierno y primavera

En el caso del pH podemos observar un comportamiento más típico en todos los fermentadores colocados tanto en invierno como en primavera. Notamos que en el caso de los fermentadores colocados en primavera el pH descendió más rápido que en los fermentadores de invierno. Vemos que al día 15 el pH en los de invierno estaba alrededor de 3,70 y en los de primavera estaba alrededor de 3,50 y ya para el día 49 en los de invierno teníamos valores de pH alrededor de 3,54 y en los de primavera alrededor de 3,46. Esta diferencia en la velocidad de descenso del pH quizás se deba a las condiciones ambientales de la estación de primavera que promueve de manera general el aceleramiento de la fermentación.

Llamo la atención en los resultados de pH, que independientemente de la

atenuación presentada en todos los fermentadores, los valores de pH fueron todos similares. Desconocemos cuales pudieron haber sido las razones para tales resultados, quizás pudo haber sido que en los fermentadores que presentaron poca atenuación se hayan inoculado otros microorganismos no fermentativos que no identificamos pero que pudieron haber aportado en la reducción del pH por la metabolización de otros compuestos. Estas hipótesis podría ser una de las causas pero no tenemos la certeza dado que no se realizó alguna evaluación que lo demuestre. Es extraño que en el caso del pH se hayan obtenido resultados similares en todos los fermentadores aun cuando la atenuación haya sido muy distinta, pero estos fueron resultados reales obtenidos que nos muestran una vez más lo impredecible o aleatorio del proceso de fermentación espontanea.

Se sabe que el pH en las cervezas de fermentación espontanea es un parámetro importante de seguimiento así que para que nuestro análisis sea más asertivo, consultamos referencias bibliográficas de los rangos en los que se mueve el pH de estas cervezas, aportando valor agregado a los resultados obtenidos.

Van Oevelen en 1976 realizó un estudio en donde determinó que el rango de pH para la cerveza Lambic Gueuze era de 3,20 a 3,50 (Van Oevelen et al., 1976).

También, Thompson en 2017 mostró los pHs característicos de algunas cervezas ácidas de fermentación espontanea tal como vemos en la tabla a continuación:

Tabla 2. Comparación de pH en marcas comerciales de cerveza Lambic (Thompson et al., 2017)

Brand	N	Subset for Alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Hanssens Artisan	12	3.23 ± 0.01 ^A			
3-Fonteinien	12	3.24 ± 0.02 ^A			
Oude Gueuze Boon	6		3.43 ± 0.005 ^B		
Cantillon	6		3.44 ± 0.01 ^B		
Oude Gueuze Ville	9		3.44 ± 0.03 ^B		
Girardin	12		3.44 ± 0.02 ^B		
Gueuze Boon	6			3.52 ± 0.04 ^C	
Cantillon Bio	9			3.53 ± 0.01 ^C	
Cuvee Renée	9				3.62 ± 0.02 ^D

Means followed by same superscript are not significantly different at the 0.05 level using Tukey-Kramer HSD.

Podemos observar en ambas referencias que los valores de pH para las cervezas mencionadas se encuentran en el rango de 3,20-3,62; es decir, que los valores de pH obtenidos en los fermentadores de invierno y primavera se encuentran dentro de los esperados para los estilos de cervezas ácidas de fermentación espontanea. Estos valores de pH bajos en las cervezas ácidas de fermentación espontanea se deben básicamente a que los microorganismos encontrados en estas cervezas "salvajes" producen ácidos (Sparrow, 2005) y los ácidos más importantes y de mayor preponderancia que se generan son el Ácido Acético y el Ácido Láctico.

Existen muchos otros ácidos que se generan en menor cantidad.

V.2 Observación de microorganismos por microscopía óptica:

A continuación observamos las muestras de los fermentador 1 de invierno (Fig. 8) y fermentador 2 de primavera (Fig. 9) respectivamente vistas al microscopio con lente objetivo 40X.

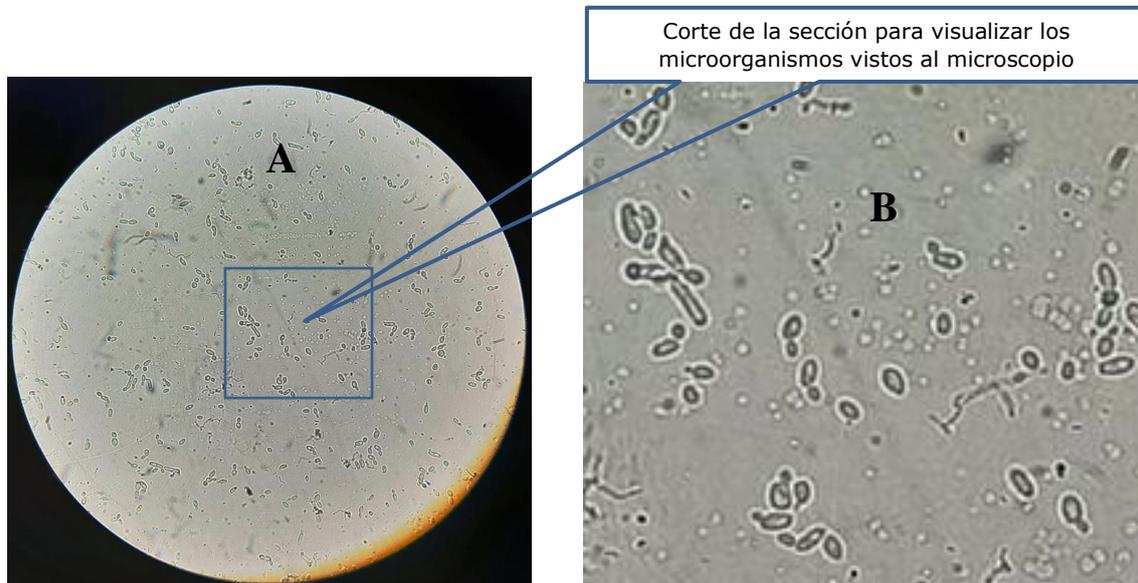


Fig.8 Imagen al microscopio de la muestra de cerveza del fermentador 1 de invierno:

A) Imagen total vista con lente objetivo 40X; B) Vista ampliada de la sección central de la imagen

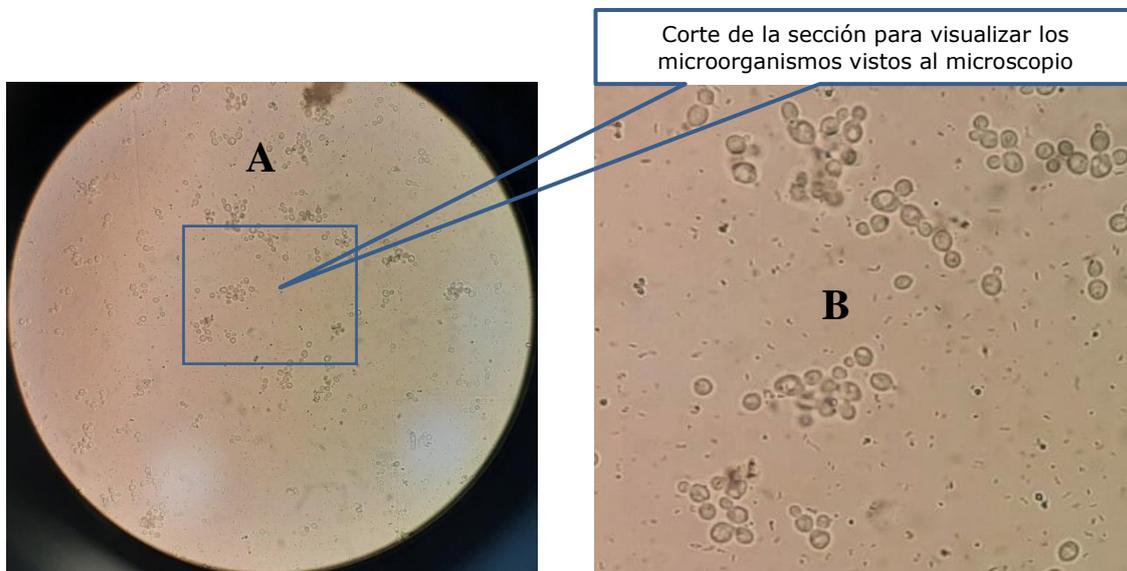


Fig.9 Imagen al microscopio de la muestra de cerveza del fermentador 2 de primavera:

A) Imagen total vista con lente objetivo 40X; B) Vista ampliada de la sección central de la imagen

Podemos observar en las secciones ampliadas de las figuras diferentes morfologías de los microorganismos vistos al microscopio. Estas imágenes son de las muestras de cerveza de cada fermentador mencionado en la figura respectiva. Podemos notar algunas morfologías de levaduras con formas ovaladas, circulares, alargadas, con picos, etc., que nos dan un indicio de que puede haber presencia de levaduras *Saccharomyces* y *No Saccharomyces*.

En las muestras observadas también se pudo notar morfologías típicas de bacterias como cocos (punticos pequeños) y bacilos (palitos finos), microorganismos que presentaban movimiento durante la observación, de modo que, considerando estas dos características, ambas nos dan un indicio de la posible presencia de bacterias.

En el anexo 10 podremos observar las imágenes ampliadas de los microorganismos vistos al microscopio de todos los fermentadores, apreciándose mejor las morfologías vistas y ratificándose el hecho de que las morfologías fenotípicas encontradas por microscopía óptica nos aseguran la presencia de levaduras y bacterias.

Para ir acercándonos más a la identificación de los microorganismos presentes y aportar precisión a los resultados se utilizó la siembra de muestras en medios de cultivos selectivos, método que nos permite dar mayor objetividad y selectividad.

V.3 Crecimiento de microorganismos por siembra en medios de cultivo selectivos.

Con el fin de afinar un poco más la identificación preliminar de microorganismos observada en el microscopio, se sembraron las muestras en algunos medios de cultivos adecuados para su crecimiento. Los medios de cultivo utilizados fueron: **Medio Universal+Cloranfenicol** (levaduras), **WLN+Cloranfenicol** (levaduras con diferentes morfologías), **Agar Lisina** (levaduras *No Saccharomyces*), **Medio Universal+Natamicina** (incubado en anaerobiosis para detección de posibles bacterias lácticas) y **Universal+Natamicina+ CaCO₃+Verde de Bromocresol** (incubado en condiciones aerobias para detección de posibles bacterias acéticas).

En la figura 10 observamos el crecimiento de colonias en placas de los distintos medios de cultivo descritos anteriormente de los fermentadores 1 y 2 de invierno y en la figura 11 observamos imágenes ampliadas de las muestras sembradas en WLMN+Cloranfenicol y Medio Universal+Natamicina de los fermentadores de primavera.

