



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA

“ALBERTO CAZORLA TALLERI”

**EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN “HIGH
THROUGHPUT” DE MICROORGANISMOS CONTAMINANTES DE
CERVEZA PARA UNA CERVECERÍA ARTESANAL**

**TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL PARA OPTAR EL TÍTULO
PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

Autor:

JOSE LEONARDO CHOU LUY

Asesor:

DR. RAUL LOAYZA MURO

LIMA – PERÚ

2023

Dedicatoria

Este Trabajo de Suficiencia Profesional está dedicado a mi esposa Kareen y mi familia por su apoyo incondicional para lograr todas mis metas.

A mi asesor, el Dr. Raúl Loayza por su guía, paciencia y dedicación en la realización de este Trabajo de Suficiencia Profesional.

Agradecimientos

Al Ing. Franco Cruz y el Cervecerero Walter Pröetzel por compartir sus conocimientos de cervecería industrial y artesanal.

A los revisores, Dr. Aldo Chinen y Mg. Ruth Cristóbal por su retroalimentación para poder mejorar el trabajo.

A mis profesores y a todas las personas que me apoyaron en el desarrollo de este trabajo.

EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN “HIGH THROUGHPUT” DE _MICROORGANISMOS CONTAMINANTES DE CERVEZA PARA UNA CERVECERÍA ARTESANAL

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

| | | |
|---|--|-----|
| 1 | rdi.uncoma.edu.ar Fuente de Internet | 1% |
| 2 | repositorio.uss.edu.pe Fuente de Internet | 1% |
| 3 | hdl.handle.net Fuente de Internet | 1% |
| 4 | repositorio.unac.edu.pe Fuente de Internet | <1% |
| 5 | es.scribd.com Fuente de Internet | <1% |
| 6 | www.coursehero.com Fuente de Internet | <1% |
| 7 | mdpi-res.com Fuente de Internet | <1% |
| 8 | patents.google.com Fuente de Internet | <1% |

Índice

| | |
|---|-----------|
| 1. RESUMEN..... | 1 |
| 2. ABSTRACT..... | 3 |
| 3. INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 4. ANTECEDENTES..... | 6 |
| 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 11 |
| 6. OBJETIVOS..... | 13 |
| 6.1. General..... | 13 |
| 6.2. Específicos..... | 13 |
| 7. JUSTIFICACIÓN..... | 14 |
| 8. MARCO TEÓRICO..... | 19 |
| 8.1. Estado del arte de métodos de detección de microorganismos cerveceros.. | 26 |
| 8.1.1. Métodos tradicionales basado en medios de cultivo y bioquímica.... | 27 |
| 8.1.2. Métodos Proteómicos..... | 30 |
| 8.1.3. Métodos basados en Biología Molecular..... | 33 |
| 8.1.3.1. Polymerase Chain Reaction PCR..... | 33 |
| 8.1.3.2. Secuenciamiento de DNA..... | 34 |
| 8.1.4. Enriquecimiento de muestras..... | 36 |
| 8.2. Detección de Hongos que producen micotoxinas..... | 37 |
| 8.3. Detección de levaduras salvajes..... | 37 |
| 8.4. Evaluación Económica..... | 37 |
| 9. METODOLOGÍA..... | 39 |
| 9.1. Etapa 1: Revisión sistemática..... | 39 |
| 9.2. Etapa 2: Análisis económico Costo/eficacia de los métodos de análisis de microorganismos que deterioran la cerveza..... | 43 |
| 10. RESULTADOS..... | 44 |
| 11. DISCUSIÓN..... | 69 |
| 12. CONCLUSIONES..... | 77 |
| 13. RECOMENDACIONES..... | 78 |
| 14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 79 |

1. RESUMEN

La cervecería artesanal es un mercado que presenta un crecimiento de 20% anual desde el 2019. Para satisfacer la demanda del mercado, las cervecerías han desarrollado nuevos estilos de cerveza, con menos amargor, menos CO₂, alcohol (incluso cerveza sin alcohol). Estos factores, el amargor, producido por las humolonas (alfa ácidos lupúlico) que tienen efecto perforinas en las bacterias, el alcohol (bacteriostático), la baja concentración de CO₂, reducen la protección natural de la cerveza a la proliferación de microorganismos que deterioran la cerveza. Se define que la le cerveza se deteriora al adquirir sabores extraños al diseño original, principalmente la producción de ácido láctico por las bacterias, o una sobre atenuación por levaduras extrañas al cultivo principal. Este efecto ha sido reportado en la literatura los últimos cinco años.

La contaminación de un lote afecta sustancialmente los ingresos de la cervecería. Para reducir la probabilidad de la contaminación de microorganismos de cerveza, es necesario el Control de Calidad Microbiano. Los métodos microbiológicos tradicionales que emplean medios de cultivo y pruebas microbiológicas, requieren de 5-14 días para generar un resultado, afectando la productividad de un mercado cuyos lotes son pequeños y con muy alto valor. Existen nuevos métodos basados en metodologías como la Proteómica y la Biología Molecular para realizar Control de Calidad Microbiológico en Cervecería que toman menos tiempo.

En este trabajo se analiza la el costo/efectividad de los nuevos métodos de Control de Calidad Microbiológico basado en Proteómica, métodos de Biología Molecular comparados con la microbiología basados en métodos de cultivo para seleccionar el más adecuado para ser empleado por cervecería artesanal. Asimismo, se analiza el impacto de incluir el Control de Calidad Microbiológico en la producción de cerveza artesanal considerando los costos unitarios y el beneficio de evitar que se pierda cerveza por la contaminación microbiana,

siendo el análisis de Control de Calidad de PCR el de menor costo beneficio y el que genera menor incremento de costos por litro de cerveza producida

PCR > MALDI-TOF> MICROBIOLOGÍA BASADA EN MEDIOS DE CULTIVO. SECUENCIAMIENTO >

La inversión en PCR para el Control de Calidad Microbiológico, considerando la compra del equipo, es de S/. 0.97/litro. Este resultado aumentaría el precio de venta de 15.25 Soles/litro (sin IGV) a S/. 16.12 por litro. Este método muestra ser eficaz y económico para realizar el Control de Calidad Microbiológico en una cervecería artesanal.

Palabras clave:

Microbiología, Cerveza artesanal, PCR, Espectrofotometría de masa, Medios de cultivo

2. ABSTRACT

The craft brewery is a market that has grown 20% annually since 2019. To meet market demand, breweries have developed new styles of beer, with less bitterness, less CO₂, alcohol (even non-alcoholic beer). These factors, the bitterness, produced by the humulones (alpha lupulic acids) that have a perforin effect on bacteria, the alcohol (bacteriostatic), the low concentration of CO₂, reduce the natural protection of the beer against the proliferation of microorganisms that deteriorate the beer. It is defined that beer deteriorates by acquiring flavors foreign to the original design, mainly the production of lactic acid by bacteria, or over-attenuation by yeasts foreign to the main culture. This effect has been reported in the literature for the last five years.

Contamination of a batch substantially affects the brewery's revenue. To reduce the likelihood of microorganism contamination of beer, Microbial Quality Control is necessary. Traditional microbiological methods that use culture media and microbiological tests require 5-14 days to generate a result, affecting the productivity of a market whose lots are small and have very high value. There are new methods based on methodologies such as Proteomics and Molecular Biology to carry out Microbiological Quality Control in Breweries that take less time.

This work analyzes the cost/effectiveness of new Microbiological Quality Control methods based on Proteomics, Molecular Biology methods compared to microbiology based on culture methods to select the most suitable one to be used by craft breweries. Likewise, the impact of including Microbiological Quality Control in the production of craft beer is analyzed, considering the unit costs and the benefit of avoiding beer loss due to microbial contamination, with the PCR Quality Control analysis being the one with the

lowest cost, benefit and the one that generates the least increase in costs per liter of beer produced

PCR > MALDI-TOF > MICROBIOLOGY BASED ON CULTURE MEDIA.
SEQUENCING >

The investment in PCR for Microbiological Quality Control, considering the purchase of the equipment, is S/. 0.97/liter. This result would increase the sale price from 15.25 Soles/liter (without VAT) to S/. 16.12 per liter. This method proves to be effective and economical to carry out Microbiological Quality Control in a craft brewery.

Keywords:

Microbiology, Craft beer, PCR, Mass spectrophotometry, Culture media

3. INTRODUCCIÓN

Experiencia profesional que condujo a la propuesta del proyecto.

En La Cervecería, el Analista Microbiólogo de Control de Calidad analiza rutinariamente diferentes puntos de control del proceso de fabricación cervecero siguiendo el Plan de Control de Calidad Microbiológico. Este plan de calidad microbiológico, es normado bajo ISO 9001, varios de los puntos de control Microbiológico del proceso de producción eran considerados Puntos Críticos de Control de HACCP. Sin embargo, por el tipo de información, el Plan Microbiológico es clasificado como un documento controlado. Además del muestreo rutinario, el Analista Microbiólogo también participaba en los proyectos para el desarrollo de Procesos de Mejoramiento de la Calidad Total (PMCT), como en el caso del proyecto en la Planta Trujillo, que tuvo como objetivo prevenir la contaminación de la sala de levadura.

Los análisis de control de calidad microbiológicos se basaban en medios de cultivo y pruebas bioquímicas para identificar diversos microorganismos. Se analizaba si había presencia de flora indicadora de higiene y flora que deterioraban la cerveza como por ejemplo bacterias Gram positivas de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*. También se analizaba la presencia de levaduras “salvajes” que eran diferentes a las levaduras de cultivo propio de la cervecería. Una oportunidad de mejora que se identificó en el control rutinario y en un proyecto de mejora de la calidad fueron los tiempos para obtener los resultados mediante los medios de cultivo, los que demoran de 5-14 días (4). La experiencia de proyectos de mejora de la calidad y el manejo de las tecnologías de detección de microorganismos que deterioran la cerveza tradicional, impulsa la búsqueda

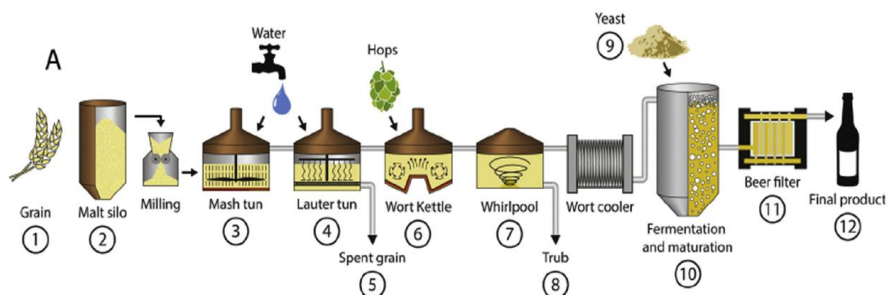
de nuevas tecnologías más y rápidas y eficaces para que sean aplicables a las cervecerías, pero en especial, cervecerías artesanales.

4. ANTECEDENTES

El proceso de producción de cerveza

El primer paso es la molienda de la malta en la que al moler el grano que proviene del silo de almacenamiento y se rompe la cáscara para exponer el almidón de la cebada germinada. El segundo paso es la maceración donde se mezcla agua caliente con la malta molida para que el almidón sufra una sacarización (azúcares fermentables) a través de la activación de las enzimas en la malta; se produce el “mash”. El tercer paso es el lautering o filtrado del puré o “mash”. El cuarto paso es hervir el filtrado o mosto en el que se detiene la actividad enzimática, se agrega el lúpulo, se evaporan volátiles como s-metil-metionina (SMM), que es un precursor de Sulfuro de Dimetil (DMS), y se esteriliza el mosto. El quinto paso es la aclaración del mosto para luego ser enfriado en el sexto paso. En el séptimo paso, se mezcla el mosto enfriado con la levadura para iniciar la fermentación que dura de 5-7 días en donde se produce etanol y dióxido de carbono. La cerveza madura en la que proteínas y polifenoles precipitan (0-4 °C). La cerveza puede ser filtrada para finalmente ser envasada y dependiendo del proceso, pasteurizada.

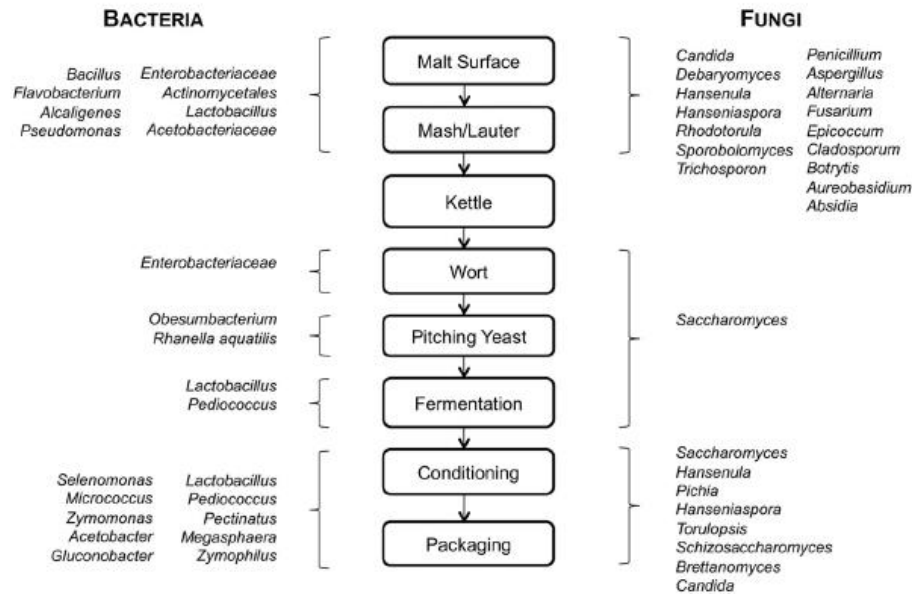
Diagrama de producción de cerveza por Anderson et al (6).



Microorganismos Contaminantes presentes en las diferentes etapas del proceso de fabricación de cerveza

La producción de cerveza ya sea artesanal o industrial es microbiológicamente estable debido a que la cerveza posee factores fisicoquímicos que caracterizan a la cerveza como un medio que dificulta el desarrollo de bacterias ya que presenta etanol (0.5–10% w/w), iso- α ácidos amargos (17–55 ppm) que derivados del lúpulo (*Humulus lupulus*), que han sido isomerizado de humulonas por el proceso térmico del hervido del mosto y que estabilizan la espuma (2), actúan como ionóforos impidiendo el funcionamiento de la bacteria (8), el pH bajo (3.8–4.7) y la concentración de dióxido de carbono (alrededor de 0.5% w/v) (7). Sin embargo, el proceso de producción de cerveza puede ser contaminado por algunos microorganismos contaminantes que se pueden cambiar sus propiedades fisicoquímicas, organolépticas, turbidez (7,8). Estos microorganismos se pueden encontrar en diversos insumos de la producción de cerveza o en el ambiente de planta de producción de cerveza los cuales pueden ser incorporados en diferentes etapas del proceso desde por deficiencias en su detección y/o prácticas en las operaciones, como la mala sanitización.

La microbiota de microorganismos contaminantes de cerveza que se detectan en los diferentes procesos de la fabricación de cerveza industrial y artesanal se puede resumir en el siguiente cuadro (1):



La frecuencia de los incidentes de contaminaciones microbiológicas en las cervecerías fue reportada por Suzuki et al en el 2020 (9) (10) mostrando que las contaminaciones en cervecerías europeas, eran frecuentes y los microorganismos detectados con mayor frecuencia eran: *Lactobacillus brevis* y *Pediococcus damnosus*.

Table 1. Percentages of beer spoilage microorganisms in incident reports in Europe during 1980–2002 periods.^a

| Genus/species | 1980–1990 | 1992 ^b | 1993 ^b | 1997 | 1998 | 1999 | 2000 | 2001 | 2002 |
|--------------------------------------|-----------|-------------------|-------------------|------|------|------|------|------|------|
| <i>Lactobacillus brevis</i> | 35 | 39 | 49 | 38 | 43 | 41 | 51 | 42 | 51 |
| <i>Lactobacillus lindneri</i> | 25 | 12 | 15 | 5 | 4 | 10 | 6 | 13 | 11 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | 1 | 3 | 2 | 1 | 4 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| <i>Lactobacillus casei/paracasei</i> | 2 | | | 6 | 9 | 5 | 8 | 4 | 4 |
| <i>Lactobacillus coryniformis</i> | 3 | | | 4 | 11 | 4 | 1 | 3 | 6 |
| <i>Pediococcus damnosus</i> | 17 | 4 | 3 | 31 | 14 | 12 | 14 | 21 | 12 |
| <i>Pectinatus</i> spp. | 4 | 28 | 21 | 6 | 3 | 6 | 5 | 10 | 7 |
| <i>Megasphaera</i> spp. | 2 | 7 | 3 | 2 | 2 | 4 | 4 | 4 | 2 |
| Saccharomyces wild yeasts | NA | 5 | 5 | 7 | 6 | 11 | 5 | 2 | 3 |
| Non-Saccharomyces wild yeasts | NA | 0 | 0 | 0 | 3 | 4 | 5 | 0 | 2 |
| Others | 11 | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |

^aThis table is adapted from the studies conducted by Back during 1980-2002 periods.^[8-10] NA: not available.

^bIn 1992 and 1993 studies, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. paracasei* and *L. coryniformis* were placed together into one group.

Table 2. Percentages of beer spoilage microorganisms in incident reports in Europe during 2010–2016 periods.^a

| Genus/species ^b | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 |
|--|------|------|------|------|------|------|------|
| <i>L. brevis</i> | 49.2 | 35.4 | 40.0 | 44.7 | 36.8 | 31.1 | 25.6 |
| <i>L. lindneri</i> | 10.2 | 10.8 | 4.3 | 0.0 | 3.5 | 4.9 | 6.8 |
| <i>L. backii</i> | 5.1 | 13.8 | 8.6 | 10.6 | 8.8 | 11.5 | 9.4 |
| <i>L. collinoides/paracollinoides</i> | 0.0 | 1.5 | 7.1 | 2.1 | 5.3 | 1.6 | 6.0 |
| <i>L. buchneri/parabuchneri</i> | 3.4 | 7.7 | 1.4 | 10.6 | 5.3 | 1.6 | 6.8 |
| <i>L. rossiae</i> | 1.7 | 0.0 | 0.0 | 2.1 | 1.8 | 3.3 | 6.8 |
| <i>L. perolens/harbinensis</i> | 3.4 | 3.1 | 1.4 | 4.3 | 7.0 | 6.6 | 9.4 |
| <i>L. casei/paracasei</i> | 8.5 | 10.8 | 14.3 | 8.5 | 7.0 | 13.1 | 8.5 |
| <i>L. (para)plantarum/coryniformis</i> | 6.8 | 4.6 | 1.4 | 8.5 | 8.8 | 8.2 | 8.5 |
| <i>P. damnosus</i> | 1.7 | 4.6 | 14.3 | 6.4 | 8.8 | 8.2 | 6.8 |
| <i>P. inopinatus</i> | 0.0 | 0.0 | 1.4 | 2.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| <i>P. clausenii</i> | 0.0 | 1.5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Other <i>Pediococcus</i> spp. | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.6 | 0.9 |
| <i>Pectinatus</i> spp. | 3.4 | 4.6 | 4.3 | 0.0 | 5.3 | 8.2 | 1.7 |
| <i>M. cerevisiae</i> | 6.8 | 1.5 | 1.4 | 0.0 | 1.8 | 0.0 | 2.6 |

^aThis table is adapted from the studies conducted by Hutzler et al.^[11–13] with some modifications.

^bThe identification of the genus/species was performed with PCR analysis. *L.*: *Lactobacillus*; *P.*: *Pediococcus*; *M.*: *Megasphaera*.

