

DICIEMBRE 2022

INFORME

FINAL

“Identidad Regional y Agregado de Valor para la
Cerveza y Whisky Artesanal Andino
Patagónicos”

CONTRATO DE OBRA Ex-2022-00060469- -CFI-GES#DCS

Dra. Mailén Latorre

Introducción	3
1. Diagnóstico del sector productivo	5
1.1. Capacidad productiva	5
1.2. Fraccionamiento de la cerveza y pasteurización de productos.....	6
1.3. Información relevante al uso y manejo de levaduras cerveceras	7
1.4. Control de Calidad	8
1.5. Productos de limpieza y sanitización	9
2. Análisis de calidad de cerveza (Línea de base)	9
2.1. Métodos de análisis.....	10
2.2. Resultados	12
2.3. Resumen de resultados “línea de base”	17
3. Asesorías técnicas en fábricas de cerveza	18
3.1. Evaluación de puntos débiles en el proceso de elaboración.....	18
3.2. Test de mosto forzado	20
3.3. Mediciones de oxígeno	25
3.4. Manejo de levaduras cerveceras	26
4. Acuerdos de transferencia de material.....	28
5. Conclusiones.....	29
6. Bibliografía	30
ANEXO I.....	33
ANEXO II.....	34

La región Andina de la Patagonia tiene un rol muy importante en materia de antecedentes cerveceros y ha experimentado un continuo desarrollo en los últimos 20 años. Este crecimiento significa un gran impacto en las bioeconomías regionales ya que genera múltiples puestos de trabajo, ayuda a diversificar las matrices productivas, e impacta positivamente en otros sectores económicos como servicios, metalúrgica, transporte, gastronomía, entre otros (Colino et al., 2017; Kaderian, 2018).

El continuo crecimiento en el mercado de la cerveza artesanal, y el aumento del interés y las exigencias de los consumidores, han orientado los esfuerzos del sector hacia la producción de cervezas diferenciales e innovadoras. En este punto, las levaduras no convencionales, distintas de las levaduras cerveceras tradicionales *S. cerevisiae* (ale) y *S. pastorianus* (lager), han cobrado gran protagonismo como herramientas para el desarrollo de nuevos productos. De gran interés resulta la especie criotolerante *S. eubayanus*, aislada por primera vez en la Patagonia Argentina e identificada como uno de los parentales de la especie híbrida *S. pastorianus* (levadura lager). Desde su descubrimiento, *S. eubayanus* generó un gran interés en el sector científico-tecnológico para el estudio de su potencial aplicación en la industria cervecera ya que presenta una oportunidad única de innovación a nivel productivo junto con una historia única que puede ser aprovechada para diseñar una estrategia de comunicación potente para los productos elaborados con *S. eubayanus* y otras levaduras nativas.

El uso de levaduras nativas es una forma natural de introducir diversidad en el sector cervecero y, existe una gran diversidad de especies con potencial para la producción de cervezas diferenciales. Sin embargo, dado que estas levaduras no se encuentran adaptadas al ambiente fermentativo (no son especies domesticadas), sus características y capacidades técnicas para su aplicación deben evaluarse cuidadosamente.

Para que el perfil organoléptico generado por este tipo de levaduras pueda ser apreciado en la cerveza final, es de suma importancia que las plantas de producción de cerveza estén libres de contaminaciones microbianas. En este sentido, la contaminación microbiana ha demostrado ser uno de los factores limitantes más importantes que afecta la calidad de la cerveza en general y en las cervezas artesanales en particular (Back, 2005; Giovenzana et al., 2014; Manzano et al., 2011). Sin embargo, las microcervecerías argentinas raramente establecen criterios microbiológicos y políticas que garanticen la calidad de sus productos. Un estudio ha comprobado que las contaminaciones microbianas en cervezas de la Patagonia Andina son una problemática que afecta a las cervezas de nuestra región, ya que más del 60 % de las cervezas mostraron evidencias de contaminación (Latorre et al., 2022).

Aunque la cerveza es considerada una bebida de bajo riesgo microbiológico ya que presenta condiciones desfavorables para la mayoría de los microorganismos: contiene entre 0,5 a 10 % v/v de etanol, sustancias antibacterianas (17 a 55 ppm de iso- α -ácidos), alto contenido de dióxido de carbono (0,5 % p/v), bajo pH (entre 4,7 y 3,8), bajo contenido de oxígeno (menos de 0,3 ppm) y es pobre en nutrientes (Jespersen & Jakobsen, 1996; Suzuki, 2015), algunos microorganismos logran crecer y afectar su calidad. Los microorganismos que logran atravesar las barreras intrínsecas de la cerveza, son considerados contaminantes, ya que pueden modificar las propiedades sensoriales y fisicoquímicas de la cerveza, produciendo *off-flavors*, sedimentos, turbidez, exceso de gas, disminución del pH y de la densidad, afectando de manera negativa su calidad.