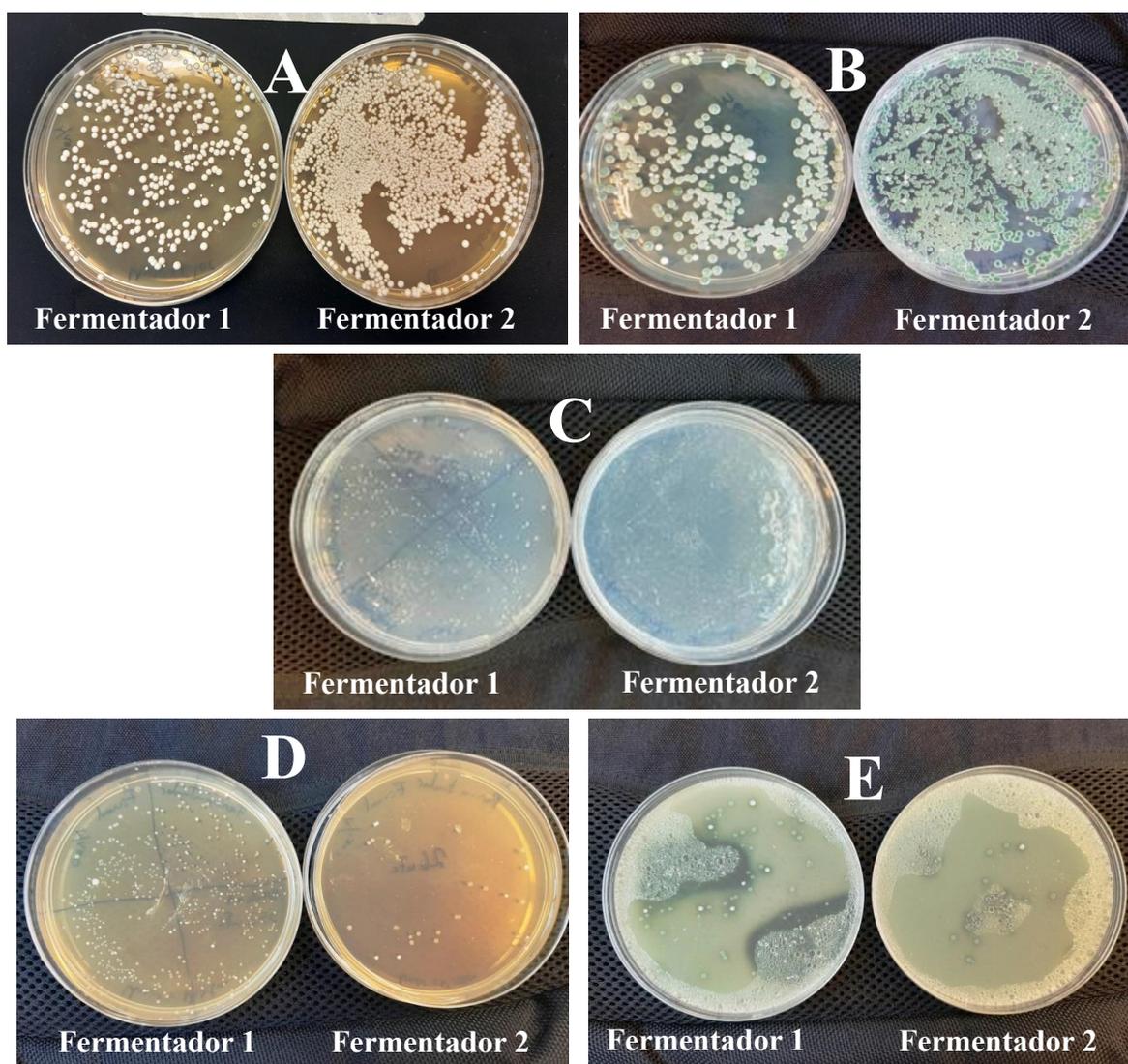


Fig.10 Imágenes del crecimiento de colonias en placas en los fermentadores de invierno:

- A) Universal+Clorafenicol (Levadura)
- B) WLMN+Clorafenicol (Levaduras de diferentes morfologías)
- C) Agar Lisina (Levaduras No Saccharomyces)
- D) Universal+Natamicina (Bacterias de diferentes morfologías crecidas en condiciones anaerobias)
- E) Universal+Natamicina+CaCO₃+Verde de Bromocresol (Bacterias crecidas en condiciones Aerobias)

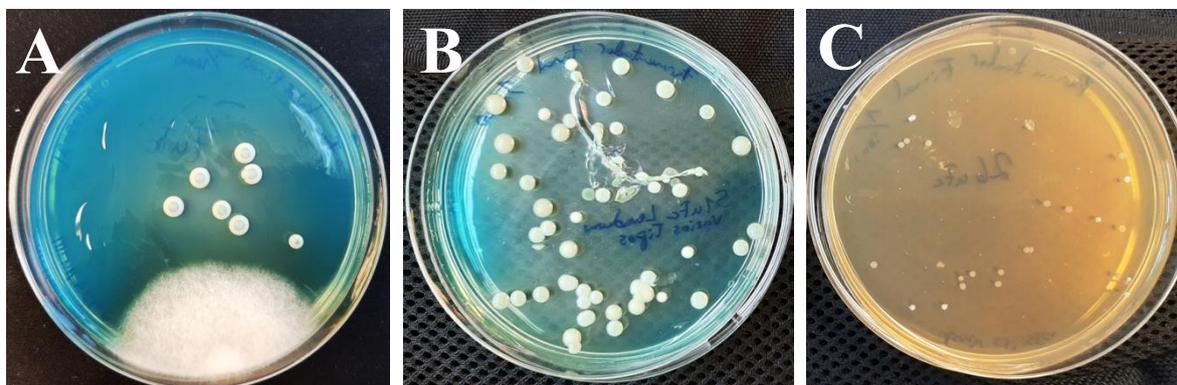


Fig.11 Imágenes ampliadas del crecimiento de colonias en placas en los fermentadores de primavera:

- A) y B) WLMN+Clorafenicol (Levaduras de diferentes morfologías)
- C) Medio Universal+Natamicina (Bacterias de diferentes morfologías crecidas en condiciones anaerobias)

Observamos en todas las imágenes de las figuras 10 y 11 que hubo crecimiento de colonias en cada uno de los medios de cultivo. La descripción de lo observado fue:

- Las colonias encontradas en el medio Universal+Cloranfenicol fueron todas levaduras. Se observó además que la morfología de las colonias era similar, solo cambiaban el tamaño de las colonias, unas un poco más grandes que otras. Esto no significa que no exista más de un género o especie, solo que en este medio no se puede aseverar a simple vista cuales son los géneros y/o especie de levaduras que crecieron, solo podemos asegurar la presencia de levaduras. Posteriormente a través de pruebas moleculares se verificarán con más cercanía los géneros y/o especies presentes en este medio de cultivo y en los de WLN+Cloranfenicol y Agar Lisina.
- Las colonias encontradas en el medio WLN+Cloranfenicol fueron todas levaduras. Aquí sí se pudo evidenciar diferencias en la morfología de las colonias, unas eran blancas-cremosas, otras verdosas, algunas azuladas, blancas con el centro azulado o verdoso, algunas brillantes y otras opacas. Eso significa que tenemos varios géneros y/o especies y es una de las ventajas de este medio de cultivo, permitió diferenciar las colonias y por ende aseverar la presencia de varios tipos de levaduras.
- Las colonias encontradas en el medio Lisina podemos asegurar que son todas levaduras del género No Saccharomyces y con una probabilidad alta hay presencia de varios tipos de ellas debido a que habían dos tamaños y dos colores en las colonias presentes. Unas colonias grandes y otras pequeñas y unas amarillentas y las otras blancas.
- Las colonias encontradas en el medio Universal+Natamicina fueron todas bacterias. Se observaron colonias semiamarillentas y brillantes otorgándoles una apariencia como "líquida", también se observaron varios tamaños de colonia. Cabe resaltar que las placas de este medio se incubaron en anaerobiosis por lo que las bacterias que crecieron en las mismas son anaerobias o facultativas. A través de pruebas bioquímicas orientativas se verificará con más cercanía los tipos de bacterias presentes en este medio y en el de Universal+Natamicina+CaCO₃+Verde de bromocresol.
- Las colonias encontradas en el medio Universal+Natamicina+CaCO₃+Verde de bromocresol fueron todas bacterias que solubilizaban el CaCO₃ presente en la matriz. Con la adición carbonato cálcico se hizo más selectivo el medio y las bacterias productoras de ácido produjeron zonas claras alrededor de las colonias debido a la neutralización del CaCO₃ presente en el medio. Estos halos se evidenciaron en las placas incubadas, de hecho en algunas placas prácticamente el halo se extendió por toda la superficie de la placa.

- En los Fermentadores de Primavera se observó presencia de Mohos en la muestra al día siguiente del enfriamiento natural Fig. 11B, debido quizás a las condiciones de temperatura y humedad ambientales.
- Es importante aclarar que los microorganismos encontrados en los distintos medios fueron los capaces de crecer en los mismos, no significando que sean los únicos microorganismos existentes en el mosto, de hecho por los resultados de pH y atenuación es posible que hayan otros microorganismos fermentativos o no fermentativos que metabolizaran compuestos que causaran esos resultados pero que no hayamos evidenciado su presencia. **Estos resultados solo significan que con los nutrientes disponibles en los medios de cultivo y las condiciones de siembra e incubación fueron los capaces de crecer en los mismos.**
- En el anexo 10 también podremos observar las imágenes ampliadas de las colonias presentes en las placas de los medios de cultivo apreciándose mejor las morfologías vistas de las levaduras y bacterias.

V.4 Identificación de microorganismos por pruebas moleculares y bioquímicas.

Como se ha visto a lo largo de la presentación de los resultados, hemos avanzado con la identificación de los microorganismos inoculados espontáneamente en el mosto de los fermentadores colocados en las estaciones de invierno y primavera. Este avance nos lleva a realizar pruebas que nos permitan llevar la identificación a resultados más aproximados y que nos den mayor certeza de los microorganismos presentes a través de pruebas moleculares para la identificación levaduras como lo es el **Análisis de Restricción del Amplificado del DNA Ribosomal utilizando la enzima *Hinf I*** y pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias como la **Tinción de GRAM y la prueba de Catalasa.**

Para llevar a cabo esto, en el caso de las levaduras se realizó el aislamiento de las colonias de interés (en el Anexo 6 se describe el procedimiento en que se aislaron las colonias) y una vez aisladas se procedió a realizar las pruebas moleculares. En el caso de las bacterias se tomaron directamente de los dos medios para bacterias las colonias de interés y se sometieron a las pruebas bioquímicas.

- **Pruebas moleculares para la identificación de levaduras: Amplificación del DNA Ribosomal (rDNA)**

Esta prueba consiste en realizar una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) directa de la colonia aislada, previa rotura térmica de las células para extraer el ADN de la levadura. Esta PCR permite la amplificación del DNA ribosomal y poder

hacer la separación de los fragmentos amplificados a través de la electroforesis horizontal en gel de agarosa (ver Anexo 9).

Los resultados de electroforesis horizontal en gel de agarosa a la PCR para los fermentadores de invierno se pueden observar en la Figura 12 y en la tabla 3.

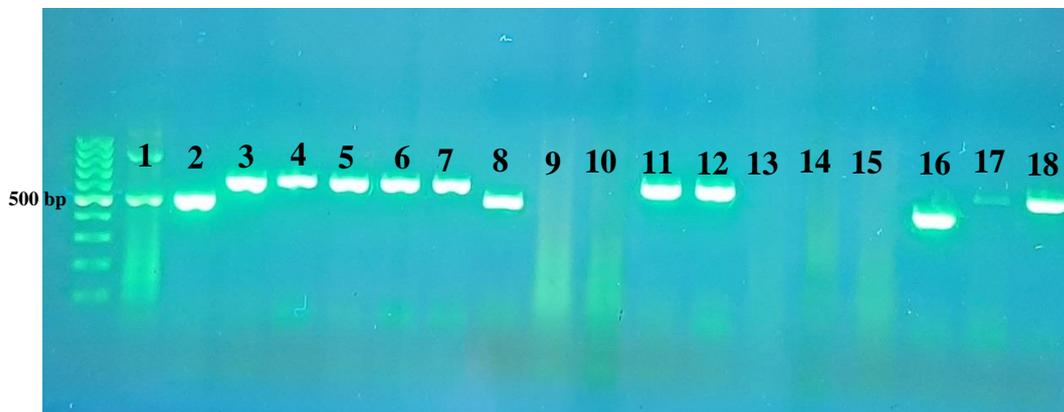


Fig. 12. Resultado de la PCR para identificación de levaduras en los fermentadores de invierno. Imagen del gel de Electroforesis. Cada carril (numerados del 1 al 18) representa cada muestra evaluada. El patrón utilizado fue el marcador GeneRuler 100 bp DNA Ladder (bandas del 1er carril de la izquierda).

En el gel podemos observar una buena separación de las bandas del marcador entre 100 bp y 500 bp, sin embargo la separación de las bandas desde 700 bp hasta 1000 bp es un poco más estrecha lo que dificulta un poco la identificación de las muestras en este rango. Sin embargo nos atrevemos a tener la presunción de los resultados que se muestran en la Tabla 3 y donde se resumen las PCR con amplificación del DNA Ribosomal de las muestras de los fermentadores de invierno. En todos los análisis utilizamos el buscador **yeast-id.org** para las posibles levaduras correspondientes a los fragmentos 5.8 S-ITS rDNA que reportó la electroforesis.

Tabla 3. Resultados electroforesis horizontal a los fragmentos de 5.8 S-ITS rDNA amplificados.