Actualmente, el 70% de las infecciones en las que se la cerveza es dañada, involucran a bacterias ácido lácticas (LACB) de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus* ya que generan turbidez, olor a mantequilla por la generación de ácido diacético, sabor agrio por la formación de ácido láctico y polisacáridos que afectan la textura de la cerveza (12) (13). Las bacterias gran negativas como bacterias ácido acéticas también se han reportado como deteriorantes de cerveza.

La contaminación afecta tanto cerveceras industriales como artesanales, pero en cervecería artesanal es más frecuente debido a que no son pasteurizadas o filtradas (14).

Otra fuente de contaminación microbiana de la cerveza son las levaduras extrañas o salvajes. Tradicionalmente se emplean *Saccharomyces cerevisiae* o levaduras del género *Brettanomyces* como inóculo para la fermentación del mosto, pero la producción de cerveza puede ser contaminada con levaduras extrañas al inóculo como otras levaduras del género que cambian el sabor y aroma de la cerveza entre otros cambios, las cuales deben de ser detectadas (2) (6). Estos factores alteran la calidad de la cerveza lo cual implica eliminar el lote de cerveza contaminado y sanitizar la planta, causando pérdidas económicas. Si la cerveza contaminada llega al consumidor, la confianza del consumidor disminuiría, causando la no elección del producto, elegir un sustituto y por lo tanto,

generar mayores pérdidas económica. En el caso de las cervecerías artesanales, el riesgo de contaminación por levaduras extrañas es alto, como se reportó en un estudio de 17 micro cervecerías de la Patagonia Argentina a desde 2016-2019, en donde se encontraron 32 variedades de *Saccharomyces cerevisiae*, presentándose en la mayoría de muestras la variedad *distaticus*, la cual se encuentra como contaminante primario en el proceso de fermentación y como contaminante secundario en el embotellado (10).

Además de las bacterias y las levaduras extrañas, ciertos géneros de hongos crecen en la cebada y otros granos de los que se produce cerveza, producen diversas micotoxinas que producen efectos dañinos en la salud humana. Estas micotoxinas sobreviven el proceso cervecero y pueden encontrarse en la cerveza terminada (6) (7).

Las micro cervecerías o cervecerías artesanales son más propensas a infecciones microbiológicas que deterioran la cerveza debido varios factores: no se filtra la cerveza, no se pasteuriza la cerveza, se incluyen otras fuentes de azúcares como frutas, lo que genera diferentes microbiotas contaminantes en la cervecería artesanal comparadas con la industrial (12).

El costo económico a nivel mundial debido a contaminación por microorganismos que deterioran cerveza no se conoce con exactitud debido a que no todos los casos son reportados por las empresas privadas, pero se estima que son altos (1) (4). Usando los costos de producción de cerveza reportados en el Perú, se estima que, si el precio de cerveza artesanal es de PEN 20/ litro y si el lote promedio de 1000 litros, la pérdida del lote por contaminación sería de PEN 20,000 (15) (16) (17). Las cervecerías artesanales producen un promedio de 40,000 l al año, por lo que la pérdida de un lote de 1000l representa el 2.5% de la producción anual. La pérdida de lotes de cerveza afecta tanto las

cervecerías industriales como las artesanales ya que disminuye la productividad y afectaría la disponibilidad del producto al mercado.

La frecuencia de las infecciones en las cervecerías industriales y las micro cervecerías en el mundo han ido en aumento en los últimos años al igual que la complejidad de los microbiotas causando grandes pérdidas económicas debido a los lotes de cerveza contaminados. Por este motivo, se han estado desarrollando métodos más rápidos y eficaces basadas en biología molecular y proteómica de detección de microorganismos contaminantes de cerveza que demoran horas en generar un resultado comparadas con la microbiología basada en medios de cultivo que tarda días en generar el resultado (18) (5). Si se lograra evaluar otros métodos de análisis microbiológico más rápidos basados en biología molecular, permitiría tomar decisiones en horas en vez de días, como por ejemplo, determinar rápidamente si la sanitización de un tanque fue realizada correctamente, para que de lo contrario se repita la sanitización.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La detección de microorganismos contaminantes de cerveza se basa tradicionalmente en medios de cultivo cuyos protocolos toman de 5-14 días para identificar microorganismos que deterioran cerveza en el proceso de producción de cerveza. Adicionalmente, se realizan pruebas bioquímicas para identificar los organismos a nivel de especie (17) (18). Por ejemplo, el medio de cultivo NBB producidos por Döhler, el cual permite identificar principalmente bacterias que deterioran la cerveza como *Lactobacillus* y *Pediococcus*, *Obseobacterium*, *E. coli*. Según el protocolo se requieren de 3 a 5 días de incubación anaeróbica a 28°C para determinar si la prueba es positiva o negativa en cervezas clara y de 7-14 días en el caso de cervezas opacas (7)

(15) (16). En el caso de la identificación de levaduras salvajes, el tiempo de incubación para la identificación de levaduras es de 5-7 días (1) (20). Los protocolos de análisis demoran días para determinar la presencia de microorganismos contaminantes de cerveza, lo que afecta el tiempo de implementación de acciones correctivas como lavado de tanques o eliminación de la cerveza contaminada.

El tiempo del proceso de fabricación de cerveza industrial y artesanal dura en promedio 7- 30 días, dependiendo del tipo de cerveza; Ale (7-14 días), Bock (4 semanas), Stout (4 semanas), Lager (4 -8 semanas). El tiempo de los procesos de producción de cerveza son los siguientes: la fermentación dura de 5-7 días, la maduración dura 3 semanas en promedio, además de las etapas de filtrado y envasado que demoran horas, dependiendo del volumen. Al tomar en cuenta el tiempo de análisis microbiológico basado en medios de cultivo, el resultado usualmente se conoce cuando la cerveza se encuentra en la siguiente etapa del proceso de producción. Si ocurriese la contaminación microbiológica de un tanque de cerveza o levadura, esta contaminación podría infectar toda la cervecería debido a que la cerveza se trasiega de tanque a tanque tanto en cervecería industrial como artesanal.

La probabilidad de que ocurra una contaminación de microorganismos que deterioran la cerveza, (como por bacterias ácido lácticas, bacterias aceto ácidas o levaduras extrañas). Esta probabilidad es mayor en una cervecería artesanal debido a que usualmente no se filtra o pasteuriza, además de la reducción de los alfa-iso ácidos del lúpulo, la disminución del etanol. El impacto de la contaminación microbiológica es un factor importante debido a que en el Perú se ha reportado un aumento de la demanda de cerveza industrial y artesanal en los últimos cinco años, aumentando la importancia de esta

industria (3) (4) (5). Sin embargo, en el Perú, las cervecerías artesanales normalmente no realizan Control de Calidad Microbiológico de sus procesos. Esto es debido a los costos de producción que en las cervecerías industriales son de S/. 3 por 1 L comparados con los costos de las cervecerías artesanales que en promedio son S/. 10 por 1 L. Sin embargo, la pérdida de un lote de cerveza tiene un mayor impacto en la economía de una cervecería artesanal que en promedio sería 2.5% de su producción anual.

Por estos motivos se propone analizar y seleccionar nuevos métodos que se caractericen por ser más rápidos, sensitivos, exactos, precisos, y económicos, comparados con la microbiología basados en medios de cultivo (o microbiología tradicional). Se enfocará en la industria cervecera artesanales en especial pueda realizar controles de calidad microbiológico en sus plantas y evite tener pérdidas económicas ya que las cervecerías industriales tienen Laboratorios de Control de Calidad y procedimientos implementados.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General:

Analizar los métodos de detección e identificación de microorganismos que deterioran la cerveza producida por micro cervecerías (cervecerías artesanales) en el Perú, para seleccionar un método a la medida para esta industria.

6.2. Objetivos específicos:

Analizar los métodos de detección e identificación, de microorganismos que deterioran la cerveza considerando su rapidez análisis y exactitud para seleccionar uno a la medida de la industria cervecera artesanal.

Realizar una evaluación económica de los métodos de detección de microorganismos que deterioran la cerveza para seleccionar el método a la medida de la industria cervecera artesanal.

7. JUSTIFICACIÓN

Microbiológica:

- ✓ **Existen diversos microorganismos que se desarrollan en la cerveza, pero algunos deterioran la cerveza.**

Las bacterias ácido lácticas se agrupan en 18 géneros con más de 200 especies. Sólo algunas de estas especies deterioran la cerveza (16). De estos 18 géneros, alrededor del 70% de las bacterias que generan incidentes de deterioro de cerveza pertenecen a los géneros de *Lactobacillus* y *Pediococcus* (4,16). Dentro de estos géneros, sólo algunas especies pueden deteriorar la cerveza debido a que poseen genes de resistencia a los alfa-iso ácidos del lúpulo (1,6). Las especies más comunes que deterioran cerveza son: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri*, and *Pediococcus damnosus* pero las especies de *L paracollinoides*, *L. backii*, *Pediococcus clausenii* también pueden deteriorar cerveza Lager. Es el caso de cervezas artesanales, un estudio identificó otras especies de bacterias adicionales a las reportadas comúnmente: *L. brevis*, *L. Plantarum*, *L. acetotolerans*, *P. damnosus*, *Staphylococcus xylosus* y *Bretanomyces cerus* (18).

- ✓ **Los hongos filamentosos como *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* pueden generar micotoxinas bajo ciertas condiciones**

Las micotoxinas que tienen efectos en la salud humana (como intoxicaciones como hepatotoxicidad, inmunotoxicidad entre otros efecto, por lo que las concentraciones

máximas presentes en los granos y cerveza son reguladas internacionalmente (1) y generación extrema de espuma en la cerveza.

El *Fusarium spp.* produce micotoxinas que no son destruidas por el proceso cervecero, e incluso por la pasteurización. Las toxinas que genera el *Fusarium spp* se denominan deoxynivalenol (DON; también conocida como “vomitoxin”). El *Aspergillus* y el *Pencillium* producen nivalenol, T-2 toxina, HT-2 toxina, y diacetoxyscirpenol. (1,18). Estos hongos y sus respectivas micotoxinas deben de ser detectadas y cuantificadas

✓ **La producción de cerveza puede ser contaminada por “levaduras salvajes”**

Las “levaduras salvajes”, son levaduras que no corresponden al estilo de cerveza producida, se introducen durante la inoculación, la fermentación, maduración y el envasado incluyen los géneros de *Saccharomyces* y *Brettanomyces*. En el caso de la *Brettanomyces bruxellencis*, genera ácido acético y en el caso de *Saccharomyces pecitnatus*, ésta fermenta dextrinas sobreatenuando la cerveza, lo que reduce el extracto, además de generar sabores extraños (1, 18).

✓ **Existe un microbiota que deteriora la cerveza que no ha sido estudiada**

Se han detectado nuevos microorganismos que pueden deteriorar cerveza ocasionalmente incluyen *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterobacter*, and *Zymomonas* genera, los que cambian el pH del producto final, crean sedimentos, sabores extraños, opacidad y cambios en la textura de la cerveza. (6,18)

✓ **Aumento de la presencia de microorganismos que deterioran cerveza**

Se ha reportado un incremento de bacterias que deterioran la cerveza en los últimos años. La revisión de Suzuki et al en el 2020 (4) describe que, en los últimos años, se han incrementado a 30 especies de microorganismos que deterioran cerveza de los

que siendo la mayoría bacterias ácido lácticas y un aumento de bacterias anaeróbicas estrictas como *Pediococcus* y *Megasphaera*. Este incremento se debe la producción de bebidas bajo en alcohol, lúpulo y la producción de cerveza sin alcohol, los que poseen más nutrientes disponibles para microorganismos (19). El estudio por La Torre et al. en el año 2022 en cervecerías artesanales en Argentina, determinó que el número de especies ha aumentado en 30 en categorías tradicionales, y un aumento de 10 especies de *Pectinatus* y *Megasphaera*, que son anaerobios estrictos. Estas especies fueron detectadas mediante PCR (20). En el caso de la cervecería artesanal, la cual típicamente no realiza filtrado y/o pasteurización, el problema de contaminación y deterioro de cerveza por *Lactobacillus*, *Pediococcus*, o *Leuconostoc* (bacterias ácido lácticas) puede generar aminos biogénicos, como histaminas, que pueden generar reacciones inmunológicas en las personas (21).

Se han detectado especies que deterioran cerveza que no pertenecen a los géneros de *Lactobacillus* y *Pediococcus*, como en el estudio de Yu et al en 2019, determina que *Staphylococcus xylosum* cepa BS7 crece en condiciones de cervecería artesanal, bajo amargor, alto pH, bajo alcohol (22).

El problema de detección es notable ya que se ha reportado un incremento de microorganismos contaminantes de cerveza a lo largo de los años. (5)

✓ **Instrumental: Desarrollo de tecnologías más eficaces y rápidas.**

La tecnología disponible para la detección de microorganismos contaminantes de cerveza actualmente se basa en proteómica, biología molecular (como PCR, inmunoprecipitación, Ribo blotting), o una combinación de medios de cultivo y métodos moleculares los que tienen diferentes grados de precisión, sensibilidad, costos y complejidad para los analistas (17). Sin embargo, la mayoría de estos

métodos se enfocan en su uso en la gran industria cervecera o se desarrollan en laboratorio. Asimismo, y no se evalúa directamente el uso de estas tecnología para el contexto de cervecería artesanal.

La siguiente tabla por Xu et al 2020 (23) muestra la diferencia de rapidez entre los 5 métodos basada en medios de cultivo, PCR y Espectrofotometría de masa.

| Spoilage LAB | Detection method | Detection time | References |
|--|--|----------------|------------|
| <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. acetotolerans</i> , <i>P. damnosus</i> | De Man Rogosa Sharpe (MRS) culture Medium with catalase added | 2-5 days | [53] |
| <i>Lb. acidophilus</i> | LAMP ^a | 5.5 h | [66] |
| <i>Lb. acetotolerans</i> | RCA ^b | 2.5h | [68] |
| <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lactococcus spp.</i> , <i>Leuconostoc spp.</i> | MALDI-TOF MS ^c | ND | [74-76] |

^aLAMP = loop-mediated isothermal amplification

^bRCA = rolling circle amplification

^cMALDI-TOF MS = matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

ND = not defined

Los hongos que producen micotoxinas en la cebada y la malta como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Clavices*, se pueden identificados mediante inmunoensayos, MALDI-TOF q-PCR (2). Para la detección de las micotoxinas producidas por hongos que contaminan la cebada, éstas son analizadas mediante HPLC /GC, pero actualmente se está probando la espectrofotometría de masa para su detección LC MS-MS o HPLC y MS-MS (3)

Las levaduras salvajes son identificadas mediante medios de cultivo y pruebas de bioquímica, PCR y espectrofotometría de masa. (2) (3) (5)

Económica

En 2022, se espera que el mercado de cerveza genere 600 mil millones de euros con un crecimiento anual de 6.8%. Sin embargo, las pérdidas por la contaminación en el proceso cervecero, a pesar de no ser públicas, se estiman que son altas. Las fallas de calidad por contaminación durante el proceso cervecero que son detectadas por el Control de Calidad,

generan pérdidas económicas del producto como mermas. Pero si la cerveza contaminada llega a los consumidores, no sólo habrá una pérdida financiera, sino que se generará el rechazo y la pérdida de confianza del consumidor. (Suiker & Wösten, 2022).

El mercado de cerveza artesanal en la muestra un crecimiento en los últimos años. En el año 2019 se produjeron 2 millones de litros, 2.5 millones en el 2021 y se espera que produzcan 3.4 millones de litros en el 2022, según la Unión de Cerveceros Artesanales del Perú. Esto se traduce en una participación de mercado por las 150 cervecerías (65% en Lima) de 0.2%. Esta baja producción afecta el precio final, siendo el precio de la cerveza artesanal de S/.10 comparado con S/.3.5 de una cerveza industrial. (7) (8) (9) Estos datos muestran que tanto la producción de cerveza industrial como la cerveza artesanal pueden sufrir pérdidas económicas por contaminación del proceso de producción debido a los menores márgenes de la producción de cerveza artesanal, les es difícil puede costear el control de calidad microbiológicos y en asumir el costo de la pérdida por la contaminación de un lote de cerveza.

Actualmente se emplea en el control de calidad microbiológico medios de cultivo y técnicas bioquímicas (prueba de catalasa, fermentación de azúcares, producción de gas, morfología y tinción de Gram) tradicionales para identificar las especies de microorganismos que deterioran cervezas tradicionales como *Lactobacillus* y *Pediococcus*, “Sin embargo, estos métodos consumen mucho tiempo con largos períodos de incubación. Los métodos moleculares, como la elaboración de perfiles comunitarios o la secuenciación de alto rendimiento, se utilizan mejor para identificar poblaciones enteras de cerveza.” (6). Estas contaminantes no distinguen si es una cervecería industrial o cervecera artesanales (24).

8. MARCO TEÓRICO

Definición de cerveza

La Norma Técnica Peruana NTP 213.014.2016, la cerveza se define como "...a la bebida resultante de un proceso de fermentación controlado, mediante levadura cervecera de un mosto de cebada malteada o de extracto de malta, sometido previamente a un proceso de cocción, adicionando lúpulo. Una parte de la cebada malteada o de extracto de malta podrá ser reemplazado por adjuntos cerveceros.”.

✓ Normativa Peruana de contaminantes en bebidas

Según DIGESA, para la determinar la inocuidad microbiológica de cerveza, se emplea la norma, “Criterios Microbiológicos Calidad Sanitaria y e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano “aprobados por el MINSA mediante la NTS 071 MINSA/DIGESA se establece que la cerveza es clasificada como bebida carbonatada.

Los valores los contaminantes y límites permitidos se muestran en la siguiente tabla.

| Agente microbiológico | Clase | N | C | Limite por 100 ml | Agente microbiológico | |
|-----------------------|-------|---|---|-------------------|-----------------------|-----------------|
| | | | | | Mínimo(m) | Máximo(M) |
| Aerobios mesófilos | 2 | 3 | 5 | 2 | 10 | 10 ² |
| Mohos | 2 | 3 | 5 | 2 | 1 | 10 |
| Levaduras | 2 | 3 | 5 | 2 | 1 | 10 |
| Coliformes | 2 | 3 | 5 | 0 | <3 | ----- |

Siendo 1,2,3: Microorganismos que generan alteración y 4,5,6 son indicadores de higiene.

n: Número de unidades de muestra seleccionadas al azar de un lote, que se analizan para satisfacer los requerimientos de un determinado plan de muestreo.

c: Número máximo permitido de unidades de muestra rechazables en un plan de muestreo de 2 clases o número máximo de unidades de muestra que puede contener un número de microorganismos comprendidos entre “m” y “M” en un plan de muestreo de 3 clases. Cuando se detecte un número de unidades de muestra mayor a “c”, se rechaza el lote.

✓ **Desarrollo de microorganismos patógenos en cerveza**

Microorganismos patógenos como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Virbrio cholerae*, usualmente no sobreviven en las condiciones tradicionales de producción de cerveza, siendo inhibido el desarrollo por el etanol (3-10%v/v) durante la fermentación, la presencia de lúpulo (iso-alfa ácidos 17-55 ppm) inhibe principalmente bacterias Gram positivo, pH (3.9-4.4) , CO₂ (0.5%w/w), baja concentración de O₂ (<0.1ppm) y baja concentración de nutrientes (8). Asimismo, procesos de filtración y pasteurización reducen aún más el desarrollo de los microorganismos patógenos. (25, 26). Estas condiciones varían a medida que se desarrollan cervezas artesanales con menores concentraciones de amargor, alcohol y otros adjuntos como frutas, que aumentan los nutrientes en la cerveza.