Muestra	Origen de la muestra aislada	Fragmentos ITS	Posible Género y/o Especie
1, 2 y 8	Muestras 1 y 8 Fermentador 1 Muestra 2 Fermentador 2	Alrededor de 500 bp	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>
3, 4, 5, 6, 7, 11 y 12	Muestras 3, 4, 5 y 6 Fermentador 1 Muestras 7, 11 y 12 Fermentador 2	De 700 bp a 900 bp	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>pastorianus</i> o <i>bayanus</i>
9, 10, 13, 14 y 15	Muestras 9 y 14 Fermentador 1 Muestras 10, 13 y 15 Fermentador 2	No Mostró	-
16	Fermentador 1	De 400 bp a 500 bp	<i>Candida agrestis</i> o <i>Candida spandovensis</i>
17 y 18	Fermentadores 1 y 2 respectivamente	De 700 bp a 800 bp	<i>Hanseniaspora valvyensis</i>

Los resultados de la electroforesis horizontal en gel de agarosa a los productos de la PCR amplificadas para los fermentadores de primavera se pueden observar en la Figura 13 y en la tabla 4.

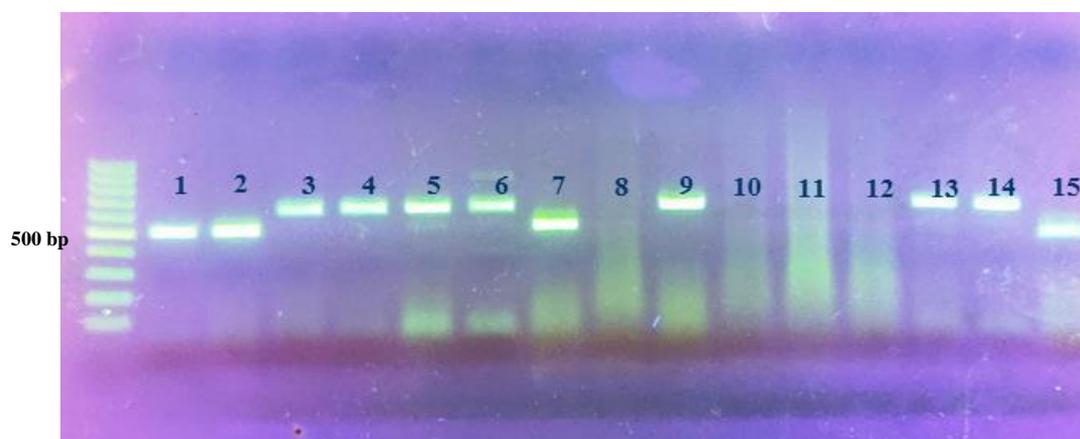


Fig. 13. Resultado de PCR para identificación de levaduras en los fermentadores de primavera. Imagen del gel de Electroforesis. Cada carril (numerados del 1 al 15) representa cada muestra evaluada. El patrón utilizado fue el marcador GeneRuler 100 bp DNA Ladder (bandas del 1er carril de la izquierda).

En el gel podemos observar una buena separación de las bandas del marcador entre 100 bp y 500 bp, sin embargo tal como ocurrió en el gel de los fermentadores de invierno la separación de las bandas desde 700 bp hasta 1000 bp fue más. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Resultados electroforesis horizontal a los fragmentos de 5.8 S-ITS rDNA amplificadas.

Muestra	Origen de la muestra aislada	Fragmentos ITS	Posible Género y/o Especie
1, 2 y 7	Muestra1 Fermentador 1 Muestras 2 y 7 Fermentador 2	Alrededor de 500 bp	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>
3, 4, 5, 6, 9, 13 y 14	Muestras 3, 4, 9 y 13 Fermentador 1 Muestras 5, 6 y 14 Fermentador 2	De 700 bp a 900 bp	<i>Saccharomyces cerevisiae,</i> <i>pastorianus o bayanus</i>
8, 10, 11 y 12	Muestras 8 y 10 Fermentador 1 Muestras 11 y 12 Fermentador 2	No Mostró	-
15	Fermentador 2	De 400 bp a 500 bp	<i>Candida agrestis o Candida spandovensis</i>

- **Pruebas moleculares para la identificación de levaduras: Análisis de Restricción del rDNA con enzima *Hinf I*.**

De las muestras de PCR amplificadas para los fermentadores de invierno y primavera se tomaron todas aquellas que mostraron fragmentos 5.8 S-ITS rDNA amplificadas y se corrió una digestión a 37°C con la enzima *HinfI*, luego se corrió la electroforesis horizontal en gel de agarosa. Los resultados se pueden observar en las figuras 14 y 15 y en la tabla 5.

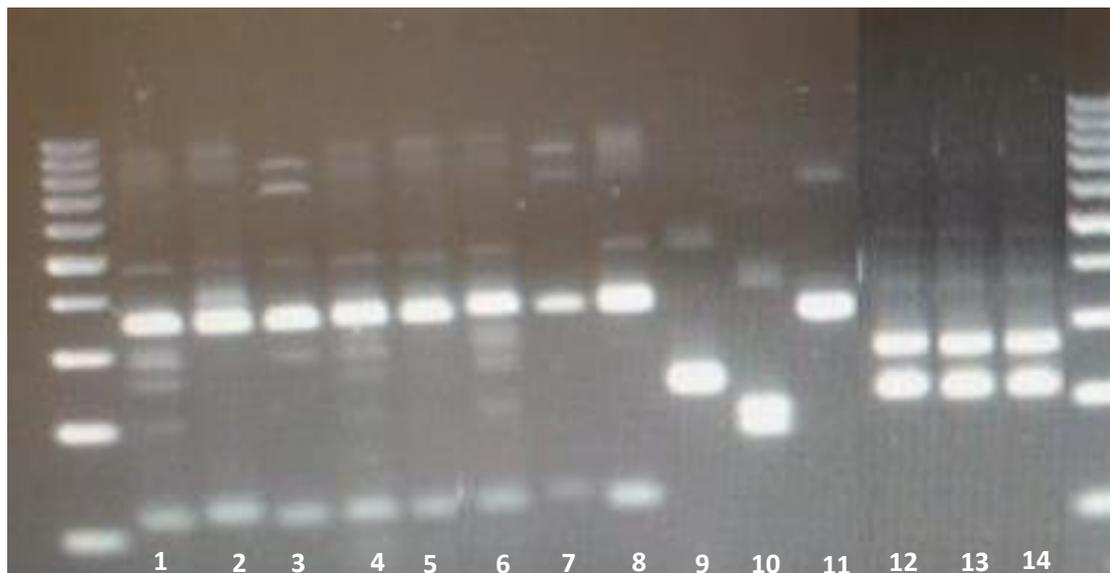


Fig. 14. Resultados de la restricción con enzima *Hinf*I para identificación de levaduras en los fermentadores de primavera. Imagen del gel de Electroforesis. Cada carrill (numerados del 1 al 14) representa cada muestra evaluada. El patrón utilizado fue el marcador GeneRuler 100 bp DNA Ladder (1era banda de la izquierda y de la derecha).



Fig. 15. Continuación de los resultados de la restricción con enzima *Hinf*I para identificación de levaduras en los fermentadores de invierno y primavera.

Los resultados de la electroforesis horizontal en gel de agarosa para las muestras de las PCR seleccionadas digeridas con enzima *Hinf* I mostraron buena separación de las bandas del marcador en todo el rango entre 100 bp y 1000 bp así que las muestras en principio se identifican con claridad. En la Tabla 5 podemos ver el resumen de lo mostrado en las Figuras 14 y 15 y con ayuda del buscador **yeast-id.org** se encontraron las posibles levaduras utilizando tanto los perfiles de restricción reportados en la electroforesis.

Tabla 5. Resultados electroforesis horizontal a la PCR con enzima *Hinfi I*.

Muestra	Origen de la muestra aislada y con PCR	<i>Hinfi I</i> (bp)	Posible Género y/o Especie
1,2,3,4,5,6,7 y 8	Muestras 1 y 2 Fermentador 1 Invierno Muestras 3 y 4 Fermentador 2 Invierno Muestras 5 y 6 Fermentador 1 Primavera Muestras 7 y 8 Fermentador 2 Primavera	365+365+155	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>pastorianus</i> o <i>bayanus</i>
9	Fermentador 1 Invierno	230+270	<i>Cryptococcus dimennae</i> , <i>Cryptococcus hungarus</i> o <i>Pichia delftensis</i>
10	Fermentador 1 Primavera	190+220	<i>Candida agrestis</i> o <i>Candida spandovensis</i>
11	Fermentador 1 Primavera	325+375	<i>Pichia Toletana</i>
12,13 y 14	Muestra 12 Fermentador 2 Primavera Muestras 13 y 14 Fermentadores 1 y 2 Invierno	215+270	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>
15,16 y 21	Muestras 15 y 16 Fermentadores 1 y 2 Invierno Muestra 21 Fermentador 2 Primavera	137+154+219	<i>Candida apicula</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> o <i>Rhodotorula graminis</i>
17,18,19,20,22 y 24	Muestra 17 Fermentador 2 Invierno Muestras 18 y 19 Fermentadores 1 y 2 Primavera Muestra 20 Fermentador 1 Invierno Muestras 22 y 24 Fermentador 1 y 2 Primavera	140+240+270	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>unigutulattus</i> o <i>Cryptococcus magnus</i>
23	Fermentador 2 Invierno	130+170+210+240	<i>Hanseniaspora valvyensis</i>

Si filtramos los resultados por tipo de levadura y su presencia/ausencia en cada fermentador de la estación invierno o primavera tenemos lo siguiente:

Tabla 6. Presencia/Ausencia de los géneros y/o especies de levadura en los fermentadores de invierno y primavera.

Género y/o Especie	Invierno		Primavera	
	Fermentador 1	Fermentador 2	Fermentador 1	Fermentador 2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>pastorianus</i> o <i>bayanus</i>	Presente	Presente	Presente	Presente
<i>Cryptococcus dimennae</i> , <i>Cryptococcus hungarus</i> o <i>Pichia delftensis</i>	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Candida agrestis</i> o <i>Candida spandovensis</i>	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
<i>Pichia Toletana</i>	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	Presente	Presente	Ausente	Presente
<i>Candida apicula</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> o <i>Rhodotorula graminis</i>	Presente	Presente	Ausente	Presente
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>unigutulattus</i> o <i>Cryptococcus magnus</i>	Presente	Presente	Presente	Presente
<i>Hanseniaspora valvyensis</i>	Ausente	Presente	Ausente	Ausente

De los resultados de la tabla 6 podemos mencionar lo siguiente:

- Tanto en invierno como en primavera hubo presencia de Levaduras ***Saccharomyces cerevisae, pastorianus o bayanus; Brettanomyces bruxellensis; Candida apicula, Issatchenkia orientalis o Rhodotorula graminis y Cryptococcus unigutulattus o magnus.***
- Solo en invierno hubo presencia de ***Cryptococcus dimennae, hungarus o Pichia delftensis y Hanseniaspora valvyensis.***
- Solo en primavera hubo presencia de ***Candida agrestis o spandovensis.***
- Estos resultados solo nos indican la posible presencia del género y/o especie de levadura mencionada. En los casos de los Fermentadores 1 de Invierno y Primavera donde no hubo atenuación aunque sí la posible presencia de *Saccharomyces cerevisae, pastorianus o bayanus* quizás la densidad poblacional de las especies presentes no era suficiente para competir con otros posibles microorganismos no fermentativos y por eso tal vez no hubo descenso en la densidad en dichos fermentadores.

- **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias: Tinción de GRAM**

Los resultados de la Tinción de GRAM para las colonias de bacterias crecidas en los medios de cultivo Universal+Natamicina y Universal+Natamicina+CaCO₃+Verde de Bromocresol correspondientes a los fermentadores de invierno y primavera se pueden observar en la Figura 16 y 17.

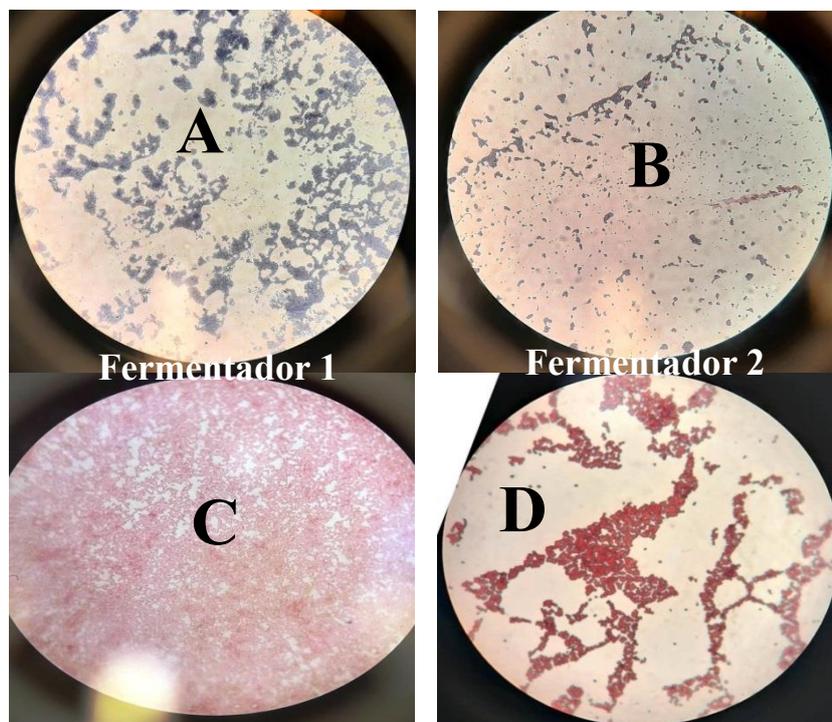


Fig. 16. Tinción de GRAM de las colonias bacterianas extraídas de los medios de cultivo Univ+Natamicina y Uni+Natamicina+CaCO₃+Verde de Bromocresol correspondiente a los fermentadores de invierno

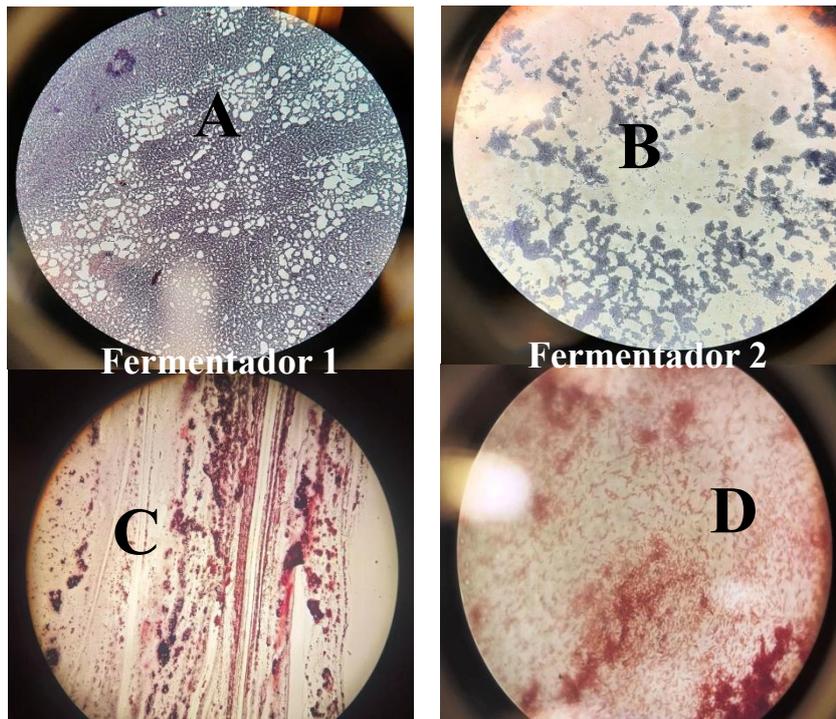


Fig. 17. Tinción de GRAM de las colonias bacterianas extraídas de los medios de cultivo Univ+Natamicina y Uni+Natamicina+CaCO₃+Verde de Bromocresol correspondiente a los fermentadores de primavera

Podemos observar en las imágenes de las Figuras 16 y 17 la tinción de GRAM de las colonias extraídas de los medios de cultivo. Notamos que hay dos tipos de colores en las distintas tinciones lo que nos indica que hay diferentes tipos de bacterias.

Las imágenes que se observan con tinción violeta corresponden a las muestras de las colonias extraídas del medio Universal+Natamicina incubado en anaerobiosis, ninguna tiñó de rojo, lo que nos indica que las bacterias presentes pertenecen al grupo de las GRAM positivas. Luego se realizó prueba de catalasa y todas resultaron negativas (no hubo formación de gas). Finalmente se observaron al microscopio y se verificó la presencia de morfologías de bacilos y cocos.

Estas pruebas bioquímicas realizadas, la respuesta de las colonias ante las mismas y las morfologías al microscopio nos indican la posible presencia de bacterias ácido lácticas (tal vez *Lactobacillus* y *Pediococcus*).

Respecto a las imágenes que se observan con tinción rojiza, todas corresponden a las muestras de las colonias extraídas del medio Universal+Natamicina+CaCO₃+Verde de Bromocresol que fue incubado en condiciones aerobias. La tinción de color rojo nos confirma que el tipo de bacteria evaluada pertenece al grupo de las GRAM Negativas, grupo al que pertenecen las bacterias ácido acéticas. También se realizó prueba de catalasa resultando positivo (hubo formación de gas).

Considerando estos resultados de Tinción de GRAM, Prueba de Catalasa y que las bacterias que crecieron en este medio solubilizaron el CaCO₃ podemos presumir la presencia de formadoras de ácido que tal vez pudieran ser del tipo Ácido Acéticas.

En las Figuras 19 y 20 podemos observar las morfologías al microscopio de las colonias extraídas del medios Univesal+Natamicina en los fermentadores.

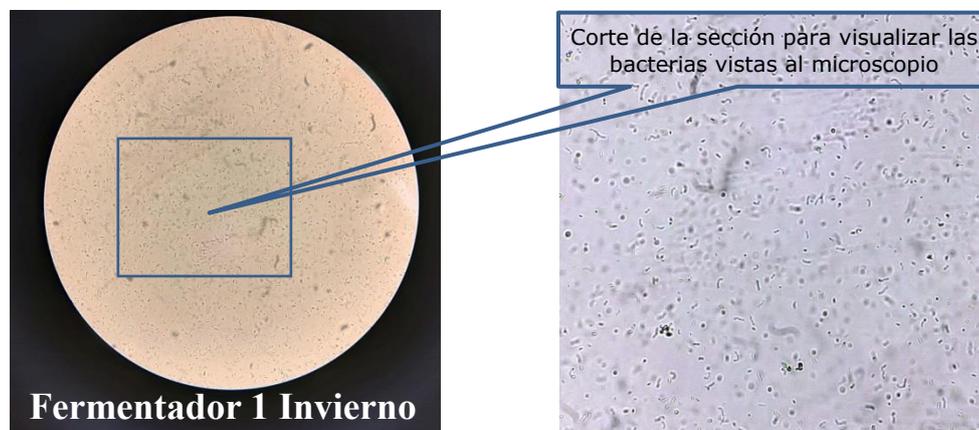


Fig.19 Imagen al microscopio de Bacterias extraídas del medio Univ.+Nat del fermentador 1 de invierno:

A) Imagen total vista con lente objetivo 40X; B) Vista ampliada de la sección central de la imagen

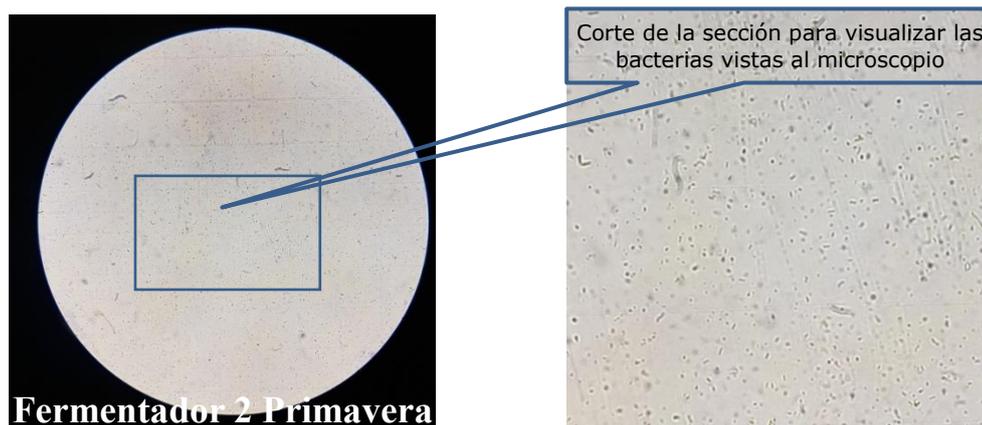


Fig.20 Imagen microscopio de Bacterias extraídas del medio Univ.+Nat del fermentador 2 de primavera:

A) Imagen total vista con lente objetivo 40X; B) Vista ampliada de la sección central de la imagen

En todas las imágenes se pueden ver claramente los bacilos y los cocos y con las pruebas bioquímicas orientativas (Tinción GRAM color Violeta y Catalasa Negativa) podemos decir que es posibles que sean *Lactobacillus* y *Pediococcus*.

Para finalizar el capítulo de resultados y discusión y bajo el supuesto hipotético que los microorganismos presentes en los fermentadores de Invierno y Primavera sean los que presumiblemente identificamos, compararemos esta microbiota con la de la cerveza Lambic que tradicional e históricamente es la cerveza de fermentación espontánea por excelencia.

Tabla 7. Comparación de la posible microbiota existente en los fermentadores evaluados con la microbiota de la cerveza Lambic.

Fermentadores Invierno y Primavera	Cerveza Lambic (Sparrow, 2005)
<i>Saccharomyces cerevisiae, pastorianus o bayanus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae, pastorianus y bayanus</i>
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> <i>Brettanomyces anomalus</i>
<i>Cryptococcus dimennaie,</i> <i>Cryptococcus hungarus</i> <i>Cryptococcus neoformans var. unigutulattus</i> <i>Cryptococcus magnus</i>	<i>Cryptococcus</i>
<i>Candida apicula</i> <i>Candida agrestis</i> <i>Candida spandovensis</i>	<i>Candidas</i>
<i>Pichia toletana</i> <i>Pichia delftensis</i>	<i>Pichias</i>
<i>Hanseniaspora valvyensis</i> (mismo género que la <i>Kloeckera</i> , se diferencian en la forma de reproducción)	<i>Kloeckera apiculata</i>
<i>Issatchenkia orientalis</i>	-
<i>Rhodotorula graminis</i>	-
-	<i>Hansenula</i>
-	<i>Enterobacter</i> <i>Citrobacter</i> <i>Echerichia</i> <i>Klebsiella</i> <i>Hafnia</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus damnosus</i> <i>Pediococcus parvulus</i>
<i>Acetobacter</i>	<i>Acetobacter aceti</i> <i>Gluconobacter oxydans</i>

Podemos observar en la tabla 7 que los principales microorganismos fermentativos, oxidativos y que aportan acidez en las cervezas Lambic (levaduras *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, levaduras oxidativas y bacterias lácticas y acéticas respectivamente) muy posiblemente también estuvieron presentes en los fermentadores evaluados lo que significa que es un buen hallazgo que permite darle continuidad al proyecto de Cervezas Ácidas de Fermentación Espontánea en Cervezas La Pirata.

CAPITULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**VI.1 CONCLUSIONES**

- Se verificó la existencia de microbiota en el ambiente del entorno de Cerveces La Pirata que permite la inoculación espontanea en mosto cervecero.
- Se identificó dicha microbiota encontrándose muy posiblemente en todos los fermentadores puestos en invierno y primavera Levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *pastorianus* o *bayanus*; *Brettanomyces bruxellensis*; *Candida apicula*, *Issatchenkia orientalis* o *Rhodotorula graminis* y *Cryptococcus unigutulattus* o *magnus*; *Lactobacilos*, *Pediococos* y *Acetobacter*. Adicionalmente en los fermentadores de invierno se identificó la posible presencia de *Cryptococcus dimennae*, *hungarus* o *Pichia delftensis* y *Hanseniaspora valvyensis* y en los fermentadores de primavera la posible presencia de *Candida agrestis* o *spandovensis*.
- La microbiota posiblemente identificada sería de utilidad y pertinencia para la fermentación espontanea de mosto cervecero.
- Existió gran diferencia en atenuación de los fermentadores con valores menores al 12% para unos y mayores al 90% para otros aun cuando tanto el mosto como las condiciones de enfriamiento y fermentación fueron las mismas. Esto avala el hecho de que la fermentación espontanea es un proceso con un componente de incertidumbre o aleatoriedad importante.
- Los fermentadores puestos en primavera presentaron Mohos al día siguiente del enfriamiento natural producto quizás de las condiciones de temperatura y humedad del ambiente. También presentaron una velocidad de atenuación mayor que la de los fermentadores de invierno.

VI.2 RECOMENDACIONES

- Continuar la investigación utilizando mosto con la receta de la cerveza ácida prevista y los equipos habituales (coolship, barricas, etc.) para la fermentación espontanea.
- Realizar el seguimiento microbiológico con una frecuencia mayor, determinando la densidad poblacional tanto de levaduras y bacterias con el fin ubicar la secuencia de aparición de cada microorganismo y el nivel de competencia en cada fase, tal como existe para la cerveza Lambic.
- Las condiciones ambientales de Primavera favorecen el crecimiento de microorganismos no deseados que pudieran contribuir al cambio de perfil organoléptico, así que no se recomienda realizar fermentación espontánea de mosto cervecero en dicha estación del año. Se recomienda la fermentación espontanea de mosto cervecero en invierno.

CAPITULO VII. BIBLIOGRAFÍA

- Anegon, Daniel, Fermentación Espontanea, el lado salvaje de la cerveza [Internet]. Cerveceraindependiente.com. 2015 [cited 16 Junio 2021]. Available from: <https://cerveceraindependiente.com/cultura-cervecera/fermentacion-espontanea-el-lado-salvaje-de-la-cerveza/>
- Artesana C, Lambic F. Fermentación espontánea. Cervezas Lambic [Internet]. Cervezania.com. 2020 [cited 1 Junio 2021]. Available from: <https://cervezania.com/blog/cervezas-lambic-n66>.
- Batle Soler, Laura. Selecció i caracterització de llevats autòctons. TFM URV. Tarragona-España, 2018
- Brasserie Timmermans [Internet]. Brtimmermans.be. 2020 [cited 1 November 2020]. Available from: <https://brtimmermans.be/en/>
- Brouwerij Boon [Internet]. Boon.be. 2020 [cited 17 Junio 2021]. Available from: <https://www.boon.be/en>
- Cantillon [Internet]. Cantillon.be. 2020 [cited 17 Junio 2021]. Available from: <https://www.cantillon.be/?lang=en>
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. i Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5,8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, pp. 329-337. <https://dx.doi.org/10.1099/00207713-49-1-329>.
- Ferrer Piquer, Mónica María. Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* nativas de Alboraya para la producción de cerveza. TFM URV. Tarragona-España, 2018
- Figuerola Gatell, Pol. Identificació i caracterització de llevats autòctons a la regió vitivinícola del priorat. TFM URV. Tarragona-España, 2019
- Forcadell Mulet, Sergi. Aïllament i Identificació de Microorganismes de L'entorn Agrari de lo Vilot s.l. per al seu ús Industrial. TFM URV. Tarragona-España, 2018.
- Goffeau A, et al. Life with 6000 genes. *Science* 274(5287):546, 563-7. USA, 1996.
- Heit, B. [Sui Generis Brewing]. 2014 [cited 5 de Julio de 2021]. Capturing Wild Yeast Part I – Capturing the Yeast [Arxiu de video]. Recuperat de: <https://www.youtube.com/watch?v=vqcc9ZeLBXM>

- Lindemans [Internet]. Lindemans.be. 2020 [cited 17 Junio 2021]. Available from: <https://www.lindemans.be/>
- Madigan M, Martinko J. Brock Biology of Microorganisms (11th ed. edición). Prentice Hall. USA, 2005.
- Makarova K, et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. Proc Natl Acad Sci 103(42):15611-6. USA, 2006.
- Ruiz-Barba, J. L., Maldonado, A. i Jiménez-Díaz, R. 2005 [cited 1 Julio 2021]. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. Analytical Biochemistry, 347, pp. 333-335. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.09.028>.
- Sparrow, Jeff. *WildBrews, Beer Beyond the Influence of Brewer'sYeast*. Brewers Publications. USA, 2005
- Spitaels, F., Wieme, A. D., Janssens, M., Aerts, M., Daniel, H-M., Van Landschoot, A., De Vuyst i L., Vandamme, P. 2014 [cited 10 Julio 2021]. The Microbial Diversity of Traditional Spontaneously Fermented Lambic Beer. Plos One, 9 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095384>
- The Oxford Companion to Beer Definition of lambic [Internet]. Craft Beer & Brewing. 2020 [cited 17 Junio 2021]. Available from:
- Van Oevelen, D., Spaepen, M., Timmermans, P. i Verachtert, H. (1977) [cited 1 Julio 2021]. Microbiological aspects of spontaneous wort fermentation in the production of lambic and gueuze. Journal of The Institute of Brewing, 83, pp. 356-360. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1977.tb03825.x>
- Verachtert, H. i Iserentant, D. Properties of Belgian acid beers and their microflora. Part I. The Production of gueuze and related refreshing acid beers. Cerevisia, Belgian Journal of Brewing and Biotechnology, 20, pp. 37-41. Bélgica, 1995.
- White, C. i Zainasheff, J. Yeast: The practical guide to beer fermentation. Boulder. Brewers Publications. USA, 2010.
- Zumarraga, Miren y Barbero, Francisco. *Pediococcus como bacteria alterante del vino*. Departamento de Enología de Guserbiot S.L.U. Álava-España, 2009.

CAPITULO VIII. ANEXOS**ANEXO 1****Toma de muestras fisicoquímicas**

Materiales requeridos: Botellas de plástico o de vidrio con tapa con capacidad mínima de 100 mL.

Soluciones y Reactivos: agua para limpieza, ácido peracético al 3% v/v

- 1) Abrir el grifo del fermentador y purgar entre 100 y 150 ml de cerveza.
- 2) Curar la botella con la cerveza a muestrear al menos dos (2) veces para garantizar que el muestreo se realice de manera efectiva.
- 3) Tomar 100 ml de muestra en la botella.
- 4) Una vez tomada la muestra, lavar el grifo con agua limpia y luego con la solución de ácido peracético al 3% v/v
- 5) Trasladar la muestra al laboratorio para su análisis.

ANEXO 2**Análisis de densidad y °Plato**

- 1) Colocar un papel de filtro en un embudo plástico y éste a su vez sobre una Erlenmeyer de 100 ml.
- 2) Adicionar la muestra sobre el papel de filtro, dejar filtrar hasta obtener una cantidad suficiente (30 ml).
- 3) En caso de ser necesario, se debe atemperar la muestra a (20 ± 3) °C.
- 4) Succionar la muestra filtrada con el densímetro Anton Paar los hasta que el pistón de succión llegué a su tope (llenado total).
- 5) Desechar y repetir la succión y desecho dos veces más.
- 6) Succionar y dejar el densímetro en posición horizontal para que estabilice y analice la muestra.
- 7) Leer el valor de densidad luego que se haya estabilizado.
- 8) Limpiar el densímetro de acuerdo al protocolo de limpieza.

Análisis de pH

- 1) Verter la muestra en un beaker.
- 2) En caso de ser necesario, se debe atemperar la muestra a (20 ± 3) °C.
- 3) Proceder a la medición del pH con el pHmetro Mettler Toledo y registrar cuando se haya estabilizado la medición.

ANEXO 3**Toma de muestras microbiológicas**

Materiales requeridos: Botella de vidrio con su respectiva tapa, limpia, sin trazas de detergente y sometida a un proceso de esterilización de 15 minutos a mínimo 100°C, Hisopos estériles, Mechero portátil, encendedor y guantes de latex.

Soluciones y Reactivos: Agua para limpieza, Etanol, Ácido Peracético al 3 % v/v.

- 1) Purgar del tanque por lo menos 100 ml de muestra. Abrir y cerrar el grifo sucesivamente de manera repentina, para garantizar la eliminación de restos en el interior de la pieza.
- 2) Cerrar el grifo y limpiar el tomamuestra con agua limpia y un Hisopo estéril, luego con ácido peracético e hisopo y de último con etanol e hisopo estéril.
- 3) Abrir el grifo y dejar salir unos 50 ml de muestra y luego tomar la botella estéril y muestrear por lo menos 100 ml de muestra.
- 4) Limpiar el tomamuestra con agua limpia y un Hisopo estéril, luego con ácido peracético e hisopo y de último con etanol e hisopo estéril.
- 5) Traslade la muestra al laboratorio para su análisis.

ANEXO 4**Preparación de medios de cultivo.**

Medio Universal (agar universal para cerveza): Medio basal que, con la adición de cerveza, se usa para el cultivo de microorganismos significativos en la industria cervecera. Medio compuesto de leche peptonizada, extracto de levadura, suero de tomate, fosfatos, cloruro de sodio, sales minerales, nitrógeno, vitaminas y factores de crecimiento. Además durante la preparación se adiciona cerveza que aporta alcohol y lúpulo, creando un ambiente muy favorable para el crecimiento de los microorganismos contaminantes de la cerveza. La fuente de carbono y energía la suministra la glucosa y los fosfatos tamponan el medio. El cloruro sódico y las otras sales minerales mantienen el equilibrio osmótico. La cerveza aumenta la acción selectiva y estimulante, ya que tanto el alcohol como los componentes del lúpulo eliminan la mayoría de los contaminantes del aire permitiendo el crecimiento de levaduras propias de mosto y cerveza, incluso cepas salvajes y las contaminantes.

Fórmula en g/L

Glucosa	16 g	Sulfato de Manganeso	0,006 g
Peptona	15 g	Sulfato férrico	0,006 g
Extracto de levadura	6 g	Cloruro de sodio	0,006 g
Suplemento de tomate	12 g	Sulfato de Magnesio	0,12 g
Agar bacteriológico	15 g	Fosfato monopotásico	0,3 g
Fosfato dipotásico	0,3 g		

Preparación: Suspender 65 g del polvo en 750 ml de agua destilada y llevar a ebullición con agitación constante hasta la disolución completa. Añadir 250 ml de cerveza y homogeneizar suavemente para desgasificar. Distribuir en recipientes adecuados y esterilizar a la autoclave a 121°C durante 10 minutos.

Medio Universal- Natamicina: Todas las ventajas del medio universal con la adición de Natamicina para inhibir el crecimiento de hongos (entre ellos los mohos y levaduras). Este medio se utilizó para el crecimiento de bacterias ácido lácticas por lo que las placas se incubaron en anaerobiosis.

Preparación: Medio Universal con la adición de Natamicina a 0.01% (100 mg/l), después de autoclavar.

Medio Universal-Cloramfenicol: Todas las ventajas del medio universal con la adición de Cloramfenicol que inhibe el crecimiento de bacterias como *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Acetobacter*, *Zymomonas*, microorganismos adaptados a la cerveza.

Preparación: Medio Universal con la adición de 0.01% (100 mg/l), después de autoclavar.

Medio Agar lisina: Un medio sintético para el aislamiento y cuantificación de levaduras silvestres que se encuentran en la elaboración de cerveza. En este medio, se suprimen las levaduras de cultivo como las *Saccharomyces cerevisiae* y *pastorianus* debido a que la única fuente de nitrógeno es la Lisina por lo que ninguna cepa normal de la industria cervecera utiliza Lisina como fuente de nitrógeno, permitiendo el crecimiento de otras levaduras, incluidas las salvajes que si pueden utilizar la Lisina como nutriente.