✓ **Bacterias que deterioran la cerveza**

A pesar de que la cerveza posee propiedades anti microbianas, esta se sufre el deterioro por microorganismo, afectando la calidad y el rechazo del consumidor que finalmente hace que el producto sea eliminado. Estos microorganismos generan descoloración, cambios en la textura, pérdida de la estabilidad coloidal, ritmos de atenuación anormales, defectos en el sabor, defectos en la fermentación, defectos en la apariencia, defectos en el aroma, turbidez, aumento de la viscosidad (15). Bacterias del género *Lactobacilus*

producen ácido láctico (sabor agrio) generan una textura viscosa y produce turbidez, además de diacetilos (sabor a mantequilla), cambiando el sabor y aroma de la cerveza original. Otros microorganismos pueden afectar al metabolismo de la levadura, afectando la fermentación.

En la cebada se puede encontrar hongos *Fusarium spp.* que producen micotoxinas termoestables, que sobreviven a la cocción de la malta y el resto del proceso cervecero, las cuales pueden ser encontradas en el producto final. En el proceso de malteado de la cebada (maceración, germinación y horneado) pueden permitir el crecimiento de microbiota e incluso *Fusarium spp.* *Fusarium*, *Nigrospora* y *Trichoderma* y se ha demostrado que actúan como factores de efusión (excesiva espuma) en la cerveza. (Sarlin et al., 2005) (4) . Sin embargo, estas contaminaciones son controladas al mantenerse la humedad la cebada y la malta en 3% y evitar superar el límite de 0.04 mg/L de aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and deoxynivalenol (4). En la producción de mosto, la presencia de *Lactobacillus* puede ser beneficiosa para la acidificación de éste. Sin embargo, al enfriarse el mosto, y aumentar el pH a 5.5. microorganismos oportunistas como bacterias Gram (-) como *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Obesumbacterium*, and *Escherichia* se pueden desarrollar las que producen compuestos como DMS, ácidos orgánicos, and 2,3-butanediol, que generan sabores y aromas no propios de la cerveza (3). Sin embargo, el proceso de producción de cerveza (fermentación y maduración), la cerveza puede contaminarse con bacterias a pesar de estas condiciones. Se identifica la contaminación por bacterias Gram positivos y Gram negativos. Las especies de Gram positivos identificadas son *Lactobacillus spp.*, *Pediococcus spp.* En el caso de cerveza caseras deterioradas se han encontrado *Bacillus cereus*, *B. licheniformis*, *Staphylococcus*

epidermidis, y *Paenibacillus humicus* (7) . En el caso de las bacterias Gram negativos se identifican en cerveza *Acetobacter* y *Gluconobacter. Pectinatus*, *Megasphaera*, *Zymomonas* (3).

La producción de cerveza también puede contaminarse durante la fermentación y maduración por “levaduras salvajes”, como variedades diferentes a las empleadas por la cervecería como de *Saccharomyces cerevisiae* o *Brettanomyces* (8).

De microorganismos presentes en la producción cervecera, estos microorganismos se clasifican de acuerdo a su efecto en la calidad de cerveza: deterioro obligado de cerveza, deterioro potencial, deterioro indirecto, flora indicadora de sanitización, flora latente, flora de producción.

Los microorganismos deteriorantes son clasificados por Turevey et al (7) (basados en Back (36, 37)) en :

Deteriorantes obligados: la infección siempre conducirá al deterioro de la cerveza.

Lactobacillus brevis, *Lactobacillus lindneri*, *Pediococcus damnosus*, *Megasphaera cerevisiae*, *Pectinatus frisingensis* (7)

Deterioro potencial: Las infecciones solo pueden afianzarse bajo condiciones específicas (por ejemplo, bajo contenido de alcohol, ausencia de lúpulo, pH elevado):

Lactobacillus plantarum, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc ssp*

Deterioro indirecto: organismos que no pueden crecer en la cerveza, pero pueden estar presentes en las materias primas y causar sabores desagradables.

Candida kefir, *Obesumbacterium proteus*

Flora indicadora: No causa deterioro, pero indica limpieza insuficiente, errores de producción, a menudo coinciden con cepas de deterioro.

Acetobacter pasteurianus, Klebsiella pneumoniae (7)

Flora indicadora: Organismos inofensivos presentes en el entorno de la cervecería

Micrococcus ssp, Bacillus ssp, Clostridia ssp (7)

Flora en la producción: Organismos introducidos intencionalmente para procesos de fermentación o acidificación de la cerveza.

Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces pastorianus, Lactobaccillus amylolyticus, Brettanomyces ssp (7)

✓ **Hongos contaminantes**

El proceso cervecero no sólo se contamina y/o deteriora por bacterias ácido lácticas (BAL) o Ácido Acéticas (BAA) (3) (27) (28) (29). Hongos filiformes y levaduras salvajes son contaminantes del proceso de producción de cerveza. Los hongos filiformes como los del género *Fusarium* contaminan la cebada y generan micotoxinas durante el malteo. Levaduras que no pertenecen al cultivo primario del estilo de cerveza producida, las que alteran las propiedades fisicoquímicas y organolépticas de la cerveza, se clasifican como “levaduras salvajes”. (5) (6) (7)

✓ **Hongos que producen Micotoxinas**

Las especies contaminantes de hongos presentes en la producción de cerveza pueden producir micotoxinas tienen efectos hepatotóxicos, carcinogénico, inmunosupresivo y antinutricional (Williams et al 2004). La presencia de estas micotoxinas debe reducirse del proceso (23). Las legislaciones requieren un máximo de 0.001 mg/l (33). Aunque algunas micotoxinas aparecen durante el remojo, el crecimiento del moho *Fusarium* y la

producción de micotoxinas aún son posibles en las primeras etapas de la elaboración de la cerveza, y estas especies pueden transferirse de la malta a la cerveza terminada (12). Hongos filiformes que producen micotoxinas incluyen a los géneros *Fusarium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* y *Penicillium*. Las micotoxinas producidas por *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* pueden sobrevivir el proceso cervecero (como el hervido de la malta en la producción del mosto, el alto porcentaje de alcohol, el bajo pH y la pasteurización) por lo que los controles de calidad como porcentaje de humedad en el almacenaje en los silos y cultivo de muestras de cebada para detectar los hongos es un proceso estricto.(Suiker & Wösten, 2022).

Estas toxinas son detectadas mediante HPLC-UV 218 nm (1) siendo los límites aceptados por el Codex Alimentarius son mostrados en la siguiente tabla (10):

| Mycotoxins | Commodity/Product | Maximum Level (µg/kg) | Adoption Year |
|--|---|------------------------------------|---------------|
| Total aflatoxins (B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂) | Peanuts for further processing | 15 | 1999 |
| | Almonds for further processing | 15 | 2008 |
| | Almonds "ready to eat" | 10 | |
| | Hazelnuts for further processing | 15 | |
| | Hazelnuts "ready to eat" | 10 | |
| | Pistachios for further processing | 15 | |
| | Pistachios "ready to eat" | 10 | |
| | | Brazil nuts for further processing | 15 |
| Brazil nuts "ready to eat" | | 10 | |
| | Dried figs | 10 | 2012 |
| Aflatoxin M ₁ | Milk | 0.5 | 2001 |
| Patulin | Apple juice | 50 | 2003 |
| Ochratoxin A | Raw wheat | 5 | 2008 |
| | Barley | 5 | |
| | Rye | 5 | |
| Deoxynivalenol | Cereal-based foods for infants and young children (dry matter basis) | 200 | 2015 |
| | Flour, meal, semolina and flakes derived from wheat, maize or barley | 1000 | |
| | Cereal grains (wheat, maize and barley) destined for further processing | 2000 | |
| Fumonisin B ₁ , B ₂ | Raw maize | 4000 | 2014 |
| | Maize flour, maize meal | 2000 | |

En el Perú la determinación de ocratoxina A en cebada se realiza mediante el método HPLC con purificación en columna de inmunoafinidad (NTP 205.049:2016)

Levaduras salvajes

Las levaduras que se emplean tradicionalmente en la producción de cerveza pertenecen a los géneros *Saccharomyce* y *Brettanomyces*. Sin embargo, la presencia de estos hongos en la producción es contaminantes de las producciones de cerveza debido a que poseen metabolismos diferentes, afectando la calidad de la cerveza. Especies de estas levaduras deterioran la cerveza al generar “off flavors” o sabores y aromas que no corresponden al estilo de la cerveza producida o efectos físico-químicos de la cerveza como reducción de la concentración. Las principales especies que deterioran la cerveza son: *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces anomalus*, *Brettanomyces custersianus*, *Brettanomyces naardenensis*, *Brettanomyces nanus*, *Brettanomyces acidodurans* y *Saccharomyce cereviciae var diastaticus*. Los efectos de las levaduras varían de acuerdo al metabolismo de cada una. El *Brettanomyces bruxellensis* produce compuestos fenólicos que son volátiles, que generan aromas a humo y sudor. La *Saccharomyces diastaticus* realiza una fermentación secundaria en la que al secretar la enzima 1,4- a-D-glucan glucohydrolases (producto por 3 genes homólogos STA1, STA2, STA3) que se rompe el enlace α 1-4 glucosídico final de los almidones y dextrinas residuales, liberando glucosa que es metabolizada por la levadura. Esto que genera una super atenuación (aumento de alcohol, sobre carbonatación y reducción del cuerpo o concentración) de la cerveza. Asimismo, genera sedimentación y empaña la cerveza, además de generar compuestos fenólicos volátiles. (López et al., 2021), (Suiker & Wösten, 2022), (Štulíková et al., 2021). A pesar de que el metabolismo de las “levaduras salvajes” tienen efectos fisicoquímicos y organolépticos en la cerveza producida, se debe tener en cuenta que el término de “levadura salvaje” es relativo ya que algunos de los efectos de estas levaduras son

característicos de ciertos estilos de cerveza. Un ejemplo es el caso de ciertas variedades de *Saccharomyces cerevisiae diastaticus* producen aromas semejantes al clavo de olor debido a que producen enzimas descarboxilan el ácido fenilacético produciendo 4-vinilguaiacol en la malta. La descarboxilasa es expresada por el gen POF-1 en estas variedades de levaduras. Este fenol es clasificado como “off flavor” en cervezas lager, pero es característico en las cervezas de trigo (Štulíková et al., 2021)

✓ Fuentes de contaminantes del proceso cervecero

Se clasifican las fuentes de contaminación en primarias y secundarias. Las fuentes primarias de contaminación incluyen la materia prima (malta, el agua, levadura) y la maquinaria (bombas, mangueras, tanques, etc.). Las fuentes secundarias de contaminación se encuentran en el envasado (embotellado, enlatado, kegging). Se estima que el 50% de contaminación en una cervecería ocurre debido a la contaminación secundaria, pero la contaminación primaria compromete a todo el lote de producción por lo que puede generar grandes pérdidas. Este es el motivo por el cual el control de calidad microbiológico temprano es importante. (14) (Ciont et al., 2022)

8.1. Estado del arte de métodos de detección de microorganismos cerveceros.

Se han desarrollado métodos de alto desempeño (high throughput) pueden detectar con mayor sensibilidad, velocidad y precisión basado en espectrofotometría de masa (proteómicos), métodos moleculares (que incluyen PCR, Microarrays y inmunodetecciones) y una combinación de métodos, que incluyen medios de cultivo microbiológicos y pruebas bioquímicas para la detección de bacterias que deterioran cerveza, hongos que producen micotoxinas y levaduras extrañas (o salvajes) al inóculo inicial de la fermentación.

Métodos de detección de microorganismos que deterioran la cerveza durante su producción

Estos métodos son empleados rutinariamente por las cerveceras industriales (18).

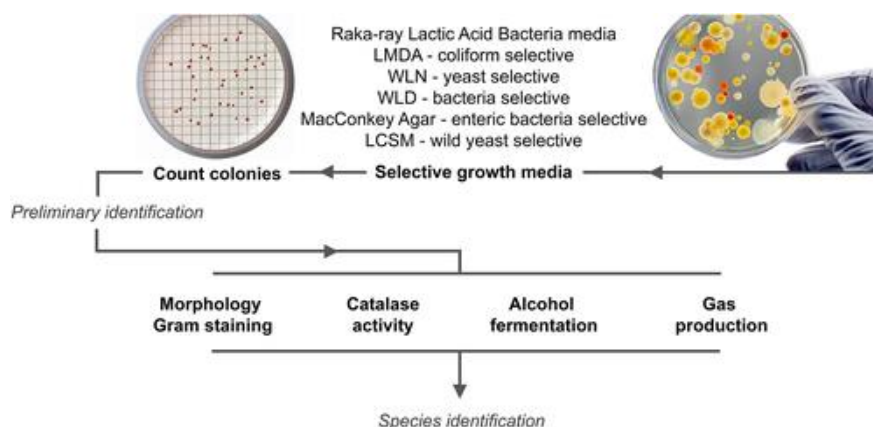
8.1.1. Métodos tradicionales basado en medios de cultivo y bioquímica empleada por cervecera industrial

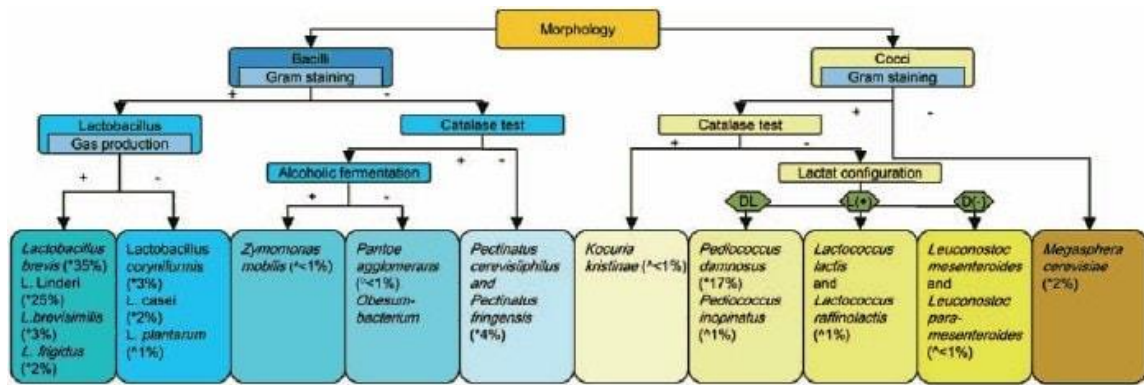
Los métodos de microbiología tradicional cervecera basada en diversos medios de cultivo están documentadas y son empleados universalmente en las cerveceras (18,19,20). Se emplean diversos medios ya que todos no detectan todas las bacterias que deterioran cerveza. Algunos de los medios selectivos empleados son: el MRS y el VLB-S7, que detectan cepas de *Lactobacillus* (recomendados por la American Society of Brewing Chemists (ASBC), la European Brewery Convention (EBC) y la Brewery Convention of Japan (BCOJ). También se emplea el NBB de Döhler, (recomendados por la European Brewery Convention (EBC) y la Brewery Convention of Japan (BCOJ)) (34) , para la detección de *Lactobacillus* (G+), *Pediococcus*(G+), *Megasphaera* (G+), *Pectinatus* (G-) y bacterias gram negativas a nivel de género y que se incubaba a 28°C de 5-7 días para una prueba negativa confirmatoria. Análisis posteriores incluyen la morfología de las colonias y de células, coloración Gram, fermentación de alcohol, producción de gas y prueba de catalasa para determinar la especie (37).

La identificación y enumeración de la presencia de microorganismos que deterioran la cerveza se basa en la siembra de una muestra sobre un medio sólido que contiene nutrientes específicos para el desarrollo de los microorganismos que luego se cultiva bajo condiciones específicas para el microorganismo (temperatura, humedad, aeróbico/anaeróbico). Se realizan diluciones de acuerdo a la muestra para cuantificar el

grado de contaminación en unidades formadoras de colonia (ufc) que crecen en el medio por volumen sembrado. Para realizar la cuantificación/enumeración de los microorganismos en una muestra líquida, como por ejemplo cerveza filtrada, se realiza la filtración a través de una membrana de 0.22 μm y esta membrana es sembrada sobre el medio de cultivo y luego incubada. El método es sensible ya que detecta hasta una unidad formadora de colonia (ufc) por volumen filtrado, que se normalmente son 100 ml, por lo que la unidad de contaminantes es de : ufc/100ml. Si la muestra no es líquida y/o posee una gran concentración de microorganismos, como en la levadura recuperada, cerveza en fermentación o maduración, la muestra se siembra en caldo de cultivo como en el NBB-B o NBB-C de Döller (Turvey et al., 2017).

En la siguiente imagen se muestran algunos de los métodos clásicos para la identificación microbiana.” Las muestras de cervecería se cultivan en medios de cultivo sólidos (nutritivos, selectivos, diferenciales, enriquecidos) y el grado de contaminación se evalúa mediante la enumeración de la formación de colonias. La identificación de especies se realiza mediante un panel de ensayos fenotípicos y bioquímicos discriminatorios.” Tomado de (Turvey et al., 2017).





Blüml S, Fischer S. 2004. *Handbuch der Fülltechnik: Grundlagen und Praxis für das Abfüllen flüssiger Produkte*. Auflage 2004. Behr's GmbH.

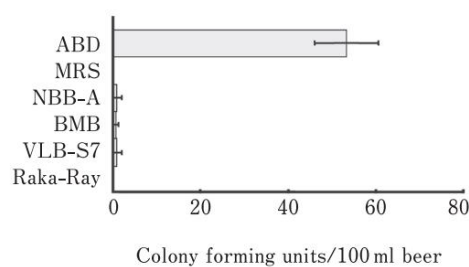
Este método posee varias ventajas. Los medios de cultivos han sido implementados por décadas y la técnica de filtración por membrana posee una sensibilidad que permite detectar trazas de microorganismos 1-100 ufc/100 ml, siendo usado normalmente en Control de Calidad Microbiológico en cervecería. Al compararse con métodos moleculares, el error de falsos negativos es mayor en los métodos moleculares. Esto es debido al volumen de muestra ya que, si se asume que en 100 ml de muestra hay 100 ufc de bacterias contaminantes, al filtrarse por la membrana y luego ser sembrada sobre el medio de cultivo, crecerán 100 ufc. En el caso de los métodos moleculares, si se 20 ul, sólo se podrán detectar 1 ufc. Permite identificar especies de bacterias, hogos y levaduras. Finalmente, en promedio, el costo promedio es de 5\$. (17, 18, 37) (Turvey et al., 2017).

Las desventajas de este método es el período de incubación (5-14 días) para realizar la identificación y la enumeración (morfología de las colonias y generación de cambios en el medio de cultivo como secreción de ácido láctico, visualizado por un indicador en el medio). Se suma el tiempo adicional para las pruebas bioquímicas para la identificación fisiológica del microorganismo (Tinción de Gram, presencia de catalasa, producción de

gas, fermentación de azúcares), mostrando un proceso complejo y especializado. Se requiere que el microorganismo sea cultivable y exprese fenotipos, por lo que se requiere entrenamiento por el personal técnico. (1)

Especies como el *Lactobacillus pastotianus*, *Lactobacillus lidneri*, *Lactobacillus paracollinoides* y *Pediococcus damnosus*, son difíciles de cultivar y sub cultivar, por lo que el Control de Calidad Microbiológico estaría generando falsos negativos. Para detectar estas Bacterias Ácido Lácticas, se desarrolló el medio ABD (Advanced Beer Spoiler Medium), una modificación del MRS que contiene acetato de sodio, Cyclohexamida 5, cerveza, agar a un pH de 5. y no requiere pruebas confirmatorias. (Suzuki et al., 2008) (Suzuki et al., 2020). El medio puede prepararse en la misma cervecería.