Fórmula en g/L

Yeast carbon base	11,75 g
Lisina. HCl	2,5 g
Agar bacteriológico	20,00 g
Agua destilada	1 L

Medio diferencial WLN+Cloramfenicol para levaduras: El medio nutritivo de Wallerstein (WLN) se emplea para el cultivo de levaduras y mohos que se encuentran en la industria cervecera y procesos industriales de fermentación. En el caso de la cerveza con un pH de 5,5 se pueden hacer recuentos de distintos tipos de levaduras. A este medio también se le **adicionó Cloramfenicol para inhibir el crecimiento de bacterias.**

Fórmula en g/L

WLN media	80 g
Agua destilada	1L
Cloramfenicol	100mg/L (adicionar después de autoclavar)

Medio Universal+Natamicina+CaCO₃+Verde de Bromocresol: Todas las ventajas del medio universal con la adición de Natamicina para inhibir el crecimiento de hongos (entre ellos los mohos y levaduras) también se adicionó 20 ppm de Verde de Bromocresol y 3 g/L de CaCO₃ que permitirán ver los halos de viraje de color o aclaramiento alrededor de las bacterias formadoras de ácidos capaces de solubilizar el CaCO₃, por lo que las placas de este se incubaron en aerobiosis.

Medio YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose)

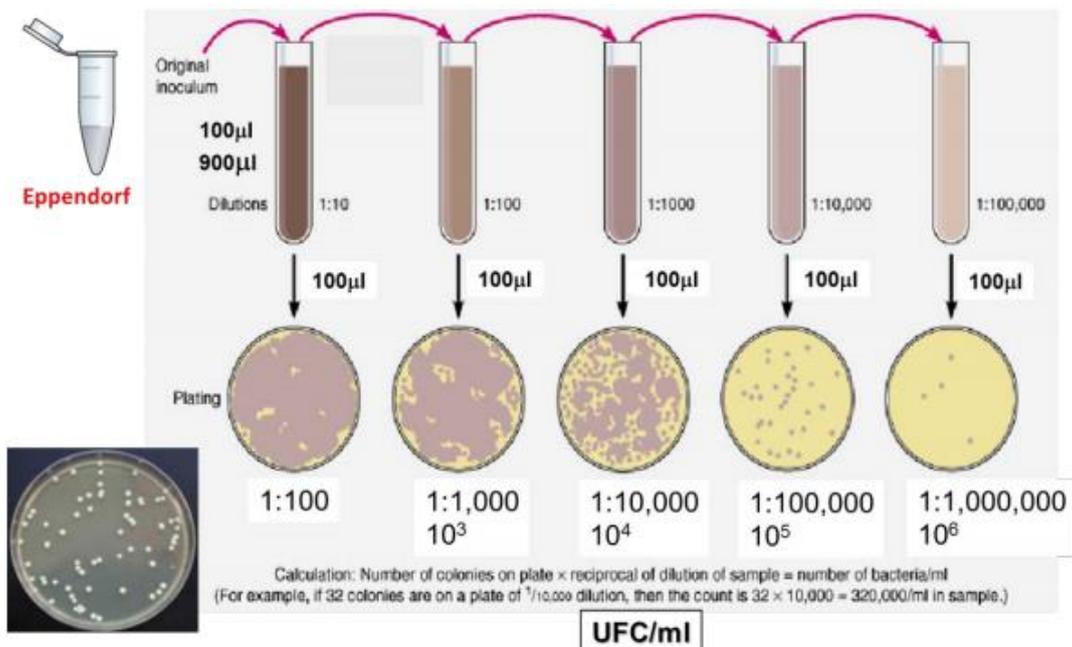
Glucosa	20 g
Peptona	20 g
Extracto de levadura	10 g
Agar bacteriológico	20 g
Agua destilada	1 L

Preparación: Suspender todos los sólidos en el litro de agua destilada y llevar a ebullición con agitación constante hasta la disolución completa. Distribuir en recipientes adecuados y esterilizar a la autoclave a 121°C durante 10 minutos.

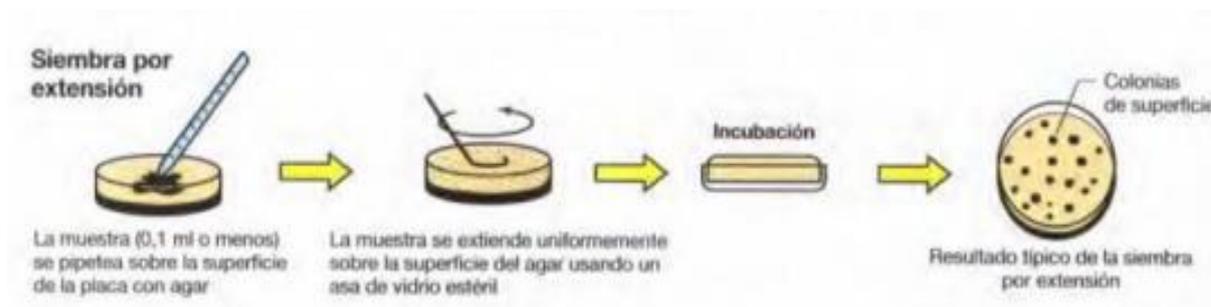
ANEXO 5

Siembra en medios de cultivo.

Siembra en superficie / extensión en placa



Para extender sobre la superficie de la placa la muestra se utiliza una asa de siembra vidrio (asa de Digraslky), o perlas de vidrio estériles.



Las placas de los medios Universal+Cloranfenicol, WLN+Cloramfenicol y Lisina se incuban a 28 °C de 3 a 5 días de forma aerobia, las placas del medio Universal+Natamicina se incuban a 28 °C 5 días en anaerobiosis y las placas del medio Universal+Natamicina+CaCO₃+verde de Bromocresol a 28 °C 5 días de forma aerobia.

ANEXO 6

Aislamiento de levaduras.

El aislamiento se realizó por diseminación en la superficie de los medios sólidos en placa de Petri dado que es la técnica más utilizada.

Con un Asa de siembra, calentada al rojo vivo en el mechero y enfriada cerca del mismo o tocando el medio, se toma una muestra del cultivo de levadura y se extiende sobre la superficie de la placa de YPD, pero sin hacer presión para no dañar el agar. Se lleva la placa a incubar a 28 °C. Mediante esta técnica se obtienen colonias aisladas a partir de los medios Universal+Cloranfenicol, WLN+Cloranfenicol y Agar Lisina que contenían varias especies de levadura. Existen distintos tipos de trazados tendientes a lograr una buena separación entre los muestras sembradas. En este trabajo se utilizó el trazado de Agotamiento de Asa de Platino, en donde se flamea el Asa, se enfría y después de rozar la siembra realizada previamente, se realizan estrías en dos placas en forma consecutiva sin recargar el Asa.

ANEXO 7

Evaluación por Microscopía Óptica y observación de colonias en placa

Una de las técnicas utilizadas en el laboratorio para la diferenciación es la observación directa al microscopio (con lentes objetivo 10X y 40X). El principio en que se basa esta técnica es la identificación de las diferentes morfologías de cada microorganismo (las cuales se pueden conseguir en la bibliografía o con el apoyo del personal especializado) y de acuerdo a esto determinar si la morfología vista al microscopio corresponde a levaduras o a bacterias. En esta técnica se tomó

asépticamente bajo mechero bunsen y uso de puntas estériles un aproximado de 10 a 20 μ l de muestra y se coloca en una lámina portaobjetos, luego se cubre con un cubreobjetos y se observa al microscopio con los lentes objetivo 10X y 40X.

Otro estudio para la diferenciación e identificación de microorganismos es la observación macroscópica de la colonia cuando se cultiva en medio sólido; de la multiplicación de cada microorganismo se origina una colonia formando una masa de millones de células observables a simple vista. La morfología de la colonia deriva de cada célula pero es una característica de la masa celular.

Las características que se observan y se analizan de cada colonia son:

- a) Tamaño: uniforme para cada especie o tipo, las dimensiones varían desde muy pequeñas o apenas visibles, hasta unos centímetros de diámetro.
- b) Consistencia: blanda, seca o viscosa.
- c) Forma: depende del borde y del espesor. El borde puede ser liso, entero, ondulado, aserrado, etc. El espesor depende de la elevación pudiendo ser chatas, elevadas, convexas, cónicas, crateriformes, etc.
- d) Otras características observables son Pigmentación, Olor y Formación de Halos.

ANEXO 8

Tinción de Gram

Durante la aplicación de la prueba es importante disponer de una bandeja para tinciones o su equivalente y papel absorbente para evitar manchar las superficies de trabajo, ya que los colorantes empleados se fijan fácilmente a la superficie de los mesones de laboratorio

- Seleccionar bajo la lupa con ayuda del asa, una o varias colonias del microorganismo a identificar.
- Realizar un frotis del microorganismo en una gota de agua estéril sobre un portaobjeto limpio y seco.
- Fijar el frotis al portaobjeto pasándolo por encima de la llama de un mechero cuidadosamente o dejándolo secar al aire libre.
- Cubrir el portaobjeto con la solución cristal violeta o violeta de genciana durante dos (2) minutos.
- Sin escurrir o lavar el portaobjetos, fijar el colorante cubriéndolo con lugol y mantener durante un (1) minuto. Al transcurrir este tiempo inclinar el portaobjeto para escurrir los reactivos y cubrir nuevamente el portaobjeto con lugol durante (1) minuto adicional.
- Escurrir el portaobjeto y dejar correr agua destilada desde un extremo de portaobjeto.

- Eliminar exceso de colorante con la solución de alcohol-acetona durante 5-10 segundos.
- Lavar con agua destilada y dejar secar.
- Cubrir con rojo Safranina durante dos (2) minutos para contrateñir.
- Escurrir el portaobjeto y dejar correr agua destilada desde un extremo.
- Dejar secar.
- Observar la coloración del microorganismo con la ayuda del microscopio en campo claro. Para mejor visualización puede utilizar aceite de inmersión y el objetivo correspondiente.

ANEXO 9

AMPLIFICACIÓN DEL ADN ribosomal (rDNA)

En la PCR directa de colonia, se hace previamente una rotura térmico de las células, para obtener el ADN.

En un tubo de PCR se añade una colonia de levadura a 50 µL de agua milliQ estéril. Se pone a 95°C durante 10 min, y del sobrenadante (donde estará el DNA) se cogen 2 µL para hacer la PCR

Preparación de la muestra (VT = 50 l)

(Se puede preparar un mix con todos los ingredientes excepto el DNA. Para esta preparación se tienen en cuenta el número de muestras a hacer, más 2-3 muestras adicionales, para tener volumen suficiente).

- H2O Milli-Q estéril ...(volumen necesario para tener un volumen final de 50 µl)
- Tampón Taq 10x (sin MgCl₂) (EcoTaq) 5µl
- Sol. MgCl₂ (50mm), (EcoTaq) 3µl
- Oligonucleótidos
 - ITS1 (conc. Final 10 pm) ... 1µl
 - ITS4 (conc. Final 10 pm) ... 1µl
- dNTPs (Boehringer Mannheim) 4µl una mezcla que contiene los 4 (dATP, dCTP, dTTP y dGTP) a una concentración de 10 mM.
- DNA 2 ul de DNA extraído
- Taq polimerasa (EcoTaq) 1µl

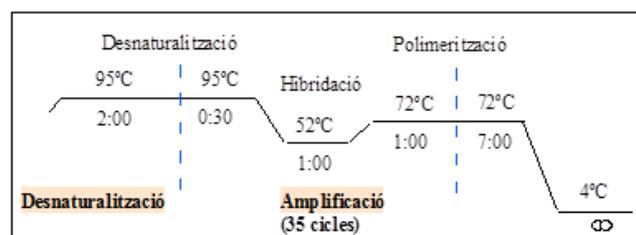


Figura: Programa de PCR.

Posteriormente, se lleva a cabo, una electroforesis horizontal en un gel al 1,2% (p/v) d'agarosa Multipurpose en tampón de migración 1xTBE.

En este gel, se cargan 10 ul de ADN amplificado al que se le añade 2 ul de tampón de carga (que contiene azul de bromofenol) y se utiliza 5 ul del DNA Ladder de 100 pb como marcador de peso molecular. El gel se somete a un voltaje de 80V durante 1-2 horas.