En la siguiente gráfico, se muestra el desempeño del medio ABD para cultivar Bacterias Ácido Lácticas, comparado con medios de cultivo recomendados por la European Brewery Convention and American Society of Brewing Chemists. La incubación se realizó a 25°C en condiciones anaeróbicas. Tomado de (Suzuki et al., 2020) (2)



8.1.2. Métodos Proteómicos

La primera estrategia se basa en la proteómica, basada en la detección de secuencias de péptidos que corresponden a proteínas específicas de los microorganismos (10). Se han

desarrollado métodos proteómicos que empleando la desorción/ionización láser asistida por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo (MALDI TOF) para detectar microorganismos como *Lactobacillus*, levaduras en cerveza (12,13,14,15) con diversas eficiencias. Esta tecnología se está aplicando en la identificación de bacteria, hongos y levaduras de las que muestrea 10^5 - 10^6 células y se les extrae las proteínas mediante una solución que forma una matriz cristalina la cual es expuesta en vacío a un láser (9). Las proteínas de la matriz generan péptidos tras la desorción e ionización, con una relación masa/carga (m/z) para luego ser aceleradas en vacío, midiéndose el Tiempo de Vuelo (TOF) (9). Se genera un espectro de masas o fingerprint para cada péptido de cada proteína, como 16 rDNA, en la matriz almacenándose en bases de datos como el Biotyper para luego identificar los péptidos que corresponden a la proteína de interés, la cual es característica del organismo por identificar (9), 12,13, 14, 23).

Esta tecnología posee un 92% de certeza de detección e identificación de especies, e incluso variedades, pero en ciertas condiciones no elimina el enriquecimiento mediante filtración y/o cultivo previo. El análisis de Espectrofotometría de masas demora un promedio de 1 h y el costo por análisis en promedio es de 0.15 euros o \$1 (9)(17).

Se ha desarrollado un método que identifica cepas de *Saccharomyces cerevisiae* durante la etapa de crecimiento libre células o, “cell free”, en la que no es necesario realizar el cultivo de células. El método analiza el sobrenadante de una muestra de levadura y se identifican péptidos característicos que son secretados por cada cepa empleando MALDI-TOF. (1)

El potencial de detección de especies de microorganismos fue mostrado por Wieme et al, en el que empleó un MALDI-TOF para identificar bacterias que deterioran la cerveza. Identificó muestras que correlacionaban a 32 especies de las 348 especies que deterioran cerveza. El método se comparó con secuencias de genes como fenilalanil tRNA sintetasa (*pheS*) para bacterias ácido lácticas (BAL) o *rpoB* para bacterias ácido acético (BAA). (4) (5). La identificación se realizó en cerveza contaminada. Se muestran los resultados en la siguiente tabla de por Wieme et. al (17).

| Cluster Representatives | BS | Query Sequence | Type strain with highest pairwise sequence similarity to query sequence |
|--|--------------|--|--|
| Cluster 1 <i>Acetobacter cerevisiae</i> / <i>Acetobacter malorum</i> ^a | 74 isolates | R-49601 10 R-49602 11 | <i>rpoB</i> KF910097 <i>rpoB</i> KF910098 <i>A. cerevisiae</i> 98.3% <i>A. cerevisiae</i> 98.3% KF537492 |
| Cluster 2 <i>Acetobacter fabarum</i> | 7 isolates | R-50650 37 | <i>dnaK</i> KF910092 <i>A. fabarum</i> 98.5% HG329542 |
| Cluster 3 <i>Acetobacter indonesiensis</i> | 11 isolates | R-50362 37 R-50645 37 | <i>rpoB</i> KF910108 <i>rpoB</i> KF910109 <i>A. indonesiensis</i> 97.4% <i>A. indonesiensis</i> 97.4% KF537503 |
| Cluster 4 <i>Acetobacter orleanensis</i> | 8 isolates | R-49862 14 | <i>rpoB</i> KF910101 <i>A. orleanensis</i> 99.4% KF537507 |
| Cluster 5 <i>Acetobacter persici</i> | 1 isolate | R-50064 14 | <i>rpoB</i> KF910096 <i>A. persici</i> 98.7% KF537531 |
| Cluster 6 <i>Gluconobacter cerevisiae</i> | 7 isolates | R-50419 36 36 36 | <i>dnaK</i> KF910090 <i>groEL</i> HG329605 <i>rpoB</i> KF910104 <i>G. kondonii</i> 98.4% <i>G. kanchanaburiensis</i> 97.2% <i>G. kondonii</i> 89.0% HG329571 HG329598 HG329607 |
| Cluster 7 <i>Gluconobacter</i> sp. | 2 isolates | R-50361 37 37 | <i>dnaK</i> KF910093 <i>rpoB</i> KF910110 <i>G. uchimurae</i> 97.9% <i>G. roseus</i> 95.2% HG329581 HG329613 |
| Cluster 8 <i>Gluconobacter cerinus</i> | 7 isolates | R-50416 36 R-50417 36 R-50417 36 | <i>rpoB</i> KF910102 <i>dnaK</i> KF910091 <i>rpoB</i> KF910103 <i>G. cerinus</i> 98.2% <i>G. cerinus</i> 98.0% <i>G. cerinus</i> 98.1% FN391790 FN391644 FN391790 |
| Cluster 9 <i>Gluconobacter japonicus</i> | 19 isolates | R-50363 37 R-50643 37 | <i>rpoB</i> KF910105 <i>rpoB</i> KF910107 <i>G. japonicus</i> 98.9% <i>G. japonicus</i> 99.0% HG329615 HG329615 |
| Cluster 10 <i>Gluconobacter oxydans</i> | 5 isolates | R-49860 6 R-49861 6 | <i>rpoB</i> KF910112 <i>rpoB</i> KF910110 <i>G. oxydans</i> 99.9% <i>G. oxydans</i> 99.9% FN391799 FN391799 |
| Cluster 11 <i>Lactobacillus backii</i> | 21 isolates | R-49483 4 R-49484 4 R-50069 4 | <i>pheS</i> KF910133 <i>pheS</i> KF910132 <i>pheS</i> KF910147 <i>L. backii</i> 99.6% <i>L. backii</i> 99.7% <i>L. backii</i> 99.5% AB769496 AB769496 AB769496 |
| Cluster 12 <i>Lactobacillus brevis</i> ^b | 100 isolates | R-49531 11 R-49856 15 R-49857 15 R-49864 10 R-49877 16 R-49879 13 | <i>pheS</i> KF910129 <i>pheS</i> KF910143 <i>pheS</i> KF910144 <i>pheS</i> KF910155 <i>pheS</i> KF910146 <i>pheS</i> KF910156 <i>L. brevis</i> 89.9% <i>L. brevis</i> 99.0% <i>L. brevis</i> 99.0% <i>L. brevis</i> 98.9% <i>L. brevis</i> 98.9% <i>L. brevis</i> 98.9% AM087680 AM087680 AM087680 AM087680 AM087680 AM087680 |
| Cluster 13 <i>Lactobacillus malefermentans</i> | 59 isolates | R-49868 12 R-50644 37 R-50646 37 R-50647 37 R-50649 37 | <i>pheS</i> KF910142 <i>pheS</i> KF910149 <i>pheS</i> KF910150 <i>pheS</i> KF910151 <i>pheS</i> KF910152 <i>L. malefermentans</i> 99.8% <i>L. malefermentans</i> 99.7% <i>L. malefermentans</i> 99.7% <i>L. malefermentans</i> 99.7% <i>L. malefermentans</i> 99.7% <i>L. malefermentans</i> 99.7% AM263505 AM263505 AM263505 AM263505 AM263505 |
| Cluster 14 <i>Pediococcus clausenii</i> | 5 isolates | R-49863 7 | <i>pheS</i> KF910145 <i>P. clausenii</i> 100.0% AM899832 |
| Cluster 15 <i>Pediococcus inopinatus</i> | 22 isolates | R-50648 37 R-50651 37 | <i>pheS</i> KF910153 <i>pheS</i> KF910154 <i>P. inopinatus</i> 100.0% <i>P. inopinatus</i> 100.0% AM899821 AM899821 |

BS = beer sample.

^a Also retrieved from BS5, BS6, BS9, and BS35.

^b Also retrieved from BS4 and BS14.

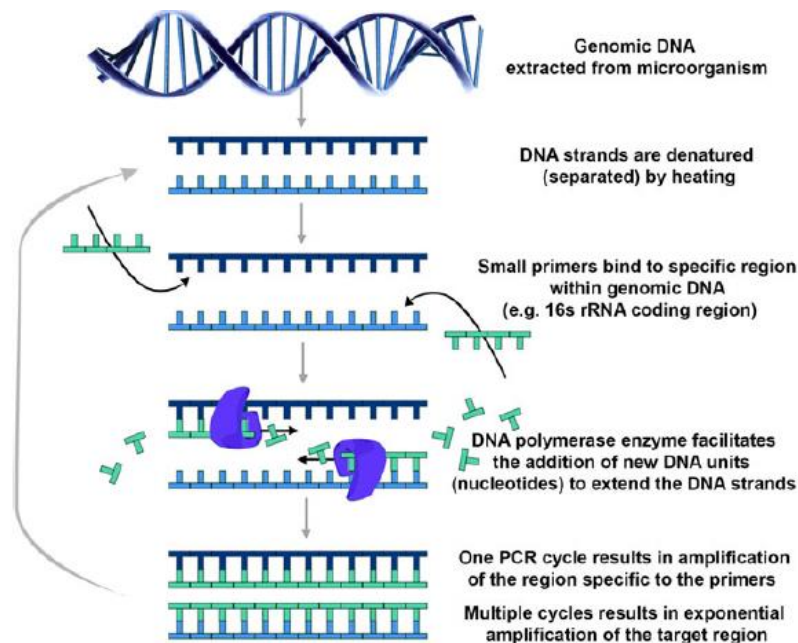
Biotyping: Protein finger printing (Harnpicharnchai et al 2020)

8.1.3. Métodos basados en Biología Molecular

8.1.3.1. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Los métodos se basan en biología molecular como DNA-PCR , RT-qPCR y han sido usado en varios estudios académicos en cervecería (21, 22, 23,35). Este método se basa en la amplificación de regiones de DNA de los microorganismos (bacterias, hongos y levaduras), usualmente genes específicos de las especies a identificar, habiéndose diseñado primers específicos para estas secuencias. La efectividad del método depende de la existencia de los primers. El límite de detección para los métodos basados en PCR es del 100-1000 células/ml (6)

En el siguiente diagrama se muestra el mecanismo del PCR.



(Tomado de Turvey et al 2017)

Este método posee ventajas como la identificación de los microorganismos en una mezcla, lo que evita el paso de cultivar la muestra para enriquecerla de microorganismos. Sin embargo, para reducir los falsos negativos, se recomienda este paso. El tiempo de

análisis demora entre 2-5 h y el costo por análisis es de \$30 el del termociclador es de \$10,000-12,000. (32,33,41). La sensibilidad del método es de 10 células/ml y permite cuantificar directamente la contaminación por el microorganismo. Este método no requiere la expresión fenotípica como en el caso de la detección mediante medios de cultivo. Permite la detección de bacterias, levaduras salvajes y Bacterias Acido Lácticas en su estado Viable pero No Cultivable (VBNC), en el que la bacteria reduce su metabolismo y realiza cambios en su membrana y pared celular para sobrevivir condiciones hostiles como falta de nutrientes o la exposición a desinfectantes. (Xu et al., 2020) (1)

Las debilidades de esta tecnología es que requiere un mayor entrenamiento, no se considera de alto rendimiento ya que el número de muestras procesadas es relativamente bajo. El diseño y producción de primers para todas las especies de microorganismos que deterioran la cerveza es costoso, pero existen kits para las bacterias y levaduras más importantes (*Lactobacillus*, *Pedococcus*, *Brtanomyces*, *PEctinatus*, *Megasphaera*, *Dekera*) que reducen el costo. ((2)Turvey et al., 2017). Actualmente, el número de especies que se pueden detectar mediante PCR oscila entre 20-30 especies dependiendo de la existencia de los primers (23).

8.1.3.2. Secuenciamiento de DNA:

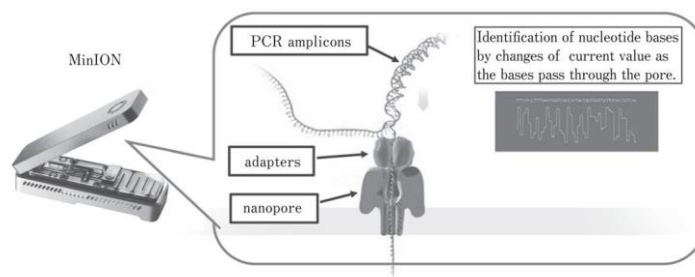
Se emplea un secuenciador para determinar la secuencia de nucleótidos de una molécula de DNA. Se pueden analizar diversos genes, pero el análisis del DNA ribosomal o rDNA se emplea generalmente para la identificación de especies desconocidas. El método se basa en que las secuencias de rDNA son conservadas y específicas entre especies de bacterias. El secuenciamiento del rDNA de la subunidad 16 (bacteriana) emplea primers

universales para las regiones de la subunidad 16, para luego secuenciar el amplicon para luego ser comparado con las bases de datos. (2). Las ventajas incluyen que no es necesario el enriquecimiento del cultivo y es muy preciso. Por otro lado, es un método costoso.

El secuenciador de tercera generación, MinION, no solo secuencia rDNA sino, genes de *Lactobacillus* y *Pedicoccus* (Hor A, un transportador multidroga ABC y Hor C, transportador multidroga dependiente de PMF) o en *Saccharomyces* (STA1, SbKEX2 and GEX1) cual cuesta \$1000 pero es necesario otros sistemas, como el PCR y computadoras. Este sistema tarda 3.5 horas desde la extracción de DNA y una precisión del >98.5% (3) (Kurniawan et al., 2021), (Kurniawan et al., 2022) (4). El costo es de \$3 por cada “barcode” o secuencia genómica única de la especie . ((5) Srivathsan et al., 2021), (Suzuki et al 2020) (6)

El siguiente diagrama muestra el Sistema nanopore MiION :

“Este dispositivo de mano es portátil y funciona con USB desde una computadora portátil (Peso: 87 g, Ancho: 105 mm, Altura: 33 mm, Profundidad: 23 mm). La molécula de ADN en el amplicón de PCR se traslada al nanoporo por el adaptador que lleva la proteína motora enzimática. Luego, la molécula de ADN pasa a través del nanoporo, provocando cambios en la corriente eléctrica. valores que se transforman en las secuencias de nucleótidos” (tomado de (Suzuki et al., 2020) (4).



En el caso de las levaduras, se ha desarrollado una metodología que emplea primers para realizar el PCR de secuencias interdelta de LTR (Long Terminal Repeats) en transposones Ty1 y Ty2 para realizar Fingerprinting sequencing . (7) (Cottrell, Matthew T., s. f.)

Existen métodos que se basan en el uso de anticuerpos para la identificación de los antígenos presentes en microorganismos que deterioran la cerveza. A pesar de ser una tecnología sencilla y rápida, posee un grado de error, comparado con otros métodos. (24,25,26).

8.1.4. Enriquecimiento de las muestras

Los métodos proteómicos y moleculares requieren actualmente un enriquecimiento de microorganismos mediante el cultivo de la muestra en medios líquidos o sólidos o combinación de medios microbiológicos y PCR es empleado por la compañía Döller (10), la cual desarrolló un método que combina el enriquecimiento de microorganismos deteriorantes de cerveza por medios cultivos para concentrar y seleccionar los microorganismos deteriorantes de cerveza de otros microorganismos para luego ser identificados mediante PCR. El beneficio de esta tecnología es que, al enriquecer la flora microbiana en medios de cultivo selectivos, aumenta la especificidad en la identificación, evitando falsos positivos y negativos. Jamanga et. al (2018) empleó un–Dipstick Assay for Rapid Detection of Beer Spoilage Organisms. (9). El análisis con esta tecnología demora 3-14 días de enriquecimiento y 2-4h PCR. Los costos por análisis son \$5-30 (17).

8.2. Detección de Hongos que producen micotoxinas

✓ Detección de los hongos

Al igual que las bacterias que deterioran la cerveza, para la detección de hongos del género *Fusarium* entre otros, se emplea la espectrofotometría de masa (MALDI TOF), PCR, secuenciamiento y medios de cultivo en la cebada y la malta (10,11).

✓ Detección de las micotoxinas

- a. En cebada se emplea HPLC para la detección de las aflatoxinas. (11)
- b. En cerveza HPLC de las aflatoxinas en los diferentes puntos de proceso cervecero. (11)

8.3. Detección de Levaduras Salvajes

La estrategia es similar a la detección de bacterias que deterioran cerveza. Se emplean Medios de cultivo, PCR, secuenciamiento de DNA y espectrofotometría de masa (MALDI TOF). (10,11)

8.4. Evaluación Económica

Se define como “intento sistemático de identificar, medir y comparar costes y resultados de políticas e intervenciones públicas “cuyo objetivo es lograr la toma de decisiones considerando la limitación de los recursos (1).

Se definen cinco métodos son el análisis costo-efectividad, el análisis costo consecuencias, el análisis costo-minimización, el análisis costo-utilidad y el análisis costo beneficio.

✓ **Análisis costo efectividad.**

En este análisis se caracteriza por utilizar como unidad de medida de los resultados de una política la unidad “natural” del resultado. Se calcula el cociente Costo/resultado. (8)

Regla de decisión Costo/efectividad, tomado de (9)

Si $C_n < C_c$ y $R_n > R_c$ → la nueva política es más coste-efectiva
Si $C_n > C_c$ y $R_n < R_c$ → la política actual es más coste-efectiva
Si $C_n < C_c$ y $R_n > R_c$ → trade-off
Si $C_n > C_c$ y $R_n < R_c$ → trade-off

En el caso de *trade-off*:

será necesario hacer un análisis incremental, ya que nos interesa saber cuánto estamos pagando adicionalmente por una unidad extra de efectividad:

$$(C_n - C_c) / (R_n - R_c)$$

y para decidir si el incremento (ahorro) de costes compensa el aumento (disminución) de efectividad, será necesario definir λ y aplicar la regla de decisión:

Si $[(C_n - C_c) / (R_n - R_c)] < \lambda$ → se decide poner en práctica la nueva política

C_n = Coste de la nueva política
 C_c = Coste de la alternativa a comparar
 R_n = Resultados de la nueva política
 R_c = Resultados de la alternativa a comparar

✓ **Análisis costo beneficio.**

En este análisis evalúa el desempeño económico, o rentabilidad, relacionando los beneficios (costos evitados/ahorros en términos monetarios) y los costos (monetarios).

(24)

Los costos se definen como:

Costos fijos: costos que no varían de acuerdo al nivel de unidades producidas

Costos variables: Costos que varían de acuerdo al nivel de unidades producidas

Costo marginal: el costo de producir una unidad adicional

Costo de oportunidad: el costo de no haber tomado la opción.

Regla de decisión costo/beneficio: (41)

- Cuando solamente se considera una intervención:

Si $R_n > C_n$ → beneficio neto para la sociedad → financiación

- Cuando se consideran diversas intervenciones:

Si $(R_n - C_n) > (R_c - C_c)$ → el beneficio neto de la nueva política es más grande que el de la actual → financiación de la nueva política

C_n = Coste de la nueva política
 C_c = Coste de la alternativa a comparar
 R_n = Resultados de la nueva política
 R_c = Resultados de la alternativa a comparar

9. METODOLOGÍA

✓ Diseño de investigación

Variables.