ANALISIS DE RESTRICCIÓN DEL rDNA

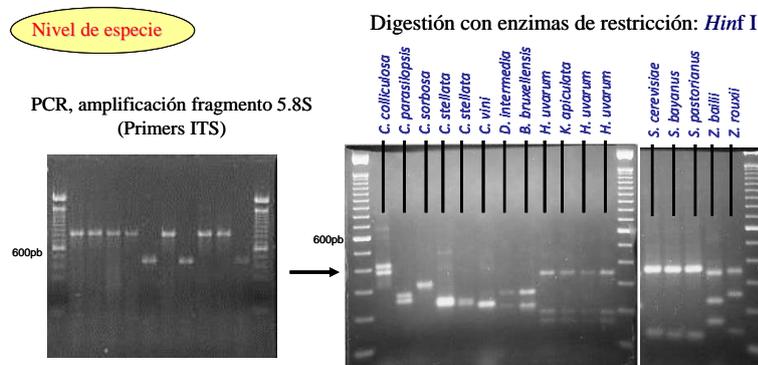
Los productos de PCR se digieren con la enzima de restricción *Hinf*I:

Preparación de la muestra (VT = 20µl).

- 9 ul d'H₂O Milli-Q estéril
- 2 ul Tampón del enzima correspondiente
- 1 ul Enzima correspondiente
- 8 ul DNA amplificado

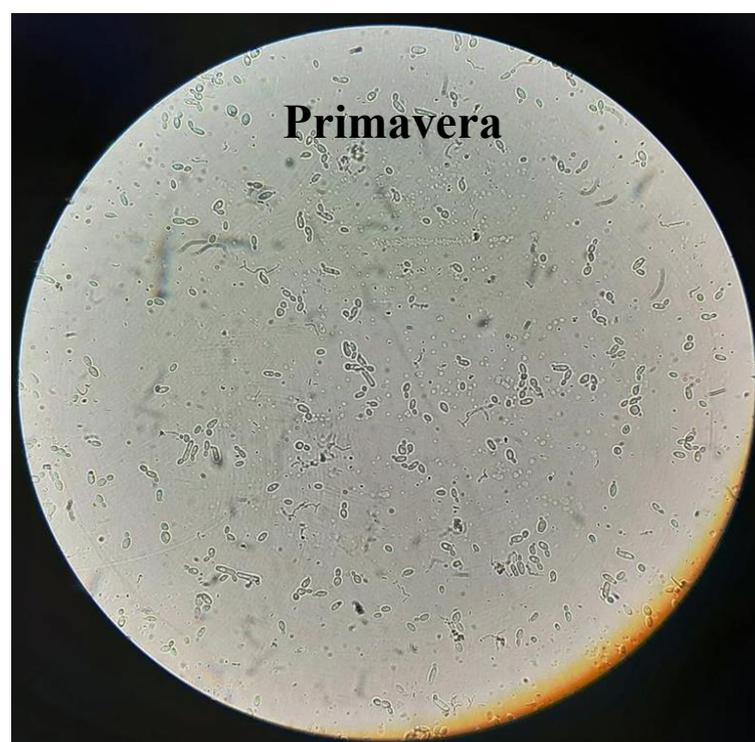
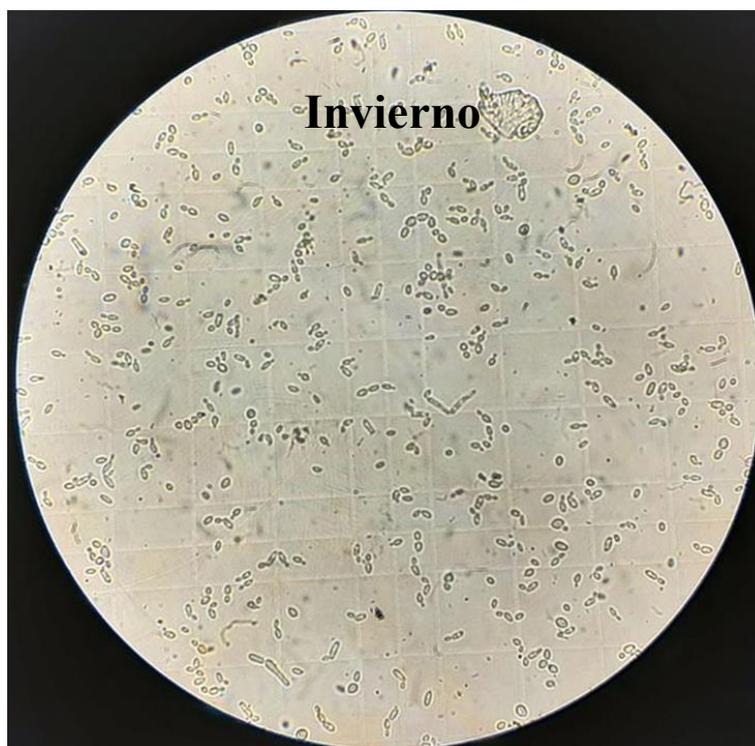
La muestra se incuba a 37°C durante 6 horas.

Para observar el resultado de la digestión, se lleva a cabo una electroforesis horizontal, como en el caso anterior. En la muestra digerida se le adicionan 2 ul de colorante Azul de bromofenol (diluido 1/2) y se carga en un gel al 3% (p / v) d'agarosa Multipurpose utilizando como marcador 5µl de DNA Ladder de 100pb. El voltaje utilizado es 80V durante 2-3 horas.

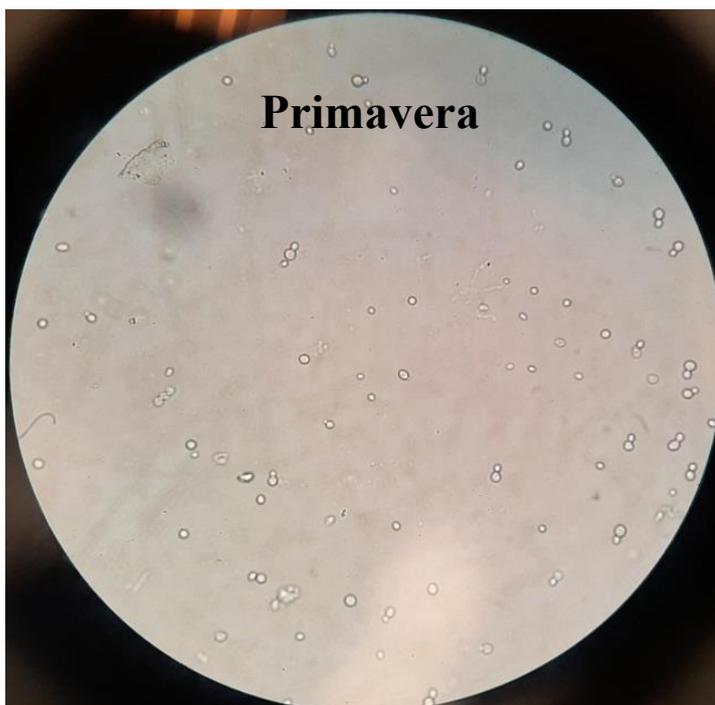
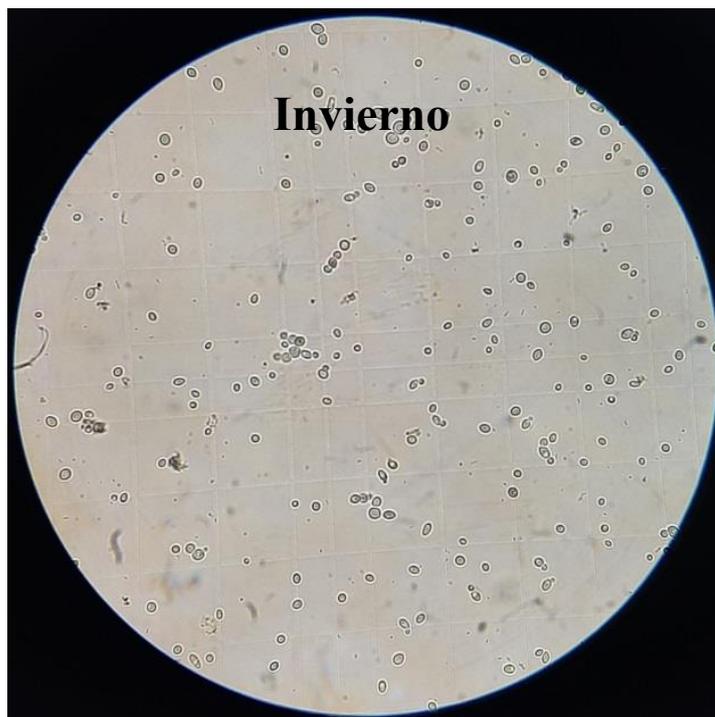


ANEXO 10

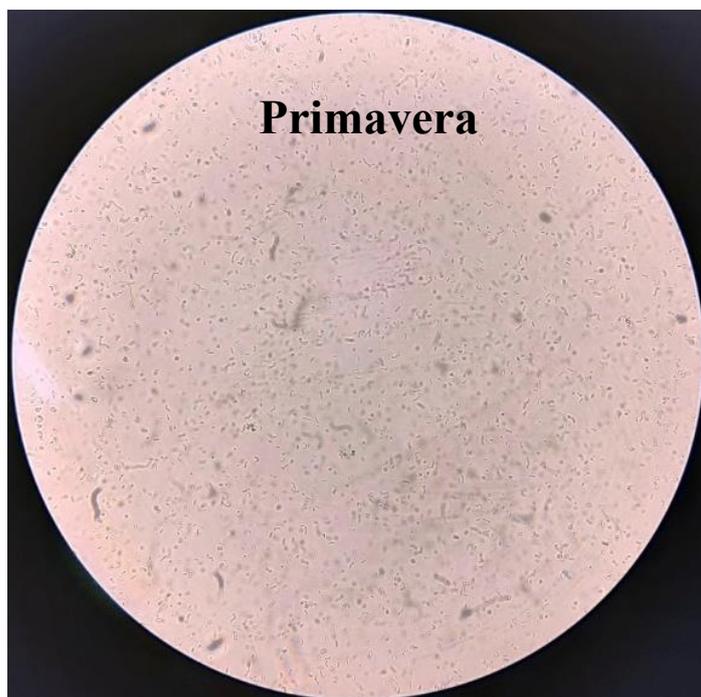
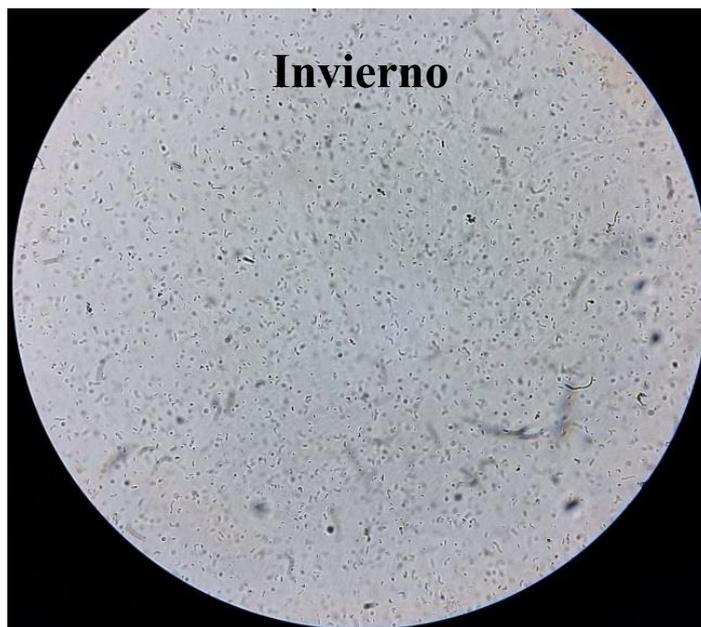
**Imágenes ampliadas del microscopio óptico y las colonias en placa
Fermentadores de Invierno y Primavera**