Para evaluar la idoneidad los métodos de detección de microorganismos de deterioro de cerveza para cervecería artesanal, se realizará un análisis económico costo/eficacia (10)

- a. Variable dependiente:
 - a. Resultado: el método de análisis (intervención) seleccionada mediante un análisis económico
- b. Variable independiente:
 - a. Costo del análisis: (bottom up) insumos + mano de obra + amortización de la inversión inicial del equipo
 - b. Eficacia del método de análisis: desempeño del análisis (nivel de detección x Especificidad/ (nivel de detección x tiempo de análisis)
 - c. Beneficio: costo evitado por la pérdida de un lote contaminado por la detección no efectiva de los contaminantes.

9.1. Etapa 1: Revisión sistemática

Objetivo:

Se realizará una revisión sistemática de los diferentes métodos de detección y caracterización de microorganismos que deterioran la cerveza, que sean apropiados para la detección de contaminantes en Cervecerías Artesanales y en Cervecerías industriales.

Se consideran la eficiencia, eficacia y efectividad de los métodos.

Pregunta Estructurada

Los elementos se aplican al contexto de cervecería como:

Población: Cervecerías artesanales

Intervención: Los métodos de análisis para detectar microorganismos que deterioran la cerveza

Comparación: eficiencia (tiempo y precisión) entre los métodos de detección de microorganismos

Resultado/ Outcome: detección temprana de la contaminación.

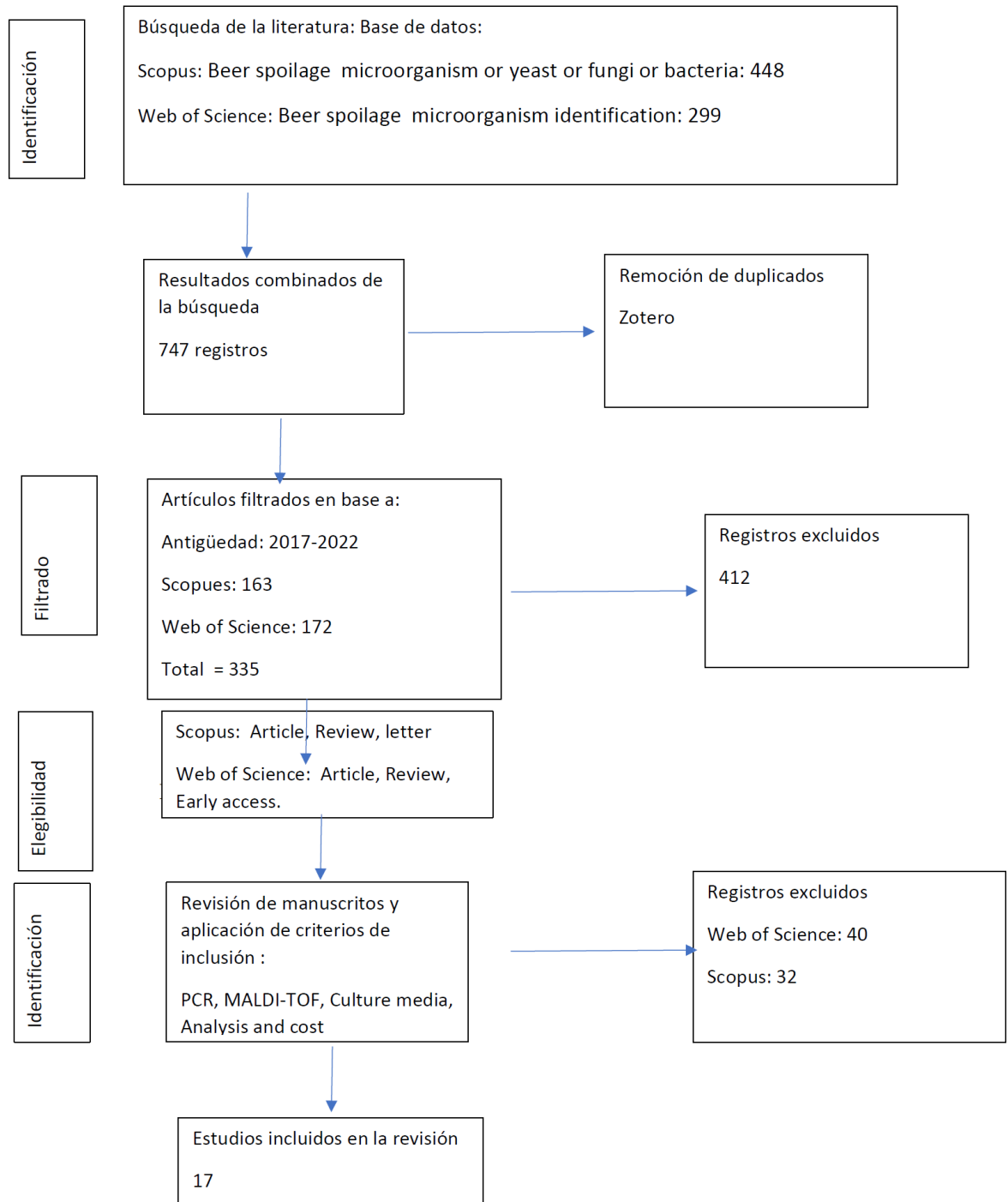
“¿Cuáles son los métodos de análisis de detección de microorganismos que deterioran la cerveza que sean eficientes para ser comparadas entre si para lograr una detección temprana de la contaminación empleados en cervecerías industriales y artesanales?”

Búsqueda en base de datos

Se realizará las siguientes búsquedas en:

- Web of Science.
<https://www.webofscience.com/wos/woscc/summary/d53fa4d9-c337-4380-b460-91974ab88764-6572c479/relevance/1>
- Scopus
- Google Scholar

Selección de artículos



Criterios de inclusión:

| Característica | Criterio de inclusión |
|---------------------|--|
| Población: | Cervecerías industriales y artesanales |
| Intervención: | Los métodos de análisis para detectar microorganismos que deterioran la cerveza: <ul style="list-style-type: none">• Microorganismos• Bacterias• Hongos• Levaduras• MALDI TOF• PCR• Secuenciamiento• Medios de cultivo• Lager, Ale• Costo de análisis |
| Comparación: | eficiencia entre los métodos de detección de microorganismos |
| Resultado/ Outcome: | detección temprana de la contaminación. |
| Tipo de estudio | Revisión, investigación |

Extracción de datos

Se generó una base de datos en Zotero ([Zotero | Your personal research assistant](#)) y luego convertido a Excel extrayendo la información relevante a la pregunta.

Análisis Estadístico

El resultado se calculará como el porcentaje de documentos que analizan las diferentes aplicaciones de cada método del total de artículos analizados.

9.2. Etapa 2: Análisis económico Costo-Eficacia de los métodos de análisis de microorganismos que deterioran la cerveza

Este método se selecciona sobre el método Costo-Beneficio ya que se evaluará los el resultado del efecto de la efectividad del método (unidades naturales) / costos (unidades monetarias) a diferencia del método costo/beneficio en el que se analiza en unidades monetarias tanto el beneficio (ahorro)/ costos.

- a. La eficacia del método o su desempeño se define como:

$$\frac{\text{Desempeño del análisis}}{(\text{Tiempo de análisis})} = \frac{\text{Exactitud} \times \text{Especificidad}}{(\text{Tiempo de análisis})}$$

Siendo:

Nivel de detección= concentración mínima detectable por el método en microorganismos /ml

Exactitud= % de aciertos

Especificidad= Número de especies detectadas

Modificado de Bogavac-Stanojevic et al (2017)

Etapa 2: Etapa 2: Análisis Costo -Efectividad

El objetivo de este análisis es medir el mismo tipo de resultado con diferentes alternativas. Se expresa el incremento de una unidad como el cociente costo efectividad. La decisión se toma en base del cociente más bajo.

10. RESULTADOS

Tabla 1: Resultados de la revisión Sistemática

| Referencia | Proteómica | PCR- Secuenciamiento | Medios de cultivo | Organismos detectados | Sensibilidad del análisis | Exactitud del análisis | Tiempo del análisis | Costo del análisis |
|---|------------|---------------------------|--|---|-----------------------------------|---------------------------|---|---|
| Rodríguez-Saavedra, M.; et. al. Binary Logistic Regression Model as a Tool to Predict Craft Beer Susceptibility to Microbial Spoilage. (2021) (11) | - | Amplificación de 16S rRNA | Bacterias: Man, Rogose, Sharpe (MRS) -Levaduras. yeast extract-peptone-dextrose (YPD) | Lactobacillus brevis Pediococcus damnosus Lactobacillus paracasei Lactobacillus plantarum Leuconostoc pseudomesenteroides Dekkera bruxellensis | Crecimiento/no crecimiento 87% | 273/331=82% | Aislamiento:(18-36 horas) Cultivo selectivo:(48h-7 días) PCR: 2 horas | Medios de cultivo:\$ 5 PCR: \$30 (1) |

| | | | | | | | | |
|---|--|---|------------------------------------|---|------------|---|----------------|--|
| | | | | | | | | |
| Costa J, Sierra-Garcia et al. A Culture-Independent Comparison of Microbial Communities of Two Maturing Craft Beers Styles. 2022 (12) | - | 16S rRNA V3-V4 amplification (procariontes) 28s rRNA ITS 2 spacer (fungi) | Bacterias: 14 Levaduras: 26 | | - | - | - | - |
| LauterbachA,Usbeck et al. (2017) MALDI-TOF MS typing enables the classification of brewing yeasts of the genus Saccharomyces to major beer styles. (13) | MALDI-TOF | - | | Saccharomyces cerevisiae Saccharomyces cerevisiae var. diastaticus Saccharomyces pastorianus 52 variedades de levaduras: | - | 52/52=100% (Biotyper) | - | - |
| Condina, Mark & Dilmetz, Brooke & Razavi Bazaz, Sajad & Meneses, Jon & Ebrahimi Warkiani, Majid | MALDI-TOF +inertial microfluidics (separation) | - | | Mezcla de microorganismos (Biotyper) Especie: <i>Lactobacillus brevis</i> | 1 ufc/4 ml | 90-100% (Análisis y clasificación por Biotyper de la mezcla) | 20 min-2 horas | Microfluidic chip= \$4 Análisis de la muestra = \$1 |

| | | | | | | | | |
|--|--|--|--|---|--|--|---------------------------------------|--|
| <p>& Hoffmann, Peter. (2019). Rapid separation and identification of beer spoilage bacteria by inertial microfluidics and MALDI-TOF mass spectrometry. Lab on a Chip. 19. (14)</p> | | | | <p>Género: <i>Pediococcus damnosus</i></p> <p>Individualmente : Biotyper Especie: <i>Saccharomyces pastorianus</i></p> <p><i>Lactobacillus brevis</i> <i>Pediococcus damnosus</i></p> | <p>1/1 ml</p> <p>- 1 ufc/2 ml</p> <p>3 ufc/ml</p> <p>3 ufc/ml</p> | | | |
| <p>M. Latorre, M.C. et al. Contaminantes microbianos en cervezas artesanales embotelladas de la Patagonia andina argentina, Revista Argentina de Microbiología, (15)</p> | | <p>RT-PCR+ electroforesis capilar 16s rDNA</p> | <p>Detección y cuantificación: Bacterias Ácido láctico (BAL): WLD, HSU</p> <p>Levaduras contaminantes: medio de sulfato de cobre de Lin (LCSM)</p> | <p>Identificación por RT-PCR:</p> <p>Bacterias <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus backii</i></p> <p>Especies de Acetobacter y Asia</p> <p>Total 14 especies</p> <p>Levaduras contaminantes 5 especies</p> | <p>Medios de cultivo: BAL</p> <p>10 ufc/ml (según Hill) crecimiento en 43/75 muestras= 57%</p> <p>Levaduras contaminantes 10 ufc/ml (según Hill) crecimiento en 31/75 de muestras= 41%</p> | <p>BAL (RT-PCR): >99.25%</p> <p>Levaduras contaminantes (RT PCR) >99.51%</p> | <p>Medios de cultivo: 48-72 h</p> | <p>PCR equipo: 10,000-15,000</p> <p>Análisis PCR: \$30 (Turvey 2017)</p> |

| | | | | | | | | |
|--|---|---|--|--|--|-------|--|---|
| | | | | | | | | |
| Kurniawan YN et al Applications of the Third-Generation DNA Sequencing Technology to the Detection of Hop Tolerance Genes and Discrimination of <i>Saccharomyces</i> Yeast Strains. (20) | - | Secuenciador MinION+PCR rDNA, genes de Lactobacillus (Hor A y Hor C) o en Saccharomyces (STA1, SbKEX2 and GEX1) | | 30 especies de hongos y levaduras: Brettanomyces, Candida, Dekkera, Hanseniaspora, Lanchaena, Pichia, Saccharomyces, Torulasphera, Zygosaccharomyces. Distingue levaduras: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>S. pastorianus</i> | | 98.9% | Parte de una librería de microorganismos. 3.5h desde la extracción de DNA | Análisis = \$3+\$30 Minión = >\$1000 +PCR y software y computadora (9) |
| Kurniawan, Y. N., Shinohara, et al (2021). Development of a Rapid and Accurate Nanopore-based Sequencing Platform for on- | | Secuenciador MinION+PCR 16 rDNA, genes de Lactobacillus y genes Hor A y Hor C | | 30 especies de Lactobacillus, Pectinatus, Megasphera, Pediococcus. | | 98.7% | Parte de una librería de microorganismos. 3.5h desde la extracción de DNA | Análisis = \$3 Minión = >\$1000 +PCR y software y computadora (9) |

| | | | | | | | | |
|---|-----------|--|--|---|---|--|---|---|
| Field Identification of Beer-Spoilage Bacteria in the Breweries (21) | | | | | | | | |
| Sohlberg E, et al. Fungal diversity on brewery filling hall surfaces and quality control samples. 2022 (17) | | <p>Enriquecimiento líquido o sólido de 74 muestras para luego ser aislados en agar YM</p> <p>135 levaduras 79 hongos filamentosos qPCR</p> <p>Levaduras: región D1/D2</p> <p>Hongos: región ITS Secuenciamiento Sanger</p> | | <p>Levaduras: 29 especies</p> <p>Hongos filiformes: 26</p> | | <p>Secuenciamiento Sanger/ NCBI: 98-100%</p> | <p>Hisopados de superficies: analizados el mismo día.</p> <p>Muestras de QC cultivadas previamente: 48 h Análisis: 1.5 hora</p> | <p>~15 000 single-end reads per USD\$1</p> <p>Caporaso, J., Lauber, C., Walters, W. <i>et al.</i> Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms 10.1038/ismej.2012.8</p> |
| Turvey ME, Weiland F, Meneses J, Sterenberg N, Hoffmann P. Identification of beer spoilage microorganisms using the MALDI Biotyper platform. Appl | MALDI-TOF | | Aislamiento y enriquecimiento en medios de cultivo: tras filtración por membrana, NBB por 24-48h | <p>Base de datos: Biotyper</p> <p>Bacterias identificadas : 7 especies <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lactobacillus brevis</i></p> | <p>> 1 ufc/ml 1 ufc > 10⁵ células en cultivo sólido</p> <p>En cerveza: > 10⁵ ufc/100ml</p> | 98.5% | 24-48 h enriquecimiento 1h de análisis | |

| | | | | | | | | |
|---|--|---|---|---|--|------------------|---|--|
| Microbiol Biotechnol. marzo de 2016;100(6):2761 -73. | | | | <i>Lactococcus lactis</i> Hongos y levaduras identificadas: 8 especies <i>Candida pelliculosa</i> <i>Candida guilliermondii</i> | | | | |
| Shimokawa M, et al. Development of Culture- Independent Detection Method for Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria. Journal of the American Society of Brewing Chemists. (21) | | PCR (independiente de cultivo) y filtración a alta presión por membrana | | <i>Lactobacillus brevis</i> | 1-10 células/300ml | 100/100 muestras | No se enriquece 8 horas | |
| Se obtuvo mediante una búsqueda secundaria: Breitträger, M.; et al, M. Screening of Mycotoxigenic Fungi in Barley | | q-PCR (Tomita et al protocol) | PDA (Potato- Dextrose-Triton x100 Agar) | PCR: <i>Alternaria alternata,</i> <i>Cladosporium cladosporioides,</i> <i>Epicoccum nigrum,,</i> | PCR: DNA Hongos. Picogramos Cebada y malta: nanogramos | | Medios de Cultivo: Hongos: Semillas: 24/24 horas de luz/oscuridad para su germinación a20- | |

| | | | | | | | | |
|---|--|----------|---|---|---|--|--|--|
| and Barley Malt (Hordeum vulgare L.) Using Real-Time PCR—A Comparison between Molecular Diagnostic and Culture Technique: 2022 (24) | | | | <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Hordeum vulgare</i> Medio de Cultivo (en cebada y malta): Fusarium spp. Alternaria spp. Cladosporium spp. Penicillium spp. Aspergillus spp. Epicoccum nigrum Rhizopus spp. Mucor spp. Ulocladium spp otros | | | 24°C. Se identifica taxonómicamente tras 7, 10, 14 días PCR: 1.5 hora total: 0.5 hora extracción+1 hora amplificación | |
| Se obtuvo mediante una búsqueda secundaria Schneiderbang er et al. Statistical evaluation of beer spoilage | | q-RT-PCR | Enriquecimiento en caldo de cultivo NBB-B antes del PCR | Especies: 13 L. brevis L. lindneri L. backii L. (para-)casei L. collinoides L. (para-)buchneri L. rossiae L. perolens/ harbinensis | 10-100 células/mL Tamaño de muestra 100uL de caldo o 1 ufc en agar | | Enriquecimiento: 2 -14 días PCR: | |

| | | | | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| bacteria by real-time PCR analyses from 2010 to 2016: (25) | | | | M. cerevisiae Pd. Damnosus Grupos: L. (para-)plantarum, L. coryniformi P. cerevisiophilus, P. frisingensis, P. haikarae; Pd. parvulus, Pd. pentosaceus, Pd. acidilactici. | | | | |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|

| Tabla 2: Resumen de las tecnologías más relevantes para la detección e identificación de microorganismos contaminantes de cerveza | | | | | | |
|--|---|---|--|--|--|--------------------------------|
| Tecnología | Tiempo de cultivo o enriquecimiento + tiempo de análisis (horas) | Exactitud del análisis (porcentaje) | Número de especies detectadas | Límite de detección (ufc/ volumen ml) | Costo de Análisis en USD | Costo del equipo en USD |
| Microbiología tradicional | | | | | | |
| Medios de cultivo y pruebas bioquímicas | 48h-120h (hasta 240h dependiendo del tipo de cerveza y las especies de microorganismos) | 57% No se detecta con facilidad bacterias en estado latente o VBNC | Bacterias (BAL, BAA):19 Hongos/Levaduras: 3 (23) | 10 ufc/1ml | \$6 \$15 si se emplean pruebas bioquímicas API (11) | 23,950 ² |
| Proteómica | | | | | | |
| Proteómica: Espectrofotometría de masa MALDI-TOF | 24-48h Se requiere aislamiento en colonias en medio sólido o en caldo nutritivo Tiempo de análisis: 1 h Total: 49h | 98.5%-100% Dependiendo de la complejidad de la mezcla | Bacterias: 7 Hongos/levaduras: 8 Total 15 especies | > 10 ⁵ ufc/100ml 10 ⁵ – 10 ⁶ celulas por placa de MALDI- TOF (11) | \$1 | 100,000- 150,000 |

| | | | | | | |
|--|--|-----------|--|--|-----------|---------------|
| | | | 52 variedades de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Weime et al 2014: 32 especies | | | |
| Métodos moleculares | | | | | | |
| PCR con enriquecimiento/cultivo previo | Con enriquecimiento: 48-72 h q-PCR: 2 horas Total: 79 h | 82-99.25% | Bacterias: 14 Hongos y levaduras: 9 Total: 23 especies | 100-1000 ufc/ml | \$30 | 10,000-15,000 |
| Secuenciamiento de DNA | Secuenciamiento PCR+MinION: 3.5h | 98.-98.9% | Bacterias: 30 especies de Lactobacillus, Pectinatus, Megasphera, Pediococcus. Levaduras y hongos: 30 especies | Al basarse en PCR, el nivel de detección se asume que es comparable. | \$50 (31) | >1000 |

¹ Se asumirá 48h de cultivo de enriquecimiento para efectos de comparación

2 Setting Up A Homebrew Laboratory | MoreBeer

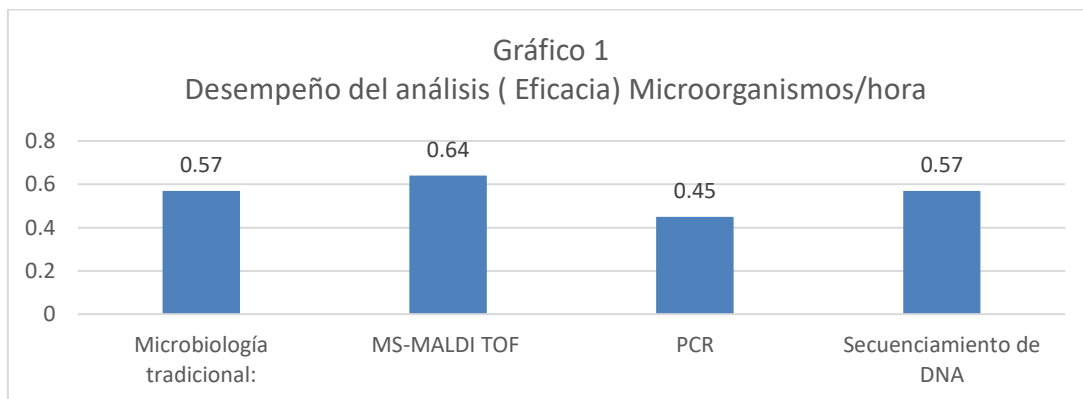
| Tabla 3: Costos y Eficacia de las tecnologías de detección e identificación de microorganismos contaminantes de cerveza, empleando un servicio de análisis de microbiología | | | | | |
|--|---|--|--|--|--|
| Tecnología | Tiempo de cultivo o enriquecimiento y tiempo de análisis¹ (horas) | Exactitud del análisis (porcentaje) | Número de especies detectadas (especificidad) | Desempeño del análisis (Eficacia) <i>(Exactitudx Especificidad)</i> (Tiempo de análisis) Especies detectadas correctamente/hora | Precio por análisis USD² (tercerizado) |
| Proteómica: MS-MALDI TOF | 48+1 = 49 | 98.5 | 32 | $(0.985 \times 32) / 49 = \mathbf{0.64}$ | 72.5 (www.midilabs.com) |
| Biología Molecular: PCR | 48+1=49 | $(82+99.25) / 2 = 90.625$ | 23 | $(0.9625 \times 23) / 49 = \mathbf{0.45}$ | www.murphyandson.co.uk 61.92-74.83: levadura recuperada, fermentadores, cerveza terminada (varios análisis: 86.69 (un solo análisis) www.midilabs.com 176.6 (un solo análisis) |

| | | | | | |
|---|--------------|-------|----|---|--|
| | | | | | |
| Biología Molecular: Secuenciamiento de DNA | 48+3.5= 51.5 | 98.45 | 30 | $(0.9845 \times 30) / 51.5 = \mathbf{0.57}$ | 200 |
| Microbiología tradicional: Medios de cultivo y pruebas bioquímicas | 120 | 57 | 23 | $(0.57 \times 23) / 120 = \mathbf{0.11}$ | 40.70 (cerveza sin filtrar, mosto y agua; 4 medios de cultivo por muestra) 49.54 (cerveza filtrada) www.murphyandson.co.uk |

2. Lab Services - Short's Brewing Company - Short's Brewing Company (shortsbrewing.com), Beer Testing - Beer Contamination Testing (brewingscience.com)

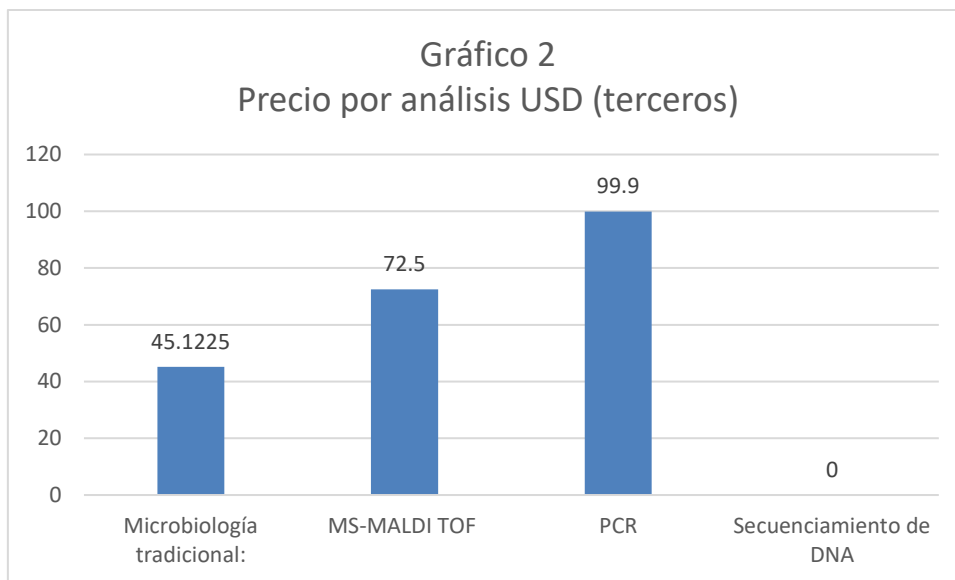
Análisis de muestras por terceros.

Se considera analizar muestras microbiológicas por terceros enviados a los EEUU ya que estos servicios no existen en el Perú. No se han considerado los costos de envío a EEUU. Se consideran los precios de análisis de una corrida por muestra. Se considera el costo de priorizar el análisis de la muestra, siendo mayor en este caso, obteniéndose resultados el mismo día, al día siguiente o en 2-3 días en promedio, en MALDI-TOF y PCR. El desempeño del MALDI-TOF es superior al PCR, Secuenciamiento y Microbiología tradicional. El PCR identifica un número menor de especies, que los otros métodos, sin embargo, las especies identificadas incluyen a las especies de microorganismos que deterioran la cerveza y las especies que están apareciendo en cervecería artesanal. La microbiología basada en medios de cultivo tiene dificultad de identificar especies de bacterias que entran en estado vegetativo. (Gráfico 1)

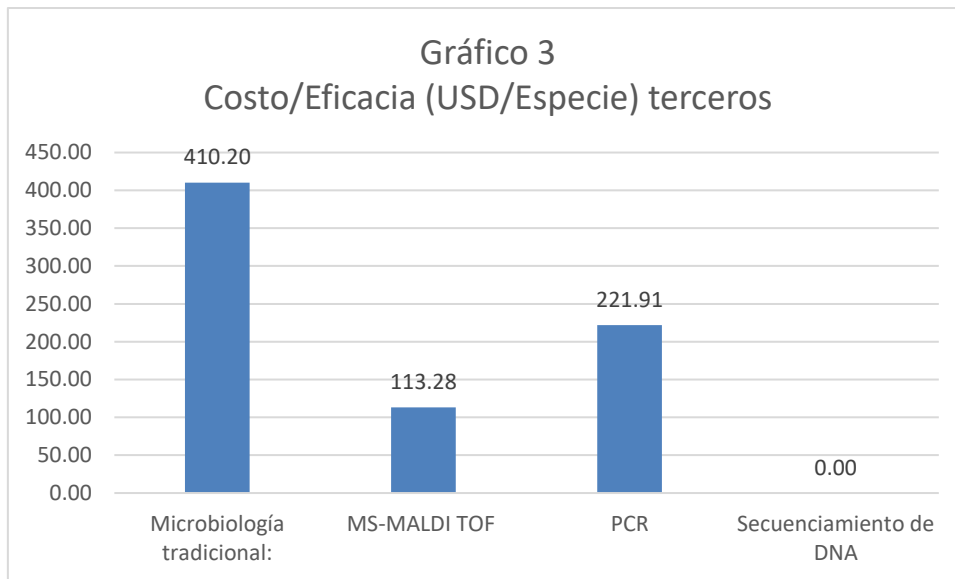


Los precios por terceros son realizados por MIDILab.com y Murphyandson.co.uk. El precio (MIDIILabs.com) por cada análisis es menor en el caso del MALDI-TOF, es un precio promedio que considera la prioridad en el proceso, que puede ser reportado el mismo día de análisis hasta después de dos días. Los precios de PCR de MIDILab.com son los mismos para bacterias (16 S) y hongos/levaduras (28s) variando en la prioridad

del envío del reporte pudiendo ser el mismo día o dos días después, tomándose el promedio de estos precios. En el caso de Murphyandson.co.uk , los precios de PCR varían si se realiza un sólo análisis o son varios (lo que reduce el precio), tomándose el promedio. El precio del análisis mediante medios de cultivo por www.murphyandson.co.uk consideran el promedio del análisis de cerveza sin filtrar y el análisis de cerveza filtrada. No se encontró proveedores que realicen el servicio de secuenciamiento de DNA para la identificación de microorganismos que deterioran la cerveza (Gráfico 2).



La relación costo/eficacia de los métodos rápidos, muestra que el MALDI-TOF es el método con el menor costo para identificar especies, seguido por el secuenciamiento y finalmente el PCR. El método de microbiología posee en términos absolutos, el menor costo. No se encontró proveedor que realice secuenciamiento de DNA para la identificación de microorganismos. (Gráfico 3)



El criterio de selección de la metodología de QC Microbiológico empleado el costo/eficacia sería:

MS-MALDI TOF > PCR > Microbiología tradicional (basada en medios de cultivo).

Costos de los análisis si la Cervecería Artesanal realiza la inversión en las tecnologías de Control de Calidad Microbiológico

Se analiza el escenario en la que la Cervecería Artesanal (Macro, Mini, nano) decide realizar el análisis en su planta, por lo se establece una estructura de costos para comparar los métodos de análisis en el Perú.

Equipos

El costo de la adquisición de los instrumentos se amortiza en cinco (5) años. No se incluye la depreciación ni el valor de recuperación de los instrumentos. Tampoco se considera el leasing del instrumento. En el caso de las amortizaciones de los equipos (o inversión inicial), éstas se realizan en 5 años, considerando su uso dos veces por semana

por cada lote en producción y que cada lote toma 30 días en producirse. La inversión inicial de la Microbiología tradicional (básica) es la implementación del laboratorio que incluye microscopio, incubadora, material de vidrio y otros insumos. El costo amortización disminuirá al aumentar el número de análisis, pero esto aumentará los costos directos de los insumos al aumentar el número de análisis, por lo que el método cuyos insumos sean más baratos, tendrá menos impacto en el costo final.

Insumos del análisis.

En el caso de los insumos, estos se basan en los costos académicos y comerciales.

El MALDI-TOF requiere 200 ul de matriz para realizar el análisis, “(...10⁵–10⁶ células; células intactas o extractos de células) se transfiere a una placa. A continuación, una solución matriz que contiene ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico, ácido 2,5-dihidroxi-benzoico o ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-cinámico (ácido sinapínico, SA) en una mezcla de disolventes: se aplica a la muestra agua, ácido trifluoroacético (TFA) al 2,5 % y acetonitrilo (ACN) al 50 %, etanol o metanol.” (14).

El PCR requieren kits de primers (USD 481.22 para 24 tests = \$ 20.05 test) por Microbiologique, en las que se consideran 2 controles.

Microbiología tradicional se basa en medios de cultivo como MRS, Agar lysina, ADM y NBB. El medio, NBB-A de Döhler cuesta \$144 por 6 botellas de 250 ml y se requiere 10 ml por cada placa para 5 puntos de muestreo por lote, costando \$4.8 por placa. Se consideran 4 placas de diferentes medios cultivo para la detección de levaduras, hongos y bacterias. Por este motivo, el costo aumenta.

La mano de obra contempla a un profesional con un sueldo de S/. 3000 mensuales.

Se asume un 10% de costos indirectos para cada análisis.

La mano de obra es el salario de un analista microbiólogo en el mercado peruano (S/. 2500 Bumeran, Tusalaro.org). El método que requiera menos horas de mano de obra o que no sea especializada, tendrá menos impacto en el costo final.

El volumen de producción de cerveza artesanal es 2 millones de litros (2022) producida por 150 empresas formales (Gestión 2021), por lo que en promedio, las plantas producen 13,333 litros al año en promedio, por lo que se producen en promedio 1100 litros al mes. En el caso de la cervecería Hopps, los lotes son de 1000 litros, produciéndose 3 lotes al mes.

| Metodología | Amortización de la tecnología en 5 años(costo por analisis para 5 análisis 40 lotes de producción | Costo de insumos / análisis (PEN) | Mano de obra/hora (PEN/hora) | Horas de mano de obra | Costo Directo Total PEN/ Análisis | Costos indirectos (10% de costos directos) | Costos totales (PEN) | Costo total en dolares |
|------------------------|---|---|--------------------------------------|------------------------------|--|---|-----------------------------|-------------------------------|
| Microbiología | 92.21 | 77.00 | 12.5 | 8.00 | 269.21 | 26.92 | 296.13 | 76.92 |
| MALDI-TOF | 577.50 | 3.85 | 12.5 | 8.00 | 681.35 | 68.14 | 749.49 | 194.67 |
| PCR | 57.75 | 77.20 | 12.5 | 8.00 | 234.95 | 23.49 | 258.44 | 67.13 |
| Secuenciamiento | 81.81 | 573.65 | 12.5 | 8.00 | 755.46 | 75.55 | 831.01 | 215.85 |

*Los costos de insumos empleados por Proteómica, PCR, Secuenciamiento de DNA y Microbiología basados en medios de cultivo son los reportados en la literatura.

* Los costos de insumos de PCR se basan en el kit de Microbiologique

*USD= S/. 3.85

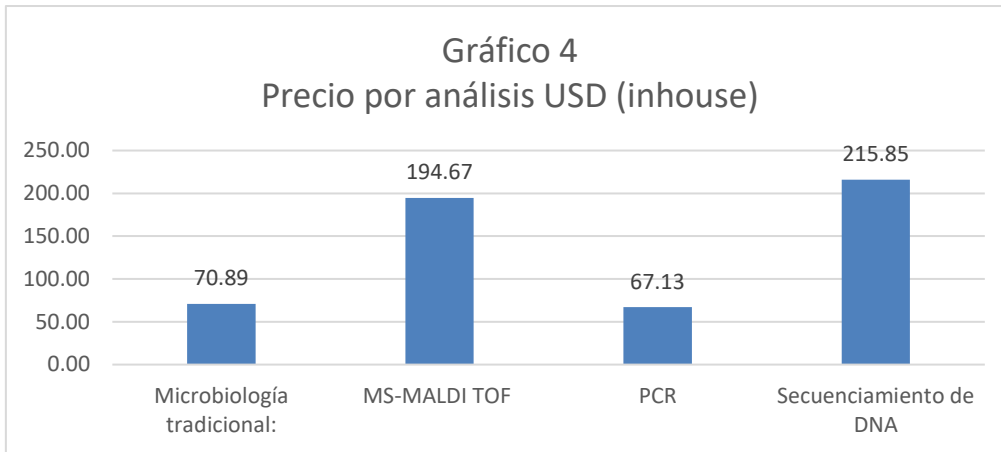
El costo de MALDI-TOF es afectado por el costo de los insumos y el tiempo de análisis, lo que disminuye el costo de mano de obra. En ciertos casos, el análisis no requiere enriquecimiento, lo que disminuiría el tiempo a 1 hora.

El costo de PCR es afectado por que en cada kit hay 24 tests, disminuyendo el costo por análisis de cada muestra comparado con el análisis realizado por terceros. En ciertos casos, el análisis no requiere enriquecimiento, lo que disminuiría el tiempo a 1 hora. El kit permite reconocer, “Detección simultánea de organismos que deterioran la cerveza: *Brettanomyces bruxellensis*/*B. anomala*, bacterias del ácido láctico (incluidas las cepas resistentes al lúpulo), *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Saccharomyces diastaticus* y *Aceticacid.*” (Microbiologique)

El costo de Secuenciamiento + PCR requiere el secuenciador, una PC, software y un PCR.

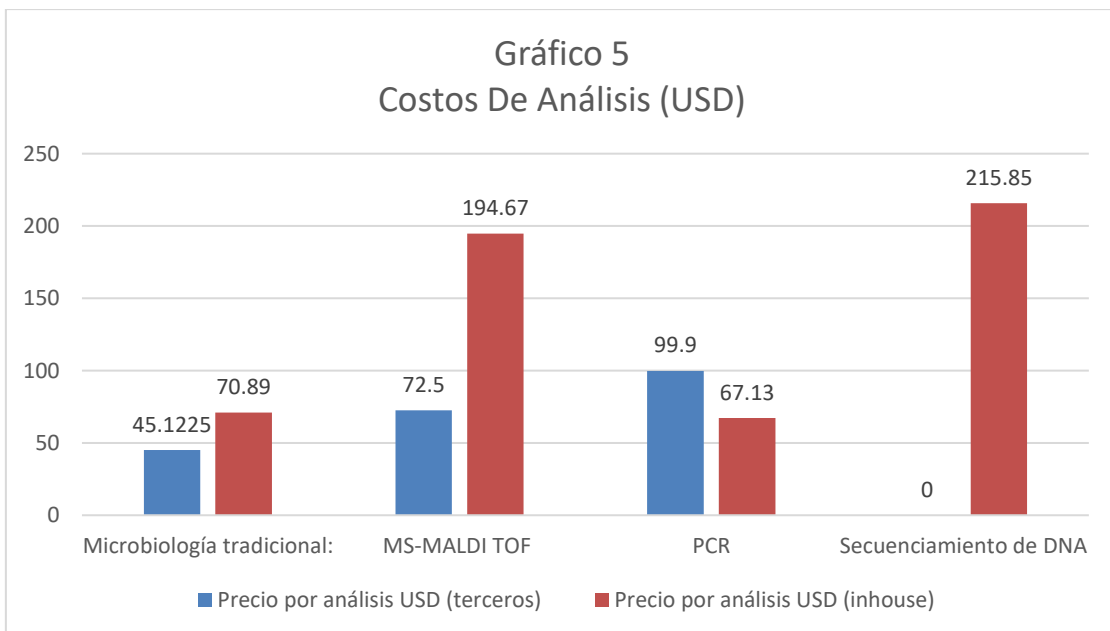
El costo de la microbiología basado en medios de cultivo es intensivo en la inversión del laboratorio, los múltiples medios de cultivo y la mano de obra es afectada por la duración de análisis de 5-14 días. El Control de Calidad mediante Microbiología tradicional requiere pruebas bioquímicas adicionales, además de emplear múltiples medios de cultivo.