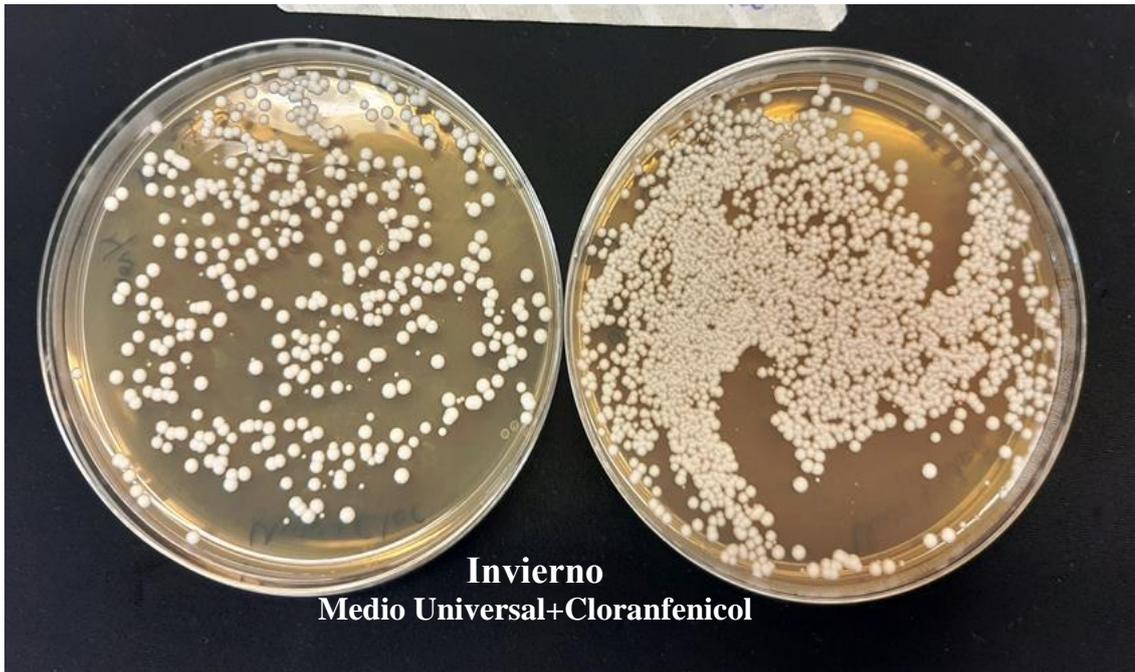
Imágenes de levaduras aisladas de los Fermentadores de Invierno y Primavera



Imágenes de bacterias de los Fermentadores de Invierno y Primavera



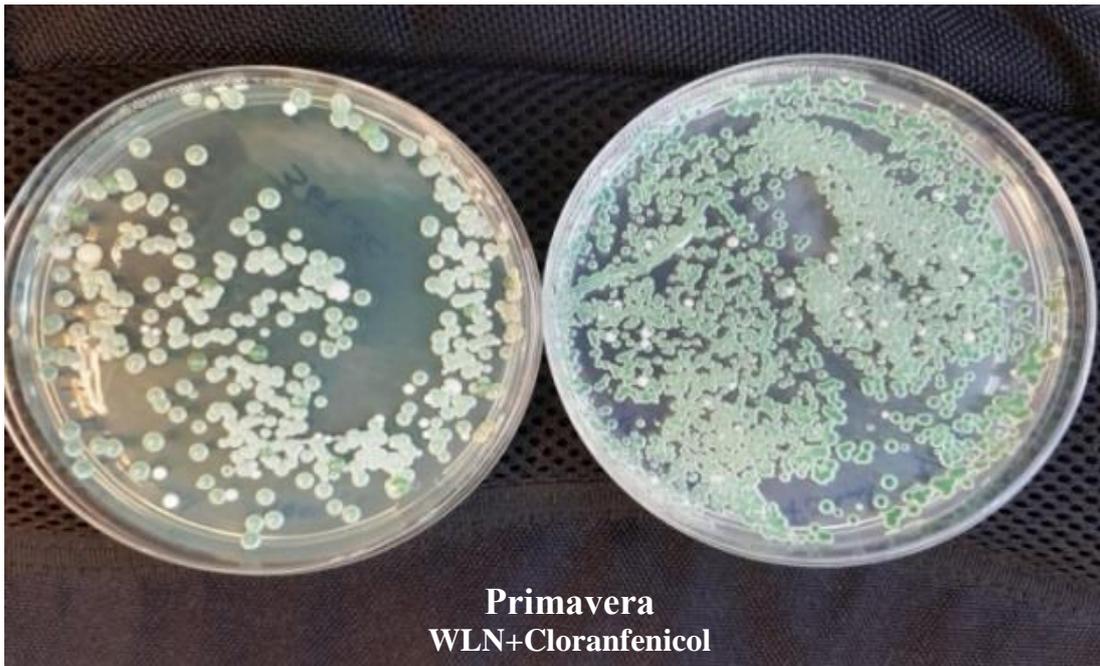
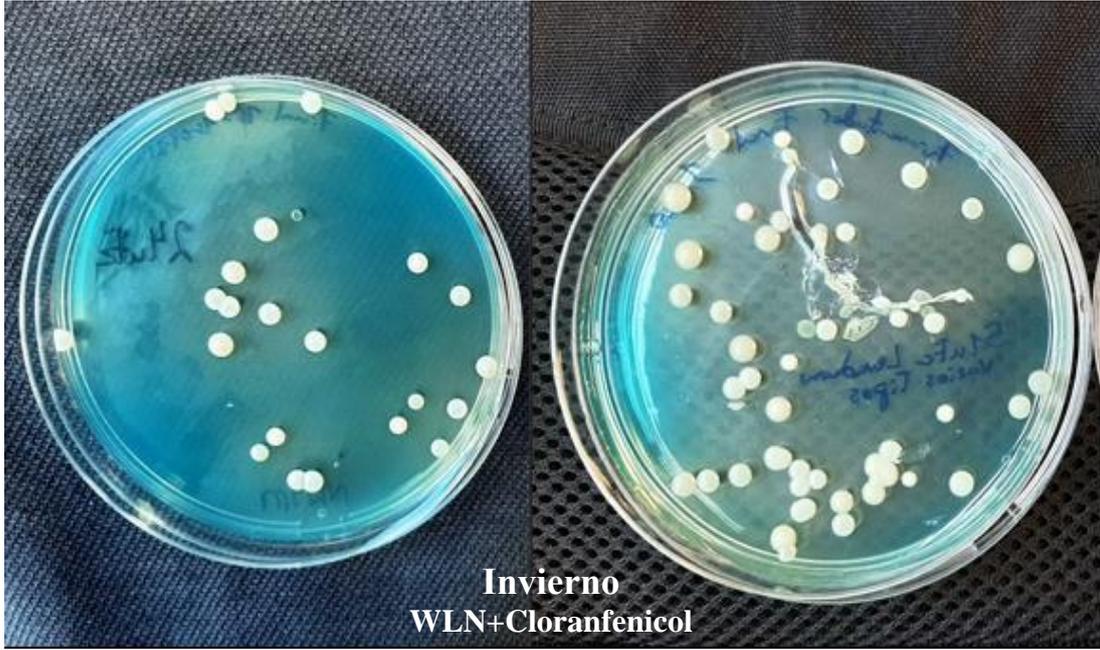
Imágenes de la siembra en placas de los Fermentadores de Invierno y Primavera

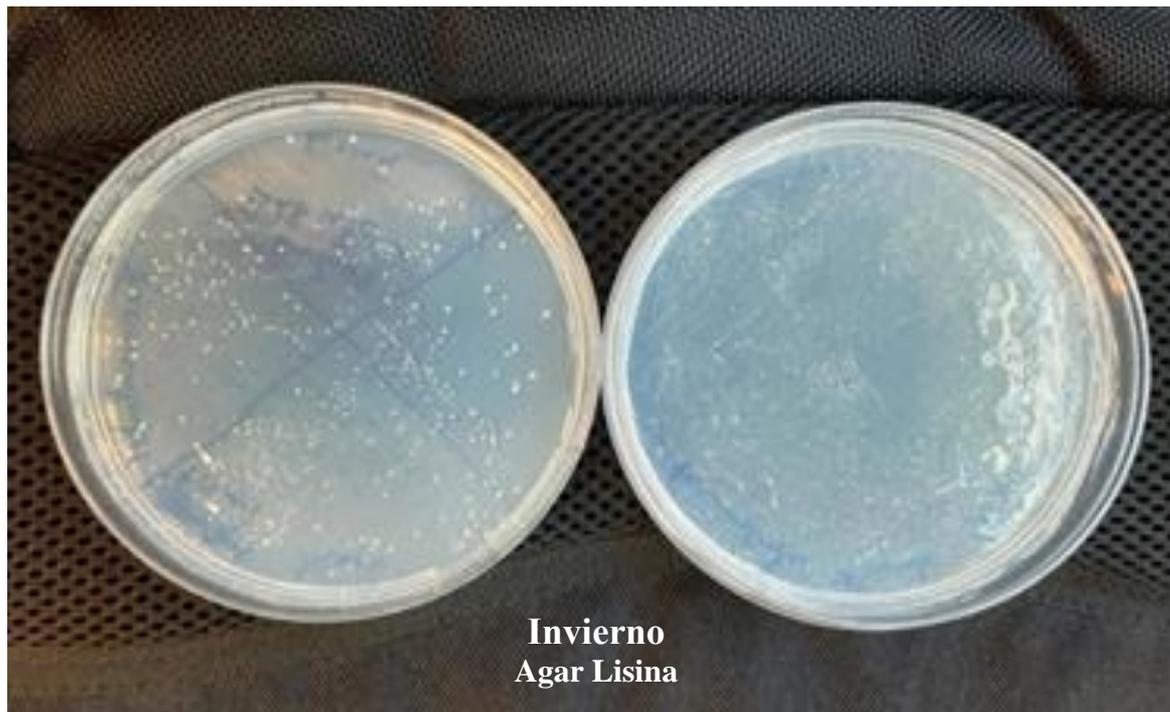


Invierno
Medio Universal+Cloranfenicol

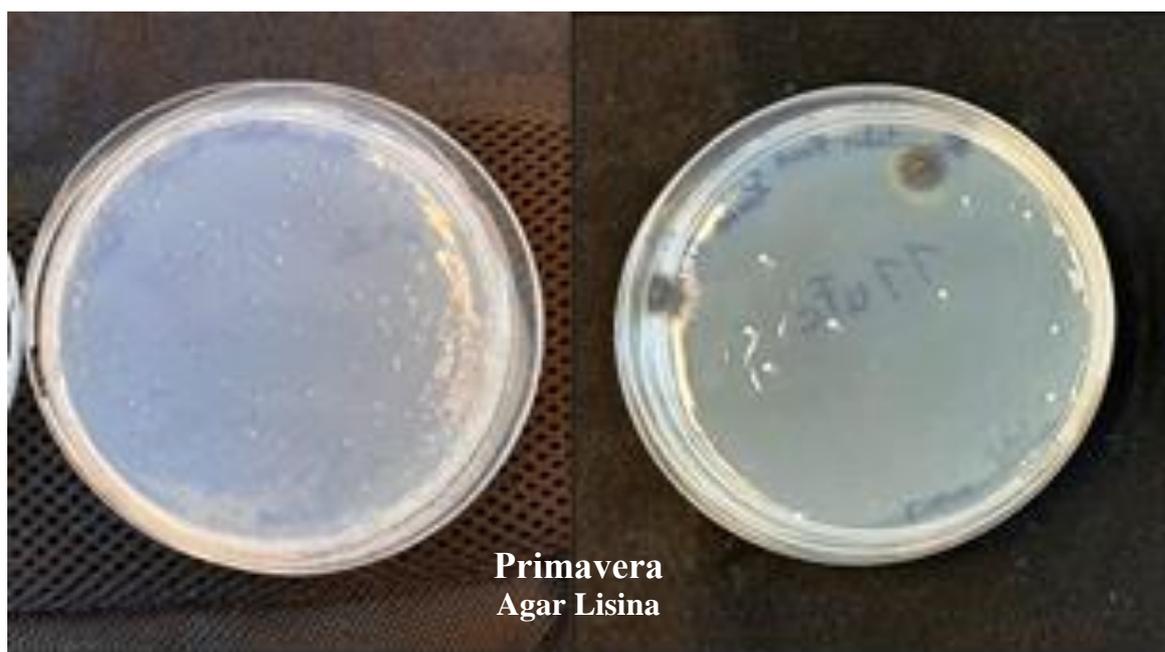


Primavera
Medio Universal+Cloranfenicol





Invierno
Agar Lisina



Primavera
Agar Lisina



Invierno
Universal+Natamicina



Primavera
Universal+Natamicina