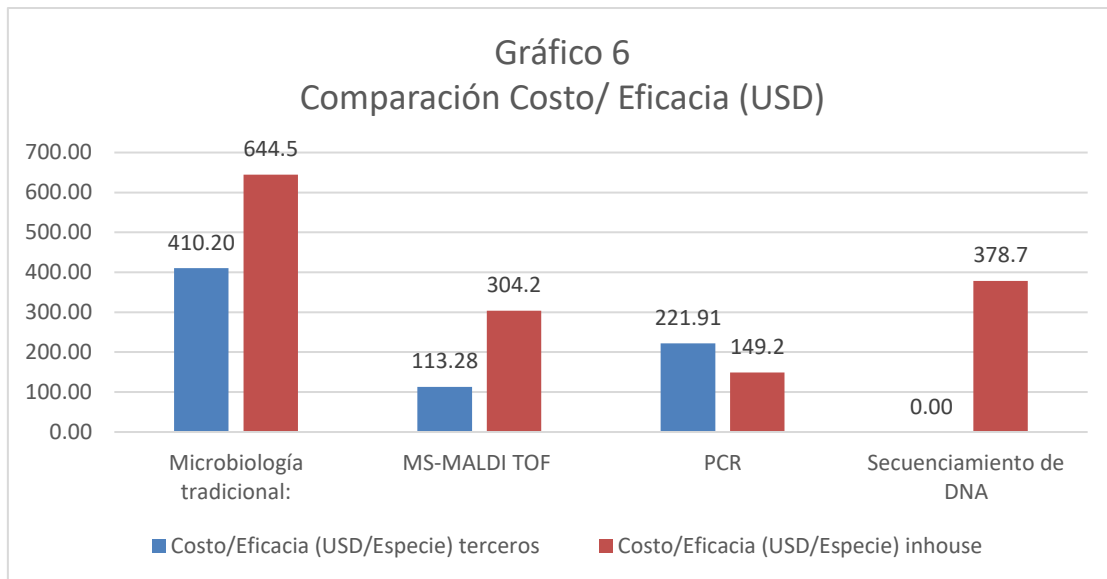
Se grafican los costos de análisis por la cervecería si se compra el equipo (inhouse o producción de análisis).



Comparación de costos de análisis

Se realiza una aproximación en al compararla metodologías realizadas por la cervecería artesanal inhouse o por terceros. **Esta comparación es solo referencial ya que no son comparables debido a que la estructura de costos es diferente en EEUU y Perú.** No se han encontrado servicios de terceros en el Perú para estos análisis.





Estos resultados muestran que al analizar el costo/ eficacia de los métodos de QC

Microbiológico realizado por terceros, se seleccionaría en este orden:

- 1. MS-MALDI TOF**
- 2. PCR**
- 3. Secuenciamiento de DNA**
- 4. Microbiología Tradicional**

Sin embargo, si la cervecería adquiere la instrumentación, la selección se realizaría en este orden:

- 1. PCR**
- 2. MALDI-TOF**
- 3. Microbiología Tradicional (basada en medios de cultivo)**
- 4. Secuenciamiento de DNA+PCR**

Efecto cada metodología de Control de Calidad Microbiológico en los costos de producción de cerveza en el Cervecerías Artesanales en el Perú

Tras medir el indicador costo/ beneficio de las metodologías de Control de Calidad Microbiológico, se calcula el efecto de incluir el costo del Control de Calidad (QC) Microbiológico en los costos de producción de cerveza artesanal con el objetivo de detectar la contaminación tempranamente y evitar la pérdida de cerveza por esta contaminación y mantener la calidad del producto.

Para analizar el efecto las metodologías de control de Calidad Microbiológica en los costos de producción, se empleó la información de producción fue proporcionada por el cervecero, Ing. Franco Cruz, que labora en una cervecería artesanal peruana, con operaciones en Lima, Trujillo y Cuzco.

Datos generales de la micro cervecería Artesanal

| | |
|---|-------------|
| Producción de cerveza al año (litros) | 40,000.00 |
| Costo de producción (soles/l) | 5.00 |
| Tamaño de lote (litros) | 1000.00 |
| Costo del lote | 5000.00 |
| Número de lotes al año | 40.00 |
| Numero de lotes al mes | 3.3 |
| Precio de venta (soles/l): Draft | 18.00 |
| Precio de venta sin IGV (S/. por litro): Draft | 15.25 |
| Valor de producción de cerveza al año (sin IGV) | S/. 610,000 |
| Margen Bruto = (precio sin IGV-costo de producción) x volumen anual | S/. 410,000 |

*USD= S/. 3.85

En cervecerías artesanales, la sanitización de los tanques, líneas cerveza, mangueras, llenadoras y otros sistemas de producción de cerveza son sanitizados mediante una ejecución de Clean In Place (CIP) (37), en el que deben mantenerse correctas las

temperaturas, concentración y tiempo de aplicación de las soluciones de limpieza como NaOH, ácido fosfórico, ácido nítrico y el agua. El último paso del CIP es el enjuague del tanque del cual se toma una muestra para el análisis microbiológico. El reporte del análisis basado en medios de cultivo se genera en 3-5 días. El tanque es llenado con cerveza en proceso, para luego tomar una muestra para su análisis microbiológico empleando medios de cultivo y se reporta tras 5 días. Estos procesos hacen de que el tanque de cerveza esté en “cuarentena” hasta que se generen los resultados microbiológicos, liberándose el lote para el siguiente proceso si no presenta contaminación o es desechada si está contaminada. Esto reduce la productividad de la planta y en el caso de una contaminación, una pérdida económica.

El Ing. Franco Cruz comentó que actualmente, las cervecerías artesanales en el Perú generalmente no realizan Control de Calidad Microbiológico en la producción de cerveza por los altos costos de implementar un laboratorio de microbiología, por lo que se enfocan en realizar el CIP. Sin embargo, al no existir Control de Calidad Microbiológico que confirme el correcto CIP o el manejo correcto de las tuberías, mangueras, ambientes, llenadoras, las micro cervecerías quedan expuestas al desarrollo de biofilms, bacterias en estado vegetativo, infecciones por levaduras extrañas y contaminaciones cruzadas.

Para evaluar el incremento en los costos y márgenes al implementar el QC por las diferentes metodologías, se realizan los cálculos de márgenes de contribución para calcular el Margen Bruto (diferencia entre el precio de venta sin impuesto y costo de producción) y costos/beneficios presentados en las siguientes tablas. La unidad de venta es una jarra de 1 litro de cerveza.

QC Microbiología Tradicional

| | |
|--|-------------|
| Precio de venta (soles/litro) | 18.00 |
| Precio sin IGV | 15.25 |
| Costo Producción (soles/litro) | 5.00 |
| Costo análisis por litro | 0.30 |
| Margen Bruto | 9.95 |
| Costo de análisis/margen unitario | 0.03 |

QC MALDI-TOF

| | |
|--|-------------|
| Precio de venta (PEN/litro) | 18.00 |
| Precio sin IGV | 15.25 |
| Costo Producción (PEN s/litro) | 5.00 |
| Costo análisis por litro | 0.75 |
| Margen Bruto | 9.50 |
| Costo de análisis/margen unitario | 0.08 |

PCR

| | |
|--|-------------|
| Precio de venta (PEN / litro) | 18.00 |
| Precio sin IGC (PEN/litro) | 15.25 |
| Costo Producción (PEN) | 5.00 |
| Costo análisis por litro (PEN/l) | 0.26 |
| Margen Bruto | 9.99 |
| Costo de análisis/margen unitario | 0.03 |

QC Secuenciamiento+PCR

| | |
|--|-------------|
| Precio de venta (soles/litro) | 18.00 |
| Precio sin IGV | 15.25 |
| Costo Producción (soles/litro) | 5.00 |
| Costo análisis por litro | 0.83 |
| Margen Bruto | 9.42 |
| Costo de análisis/margen unitario | 0.09 |

Los análisis de Control de Calidad Microbiológico (QCM) que reducen menos el margen, generan un menor Costo de análisis/margen unitario. Al evaluar el costo de análisis/margen unitario de los métodos de QC en el siguiente orden:

- 1. PCR**
- 2. Microbiología tradicional basada en medios de cultivo**
- 3. MS-MALDI TOF**
- 4. Secuenciamiento de DNA-PCR**

El PCR se califica sobre la microbiología tradicional debido a que el costo/efectividad es menor del PCR es mejor que el de microbiología tradicional. El MS-MALDI-TOF, a pesar de poseer un Costo/efectividad menor que la microbiología tradicional, sus costos de amortización del equipo son mayores.

Al calcular los márgenes para la producción anual, considerando las “cuarentenas” por los análisis de QCM, se obtiene la reducción de la producción por el tiempo de las “cuarentenas”. **EFFECTOS DE LOS MÉTODOS DE CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICA EN LA PRODUCCIÓN**

| | Producción al año (litros) | Margen/ litro | Margen al año (PEN) |
|--|-----------------------------------|----------------------|----------------------------|
| Producción sin QCM | 40,000.00 | 10.25 | 410,000.00 |
| Producción con MALDI-TOF (49h) | 39,777.50 | 9.50 | 377,886.25 |
| Producción con MALDI-TOF (1h) | 39,995.43 | 9.50 | 379,956.63 |
| Producción con PCR (49h) | 39,777.50 | 9.99 | 397,377.23 |
| Producción con PCR (1h) | 39,995.43 | 9.99 | 399,554.39 |
| Producción con Secuenciamiento DNA (51.5h) | 39,777.50 | 9.42 | 374,704.05 |
| Producción con Microbiología Tradicional (7 días) | 39,029.00 | 9.95 | 388,338.54 |

COMPARACIÓN DE MÁRGENES POR TECNOLOGIA

| | PEN |
|---|------------|
| PCR- Microbiología Tradicional | 9,038.69 |
| MALDI-TOF -Microbiología Tradicional | -10,452.29 |
| Secuenciamiento -Microbiología Tradicional | -13,634.49 |

Se ha considerado enriquecimiento por medios de cultivo por 48 horas para MALDI-TOF y PCR. En algunas muestras el análisis puede realizarse sin el enriquecimiento, por lo que el análisis dura un promedio de 1 hora y por lo que la disminución de producción por la “cuarentena” microbiológica disminuye.

En la comparación de márgenes entre cada tecnología, el PCR ahorra PEN 9,038.69, mientras que el MALDI-TOF y el Secuenciamiento reducen los márgenes con respecto a la Microbiología tradicional basada en medios de cultivo.

11. DISCUSIÓN

Análisis costos y la eficacia de los métodos

El análisis de costos/eficacia permite seleccionar la metodología con menor costo y mayor eficacia, lo que significa que requiere menor costo para mejorar su eficacia. Al tomar como referencia los costos internacionales para los análisis y sus eficacias, el QC por MALDI-TOF es costo eficaz, seguido por PCR y finalmente por microbiología tradicional. Los resultados de MALDI-TOF y PCR se pueden generar el mismo día o entre 1-2 días dependiendo del laboratorio, coincide con la efectividad calculada basándose en la literatura. También coincide el reporte del análisis de microbiología basada en medios de cultivos, 5 días, con lo reportado en la literatura. La rapidez de reportar los resultados, reduce el impacto en la productividad de cerveza y le da la posibilidad de prevenir contaminaciones y no detectarlas una vez que la cerveza este contaminada. El costo/eficacia puede disminuir debido a que se alcanzan economías de escala (los costos fijos, como la amortización del equipo, se dividen en mayor número de pruebas) en el caso del laboratorio de terceros, quienes consideran “descuentos” por múltiples muestras. Los descuentos por múltiples muestras promueven el uso del servicio de laboratorio para más muestras del proceso de producción de cerveza. Esta estrategia permite mantener los costos bajos los análisis realizados.

Al evaluar la propuesta de que la micro cervecería realice los análisis de Control de Calidad Microbiológico, se obtienen resultados diferentes al desarrollar una estructura de costos en el Perú.

Al desarrollar la estructura de costos de los análisis microbiológicos empleado las diferentes metodologías, se observan que los factores que generan los mayores costos son: la amortización del equipamiento, la mano de obra y las horas que requiere el análisis. En el caso de la micro cervecería, debido a su relativa baja producción, el número de análisis son menores que en una cervecería industrial, lo que aumenta el costo por análisis.

El estándar durante más de un siglo es la microbiología tradicional basada en medios de cultivos y pruebas bioquímicas. Este sistema es costoso a pesar que el medio de cultivo cuesta alrededor de \$5, debido a que la implementación del laboratorio implica no sólo los diferentes medios de cultivos sino diferentes instrumentos, como una autoclave o una incubadora. Estos factores hacen que el costo unitario por litro de estas pruebas sea de S/. 0.30 por litro que es menor que el MALDI-TOF ya que la implementación del laboratorio microbiología tradicional es menor.

En el caso del QC por MALDI-TOF la principal contribución en el costo del análisis es por la inversión inicial del instrumento, a pesar de que la mano de obra, tiempo de análisis y reactivos es bajo, ya que el costo unitario de análisis de S/ 0.75 por litro es mayor que el de la Microbiología. Este análisis genera una pérdida de S/. -10,452.29

con respecto a la Microbiología Tradicional.

Teniendo en cuenta la relación costo/efectividad, el PCR es la metodología que posee la menor ratio costo efectividad, es decir, el costo es bajo y es muy efectiva. El principal factor que afecta el costo del análisis es la amortización del equipo. El costo de los insumos para la PCR es de \$30 (de acuerdo a la literatura), pero se reduce si se realiza por la cervecería ya que el kit de PCR cuesta \$481.22 para 24 test, (\$20.70) ya que en el caso del tercero, solo se analiza una muestra (test) por corrida, por lo que el costo unitario de la prueba es de S/. 0.30 por litro producido. Este costo puede reducirse más si se emplean los kits de primers de Sigma Aldrich que cuestan \$14 (S/.\$53.80). El margen de contribución anual es de S/. 9,038.69, comparado con la Microbiología Tradicional, considerado 48 horas de enriquecimiento, que pueden reducirse a 2 horas si se evita este paso en cierto tipo de muestras.

El servicio de secuenciamiento + PCR es una propuesta académica y no es realizado actualmente por el mercado. En este caso, se evalúa que el análisis sería realizados por la cervecería. El costo unitario del análisis es de S/. 0.83 por litro, siendo la instrumentación y los insumos los principales contribuyentes al costo del análisis. El margen anual es una pérdida de S/. -13,634.49 con respecto a la microbiología tradicional

El análisis de los Costos/Eficacias por considerando que la cervecería realiza los análisis, se obtiene que:

- 1. PCR**
- 2. MALDI-TOF**
- 3. Microbiología Tradicional (basada en medios de cultivo)**
- 4. Secuenciamiento de DNA+PCR**

Al analizar los costos unitarios de producción y el costo-beneficio de evitar que se pierda cerveza por la contaminación microbiana, se obtiene:

1. **PCR**
2. **Microbiología tradicional basada en medios de cultivo**
3. **MS-MALDI TOF**
4. **Secuenciamiento de DNA-PCR**

Los costos unitarios de los análisis Microbiológicos son de PEN 0.3- 0.83 lo que representa 3% a 10 % del margen bruto unitario, lo cual puede ser significativo si el volumen de producción es bajo. Sin embargo, si se compara con la pérdida por contaminación de un lote de 1000 l valorado en PEN 5,000 (1000 x PEN/l 5.00) se evidencia la magnitud de no realizar el Control de Calidad Microbiológico en una cervecería artesanal.

Al elegir la metodología más conveniente para una micro cervecería, se considera el análisis costo/efectividad y el costo de producción. El resultado indica que PCR es el análisis más conveniente por la micro cervecería, seguido por el MALDI-TOF, la microbiología tradicional y finalmente el secuenciamiento de DNA-PCR.

La selección de los métodos rápidos o “high throughput” de Control de Calidad Microbiológico considerando factores biológicos

El uso de metodologías proteómicas o moleculares para la detección e identificación de los microorganismos son más rápidos, tardando menos de tres días (considerando dos días de cultivo de para el enriquecimiento de la muestra y horas de análisis por el instrumento) en vez de 5-14 días de la microbiología tradicional basada en medios de cultivos. El análisis genera un período de “cuarentena”, en el cual la producción debe esperar hasta

los resultados que son de 5-14 días (que incluyen pruebas bioquímicas que aumentan la complejidad del análisis), si consideramos el análisis de un tanque o línea de tubería recientemente sanitizado para confirmar su correcto proceso y de esta manera prevenir que la cerveza se contamine, afectando la productividad. Estos análisis generalmente son *de facto*, es decir, reportan la contaminación presente, mas no permite prevenir en un ambiente de producción continua.

Las metodologías investigadas poseen características que las hace que unas sean más efectivas que otras. La microbiología tradicional, que ha logrado identificar numerosas especies de microorganismos que deterioran la cerveza tiene dificultad en identificar bacterias ácido lácticas debido a la existencia de genes hor A, hor B y Hor C que proveen resistencia al lúpulo y porque algunas especies entran en estados Viabiles Putativas No cultivables (VPNC) (*Lactobacillus acidotolerans*, *Lactobacillus lidneri*, *Lactobacillus plantarum*) (38) y especies de *Lactobacillus* sp. que forman biofilms (38) generando falsos negativos, a pesar de la introducción de medios de cultivos avanzados como el ABM (36) (15). Este tipo de bacterias se detectan e identifican mediante MALDI-TOF, PCR (RT-PCR) y Secuenciamiento de DNA (identificación de especies y variantes).

Los métodos moleculares rápidos pueden detectar microorganismos que deterioran cerveza como bacterias, hongos y levaduras descritos previamente. El PCR permite identificar las especies de que deterioran cerveza, pero depende del diseño de los kits de primers; en el caso de Microbiologique, el kit detecta bacterias y levaduras salvajes o el kit de Quigen para *Fusarium*. Una debilidad del PCR es que no diferencia macroorganismos vivos de los muertos. El MALDI-TOF también es empleado para detectar no sólo el hongo filiforme que produce micotoxinas sino la micotoxina en la

cebada o malta (37), lo que muestra una mayor capacidad y flexibilidad de la tecnología del análisis comparado con las metodologías moleculares. El secuenciamiento de DNA-PCR es similar al PCR pero permite identificar variedades de microorganismos y realizar análisis filogenéticos. (39) (2) En la práctica, es necesario identificar el tipo de contaminante hasta la especie, ya que no todos las bacterias ácido lácticas deterioran la cerveza y estos métodos son eficaces.

Impactos ambientales por las metodologías

Los efectos ambientales por las metodologías se reportan por las hojas de MSDS

| MALDI-TOF | MSDS Fischer Scientific, Sigma Aldich |
|--|---|
| MALDI-TOF Matrix Solution - alpha-CHC Matrix | Tóxico: “Evite la dispersión del material derramado y la escorrentía y el contacto con el suelo, las vías fluviales, los desagües y las alcantarillas. Informar a las autoridades pertinentes si el producto ha causado contaminación ambiental (alcantarillas, cursos de agua, suelo o aire)” |
| trifluoroacetic acid (TFA) | Posee efectos adversos a la vida acuática. |
| Acetonitrile (CAN) 50% | Posee toxicidad en peces: Ensayo dinámico CL50 - Pimephales promelas (Piscardo de cabeza gorda) - 1.640 mg/l - 96 h Observaciones: (ECHA) 70% biodegradable |

En el caso del MALDI-TOF, los reactivos deben eliminarse considerándose como compuestos tóxicos.

| | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| PCR | MSDS PIKA Weihenstephan |
| 4e Detection Kit™ B (primers) | No se considera tóxico |

El PCR no genera residuos tóxicos, pero si genera plásticos que pueden lixiviar compuestos tóxicos como BPA, en rellenos sanitarios o generarlos al aire al ser quemados.

| | |
|---------------------------|--|
| Microbiología tradicional | MSDS Ross Scientific. Döhler |
| MRS Agar | No se considera tóxico. Se debe autoclavar para esterilizar el medio |
| NBB | No se considera tóxico. Se debe autoclavar para esterilizar el medio |

Se emplea energía para autoclavar los medios de cultivo y ser esterilizados. Los agares son sólidos que deben ser eliminados como residuos sólidos, afectando los rellenos sanitarios. Los medios líquidos contaminan los efluentes industriales aumentando los sólidos, la demanda bioquímica de oxígeno, aumentando la eutroficación.

Importancia empresarial de Control de Calidad Microbiológico (QCM) para las cervecerías artesanales e industriales

En el Perú, no la gran mayoría de las 160 cervecerías artesanales no realizan control de calidad microbiológico de sus procesos. En los Estados Unidos, se reporta una tendencia similar ya que, de las 7000 cervecerías artesanales, alrededor del 10% realizan análisis de Control de Calidad Microbiológico (QCM) empleando instrumentos debido a los costos de operación, aunque algunos tercerizan el servicio (3). En las cervecerías artesanales, se crean los diferentes estilos de cervezas cuyos perfiles tienden a la disminución del porcentaje de alcohol, la reducción de lúpulo, aumento de pH e incluso se crean cervezas sin alcohol. Estos factores, que normalmente reducen la proliferación de los microorganismos que deterioran la cerveza, habiéndose reportado un incremento en el de especies que deterioran la cerveza, e incluso bacterias patógenas a largo de la última década (3) (40). Esto hace que las cervezas artesanales sean más propensas a la contaminación microbiológica y su pérdida económica (un lote puede representar 2.5% de a producción anual en una cervecería artesanal) por lo que la detección, el QCM es necesario en las Cervecerías artesanales.

La detección rápida de microorganismos que deterioran la cerveza es de gran importancia ya una vez que se contamina la cerveza en proceso, el lote estará comprometido y deberá de ser separado para determinar cambios fisicoquímicos y organolépticos e incluso desechado, generando pérdida como merma (38). Los cambios fisicoquímicos y organolépticos debido a la contaminación microbiana en los lotes de cerveza generalmente son eliminados para no comprometer la calidad del producto e incluso la salud (debido a la presencia de micotoxinas) la cual cambia la perspectiva del cliente (39). Luego, el sistema debe ser sanitizado y analizado nuevamente por Control de Calidad, causando retrabajo. En la toma de decisión sobre el lote comprometido, es necesaria la

identificación de la especie debido a que no todos los microorganismos que crecen en cerveza la deterioran además de la concentración de la contaminación (Q-RT-PCR).

El muestro de control de calidad de se realiza en tanques lavados, agua de enjuague, mangueras, superficies de llenadoras, etc. para determinar si el CIP (Clean In Place) fue correcto y de esta manera evitar la contaminación de la cerveza en proceso. Si los análisis son rápidos, se puede determinar que el proceso de CIP fue adecuado y se evitaría la contaminación de cerveza. De lo contrario, al contaminarse la cerveza, el lote está comprometido. (41)

12. CONCLUSIONES

- a. Se han identificado cuatro tecnologías que se emplean para la detección de microorganismos que deterioran cerveza las que pueden ser empleada en cervecería artesanales: Microbiología basada en medios de cultivo, Proteómica (MS -MALDI TOF), Métodos moleculares (PCR y Secuenciamiento de DNA).
- b. El análisis costo/efectividad de las metodologías indica el costo de una tecnología mejore la eficacia en la detección de microorganismos que deterioran la cerveza. Si la micro cervecería realiza el análisis se obtiene el siguiente orden

- 1. PCR**

- 2. MALDI-TOF**

- 3. Microbiología Tradicional (basada en medios de cultivo)**

- 4. Secuenciamiento de DNA+PCR**

La metodología PCR, comparada con las otras tecnologías, es la que posee mejor índice Costo/efectividad tanto realizada por terceros o por la misma cervecería, por lo que se resulta ser la metodología más efectiva. Esta metodología interrumpe la producción entre

1 hora a 49 horas para generar resultados afectando poco la productividad. La PCR puede ser empleado para la identificación de hongos, levaduras, bacterias mostrando que contaminan cerveza, dependiendo de los primers.

La PCR es un método que genera un bajo impacto ambiental comparado con los otros métodos.

El costo de no emplear Control de Calidad Microbiológico en Cervecería Artesanal puede causar la pérdida de un lote de cerveza, de PEN 5000

La industria artesanal necesita emplear estrategias de Control de Calidad empleando estos métodos debido a que, debido al cambio de estilo de cerveza, estas son más propensas a contaminarse y sufrir de la pérdida debido a los altos costos de producción, bajos márgenes de ganancia y volumen producido.

13. RECOMENDACIONES

Se debe evaluar los nuevos métodos basados en inmunología los que deben mostrar que tienen menos falsos negativos (39)

Se debe continuar con una Evaluación de Proyectos de Inversión para evaluar la factibilidad de realizar el proyecto considerando los ingresos y egresos así como el financiamiento de la instrumentación en un tiempo determinado.

La cervecería artesanal, al ser más propensa de contaminación de microorganismos y toxinas, se recomienda determinar Puntos Críticos de Control (HACCP) dentro de un esquema de ISO 9001 y así determinar el número de análisis por realizar. (41)

Se debe considerar métodos que no requieren cultivo, mediante ultra presión.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anderson HE, Santos IC, Hildenbrand ZL, Schug KA. A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control. *Analytica Chimica Acta*. 2019; 1085.
2. Schurr B, Hahne H, Kuster B, Behr J, Vogel R. Molecular mechanisms behind the antimicrobial activity of hop iso- α -acids in *Lactobacillus brevis*. *Food Microbiology*. 2015;(46).
3. Hailee E. Anderson ICSZLHKAS. A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control. *Analytica Chimica Acta*. 2019; 1085.
4. Suzuki. Emergence of New Spoilage Microorganisms. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2020.
5. Suzuki K. Emergence of New Spoilage Microorganisms in the Brewing Industry and Development of Microbiological Quality Control Methods to Cope with This Phenomenon: A Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2020; 70(4).
6. Kunimune T, Shellhammer T. Foam-Stabilizing Effects And Cling Formation Patterns Of Iso-Alpha-Acids And Reduced Iso-Alpha-Acids In Lager Beer..*J Agric Food Chemistry*. 2008; 56.
7. Bevilacqua A, Corbo M, Sinigaglia M. The Microbiological Quality of Food: Foodborne Spoilers. En.; 2016. p. 247-248.
8. Garcia-Garcia J, Damas-Buenrostro L, Cabada-Amaya JC, Elias-Santos M, Pereyra-Alf3rez B. *Pediococcus damnosus* strains isolated from a brewery environment carry the horA gene. *Journal Institute Brewing*. 2017; 123.
9. Rodr3guez-Saavedra M, Llano DGd, Moreno-Arribas MV. Beer spoilage lactic acid bacteria from craft brewery microbiota. *Food Research International*. 2020; 138.
- 10 M. Latorre MCBVdGea. Contaminantes microbianos en cervezas artesanales embotelladas de la Patagonia andina argentina. *Revista Argentina de Microbiolog3a*. 2022.
- 11 Bokulich , Bamforth. The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. ; 77(22).
- 12 Villacreces S, Blanco CA, Caballero I. Developments and characteristics of craft beer production processes. *Food Bioscience*. 2022; 45.

13. Ciont C, Epuran , Kerezsi D, Coldea E, Mudura E, Pasqualone A, et al. Beer Safety: New Challenges and Future Trends within Craft and Large-Scale Production. *Foods*. 2022; 11(2693).
14. Suiker IM, Wösten HA. Spoilage yeasts in beer and beer products. *Current Opinion in Food Science*. 2022; 44.
15. PromPeru.. PromPeru. La Cerveza Artesanal en el Perú. [Online]; 2018. Acceso 26 de Octubre de 2022. Disponible en: <https://peru.info/es-pe/comercio-exterior/noticias/7/29/la-cerveza-artesanal-en-el-peru#:~:text=Cifras%20en%20el%20Per%C3%BA,y%2020%20soles%20por%20litro>.
16. García M. Gestión: Mercado de cerveza artesanal espera alcanzar producción récord este año. [Online]; 2022. Acceso 26 de Octubre de 2022. Disponible en: <https://gestion.pe/economia/empresas/mercado-de-cerveza-artesanal-espera-alcanzar-produccion-record-este-ano-noticia/>.
17. López E. Cervezas Artesanales Cerrarían el 2021 con un 0,2% de participación en el mercado. [Online]; 2022. Acceso 26 de Octubre de 2022.
18. Turvey ME, Weiland F, Keller EJ, Hoffmann P. The changing face of microbial quality control practices in the brewing industry: Introducing mass spectrometry proteomic fingerprinting for microbial identification. *J. Inst. Brew.* 2017; 123.
19. Obi C. Brewery Contaminants, Challenges And Remedies-A Review. *The Journal Of Microbiology*. 2018; 31.
20. Taniwaki M, Pitt J, Copetti M, Teixeira A, Iamanaka B. Understanding Mycotoxin Contamination Across the Food Chain in Brazil: Challenges and Opportunities. *Toxins*. 2019; 11(411).
21. Cerveza MdCNPBDpl. NBB® - DÖHLER. [Online]; 2022. Acceso 26 de Octubre de 2022. Disponible en: <https://www.doehler.com/es/nuestro-portafolio/soluciones-integrales/soluciones-en-servicios/medios-de-cultivo-para-la-deteccion>.
22. Kurniawan YN SYSHMTSK. Applications of the Third-Generation DNA Sequencing Technology to the Detection of Hop Tolerance Genes and Discrimination of *Saccharomyces* Yeast Strains. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2022; 80(02).
23. López E. La Cámara. [Online]; 2021. Acceso 26 de Octubre de 2022. Disponible en: <https://lacamara.pe/cervezas-artesanales-cerrarian-el-2021-con-un-02-de-participacion-en-el-mercado/>.

- 24 Bretrager , Becker , Gast M. Screening of Mycotoxigenic Fungi in Barley and Barley Malt (*Hordeum vulgare* L.) Using Real-Time PCR—A Comparison between Molecular Diagnostic and Culture Technique. *Foods*. 2022; 11(8).
- 25 Rausch AK, Brockmeyer R, Schwerdtle T. Development and validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry multi-method for the determination of 41 free and modified mycotoxins in beer. *Food Chemistry*. 2021; 338.
- 26 Cottrell MT. Fingerprinting *Saccharomyces cerevisiae* Strains Using Next Generation Sequencing of PCR Amplicons Generated from Delta Elements. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2022.
- 27 Kubizniakov P, Kyselov , Brozov , Hanzalikov , Matoulkov . The role of acetic acid bacteria in brewing and their detection in operation. *Research Institute of Brewing and Malting*. 2021; 67.
- 28 Jevons AL, Quain D. Identification of spoilage microflora in draught beer using culture-dependent methods. *Journal of Applied Microbiology*. 2022; 133(6).
- 29 Garca Lpez , Roche , Rodrguez. CONTAMINANT MICROBIOTA IN CRAFT BEERS. *J Microbiol Biotech Food Sci*. 2020; 9(6).
- 30 ME T, F W, J M, Sterenberg N H,P. Identification of beer spoilage microorganisms using the MALDI Biotyper platform. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017; 100(6).
- 31 Suzuki K, Shinohara Y, Kurniawan Y. Recent Progress of Microbiological Quality Control Methods in Unpasteurized Beer Production. *Journal of The Japanese Society for Food Science and Technology*. 2020; 67(11).
- 32 Akimowicz , Bucka-Kolendo. MALDI-TOF MS – application in food microbiology. *Acta Biochimica Polonica*. 2020; 67(3).
- 33 Gorre E, Muste C, Owens G. Introducing a Cell-Free Approach for the Identification of Brewing Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Strains Using MALDI-TOF MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2018; 29(11).
- 34 Wieme AD, Spitaels F, Aerts M, Bruyne KD, Landschoot AV, Vandamme P. Identification of beer-spoilage bacteria using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *International Journal of Food Microbiology*. 2014; 185.
- 35 Schneiderbanger J, Grammer M, Jacob F, Hutzler. Statistical evaluation of beer spoilage bacteria by real-time PCR analyses from 2010 to 2016. *J Inst Brew*. 2018; 124(2).

- 36 Xu Z LYMYPRCJSTea. Spoilage Lactic Acid Bacteria in the Brewing Industry..J
 . Microbiol Biotechnoly. 2020; 30(3).
- 37 YN K, Y S, N T, H S, T M, K. S. Applications of the Third-Generation DNA
 . Sequencing Technology to the Detection of Hop Tolerance Genes and
 Discrimination of Saccharomyces Yeast Strains. Journal of the American Society of
 Brewing Chemists. 2021; 80(2).
- 38 YN K, Y S, N T, H S, T M, K S. Kurniawan YN, Shinohara Y, Takesue N, Sakai H,
 . Magarifuchi T, Suzuki K. Development of a Rapid and Accurate Nanopore-based
 Sequencing Platform for on-Field Identification of Beer-Spoilage Bacteria in the
 Breweries.. Journal of the American Society of Brewing Chemists. 2021; 79(3).
- 39 Srivathsan A LLKKHEKSWJea. ONTbarcoder and MinION barcodes aid
 . biodiversity discovery and identification by everyone, for everyone. BMC Biol.
 2021; 19(1).
- 40 Maria Antònia Parera. Colección Ivàlua de guías prácticas sobre evaluación de
 . políticas públicas Cataluña: Ivàlua; 2009.
- 41 Loza C, Castillo-Portilla C, Rojas , Huayanay. PRINCIPIOS BÁSICOS Y
 . ALCANCES METODOLÓGICOS DE LAS. Rev Peru Med Exp Salud Publica.
 2011; 28(3).
- 42 Rodríguez-Saavedra M, Pérez-Revelo K, Valero A, Moreno-Arribas MV, González
 . de Llano D. A Binary Logistic Regression Model as a Tool to Predict Craft Beer
 Susceptibility to Microbial Spoilage. Foods. 2021; 10(1926).
- 43 Costa J, Sierra-Garcia IN, Cunha A. A Culture-Independent Comparison of
 . Microbial Communities of Two Maturing Craft Beers Styles. Microbiology and
 Biotechnology Letters. 2022; 50(3).
- 44 LauterbachA UJR. MALDI-TOF MS typing enables the classification of brewing
 . yeasts of the genus Saccharomyces to major beer styles. PLoS ONE. 2017; 12(8).
- 45 Condina M&DB&RBS&MJ&EWM&HP. Rapid separation and identification of
 . beer spoilage bacteria by inertial microfluidics and MALDI-TOF mass
 spectrometry. Lab on a Chip. 2019.
- 46 Kurniawan YN, Shinohara Y, Takesue N, Sakai H, Magarifuchi T, Suzuki K.
 . Development of a Rapid and Accurate Nanopore-based Sequencing Platform for on-
 Field Identification of Beer-Spoilage Bacteria in the Breweries. JOURNAL OF THE
 AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS. 2021; 73(3).
- 47 Sohlberg E STJR. Fungal diversity on brewery filling hall surfaces and quality
 . control samples. Yeast. 2022; 39(1).

- 48 M S, K S, Y M. Development of Culture-Independent Detection Method for Beer Spoilage Lactic Acid Bacteria. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. 2021.
- 49 Schneiderbanger , Grammer M, Jacob , Hutzler. Statistical evaluation of beer spoilage bacteria by real-time PCR analyses from 2010 to 2016. *Journal of the Institute of Brewing*. 2018; 124(2).
- 50 Jespersen L, M J. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *International Journal of Food Microbiology*. 1996; 33.
- 51 Parijs I,HP. Competitive inter-species interactions underlie the increased antimicrobial tolerance in multispecies brewery biofilm. *ISME*. 2018.
- 52 Xu Z, Luo Y, Bai Y,MPJCTSC, Chen L, Liang Y, Jianyu Su KW, et al. Spoilage Lactic Acid Bacteria in the Brewing Industry. *Spoilage Lactic Acid Bacteria in the Brewing Industry*. 2020; 30(7).
- 53 Wang Z,CY&DY&PM&CT&XJ&ZR&ZJ&DY. Formation of viable, but putatively non-culturable (VPNC) cells of beer-spoilage lactobacilli growing in biofilms. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 2020; 133(12).
- 54 Hleba L, Hlebova M, Kovacik A, Petrova J, Maskova Z, Cubon J, et al. Use of MALDI-TOF MS to Discriminate between Aflatoxin B1-Producing and Non-Producing Strains of *Aspergillus flavus*. *Molecules*. 2022; 27(22).
- 55 Turvey ME, Weiland F, Keller EJ, Hoffmann P. .
- 56 Latorre , Bruzone MC, de Garcia , Libkind D. Contaminantes microbianos en cervezas artesanales embotelladas de la Patagonia andina argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. 2022.
- 57 Belén Díaz A, Durán-Guerrero , Lasanta , Castro R. From the Raw Materials to the Bottled Product: Influence of the Entire Production Process on the Organoleptic Profile of Industrial Beer. *Foods*. 2022; 11(3215).
- 58 Mallett J, Stuart , Quain D. Draught beer hygiene: a forcing test to assess quality. *J. Inst. Brew*. 2018; 124.
- 59 Costa J SGICA. A Culture-Independent Comparison of Microbial Communities of Two Maturing Craft Beers Styles. *Microbiol. Biotechnol. Lett*. 2022; 50(404-413).
- 60 Shinohara Y,KYN,SH,MT,&SK. Nanopore based sequencing enables easy and accurate identification of yeasts in breweries. *Journal of the Institute of Brewing*. 2021; 127(2).

- 61 Stamatelopoulou , Agriopoulou S, Varzakas T. Advances in Occurrence, Importance, and Mycotoxin Control Strategies: Prevention and Detoxification in Foods. *Foods*. 2020; 9(2).
- 62 Kobayashi , Kudo M, Izumi N, Kaneko. Cost-effectiveness analysis of lenvatinib treatment for patients with unresectable hepatocellular carcinoma (uHCC) compared with sorafenib in Japan. *J Gastroenterology*. 2019; 57.
- 63 Figueroa-Lara , González-Block MÁ. Costo-efectividad de una alternativa para la prestación de servicios de atención primaria en salud para los beneficiarios del Seguro Popular de México. *Salud Pública de México*. 2016.
- 64 Bogavac-Stanojevic , Jelic-Ivanovic I. The Cost-effective Laboratory: Implementation of Economic Evaluation of Laboratory Testing. *J Med Biochem*. 2017; 36(3).
- 65 Shi F, He Z, Su H, Wang L, Han S. Economic evaluation of tislelizumab versus chemotherapy as second-line treatment for advanced or metastatic esophageal squamous cell carcinoma in China. *Frontiers in Pharmacology*. 2022; 13(961347).
- 66 Pliakos EE, Andreatos , Shehadeh F, Ziakas D, Mylonakis. The Cost-Effectiveness of Rapid Diagnostic Testing for the Diagnosis of Bloodstream Infections with or without Antimicrobial Stewardship. *Clinical Microbiology Reviews*. 2018; 31(3).
- 67 Schönling J, Pick E, Peter U, Britton S. *BrewingScience*. 2019; 72.
- 68 Manzano M, IL, Vendrames M, CF, CG, Buiatti S. Craft Beer Microflora Identification Before and After a Cleaning Process. *Journal of the Institute of Brewing*. 2011; 117.
- 69 García M. Gestión. [Online]; 2022. Acceso 16 de Octubre de 2022. Disponible en: <https://gestion.pe/economia/empresas/mercado-de-cerveza-artesanal-espera-alcanzar-produccion-record-este-ano-noticia/>.
- 70 PromPeru. PromPeru. [Online]; 2018. Acceso 26 de Octubre de 2022. Disponible en: <https://peru.info/es-pe/comercio-exterior/noticias/7/29/la-cerveza-artesanal-en-el-peru#:~:text=Cifras%20en%20el%20Per%C3%BA,y%2020%20soles%20por%20litro.>