Afortunadamente, los registros de contaminantes más problemáticos se reducen a relativamente pocas especies de bacterias y levaduras capaces de tolerar y propagarse en las condiciones desfavorables de la cerveza. El 90 % de las contaminaciones reportadas son causadas por bacterias ácido lácticas de los géneros, *Levilactobacillus* (antes llamados *Lactobacillus*) y *Pediococcus* (Moretti, 2013; Schneiderbanger et al., 2018; Suzuki, 2020) siendo *Levilactobacillus brevis* la especie de mayor incidencia (Schneiderbanger, 2019; Suzuki, 2015). La contaminación con bacterias Gram negativas como *Acetobacter* y *Gluconobacter* (acetobacterias) también ha sido reportada, aunque en los últimos años la incidencia de estas bacterias fue desplazada por bacterias anaerobias estrictas como *Megasphaera* y *Pectinatus* (Haikara & Helander, 2006; Jespersen & Jakobsen, 1996). A su vez, se ha observado que algunos géneros de la familia *Enterobacteriaceae* como *Obesumbacterium*, *Hafnia*, *Klebsiella* y *Citrobacter* son capaces de alterar el mosto y la cerveza en estadios tempranos de la fermentación (Paradh, 2015; Priest, 2006).

Las cervecerías han demostrado que las levaduras pueden impartir una gran variedad de aromas y sabores que pueden promover la diferenciación productiva, y los productores de whisky están cada vez más interesados en levaduras no convencionales para obtener whiskies innovadores. En la producción de whisky se añade levadura al mosto elaborado a partir de cebada malteada (como el de la cerveza) para iniciar el proceso de fermentación y convertir los azúcares en alcohol. El resultado de la fermentación es un líquido similar a la cerveza que tiene una graduación de alcohol de aproximadamente el 8 % y que posteriormente es destilado 2 o más veces para concentrar el alcohol. Por esta razón, la estabilidad microbiológica del fermentado no comparte los estándares de calidad que se usan en cerveza, sino que su calidad está definida principalmente por el grano utilizado, la destilación (el tipo de alambique y el número de destilaciones), el agua y finalmente, el tiempo y tipo de barrica en el que envejece.

En este informe, se incluyen los resultados de las actividades detalladas en el Plan de Tareas. Dichos resultados incluyen el diagnóstico del sector productivo y un primer análisis de calidad de las cervezas considerado "línea de base", es decir que hace referencia a la calidad de la cerveza antes de la asesoría técnica, asesorías técnicas en

fábrica para solucionar problemas detectados en la línea de base, asesoramiento a productores en cuanto al uso de levaduras nativas e inicio del trámite legal para el uso de la levadura EUBY.

1. Diagnóstico del sector productivo

En primera instancia, se realizó una encuesta *online* a los cerveceros a fin de obtener un relevamiento y caracterización de los emprendimientos productivos de las cervecerías involucradas. Seis de las cervecerías relevadas tienen sus fábricas en la Comarca Andina, en las localidades de El Hoyo (1), Lago Puelo (2), Paraje Entre Ríos (1) Epuén (2). Tres cervecerías se ubican en la ciudad de Esquel y 1 corresponde al ejido de Trevelin. La encuesta realizada se puede ver en el Anexo 1.

1.1. Capacidad productiva

Las cervecerías encuestadas presentaron diversidad en los tamaños de bach, ya que estos variaron entre 175 L y 2.000 L, siendo mas comunes los bach de producción con volúmenes entre 450 L y 1.000 L. En cuanto a la producción anual en litros de cerveza (referida al año 2021), las fábricas registraron una producción que varió entre 25.000 y 120.000 L anuales (Tabla 1). Los estilos de cerveza realizados por cada cervecería son diversos, aunque es notable que las cervezas lupuladas (IPAs), predominan en los estilos elaborados en todas las fábricas.

Tabla 1. Capacidad productiva de 10 fábricas de cerveza del noroeste de Chubut y principales estilos que se producen.

Cervecería (Responsable)	Localidad	Producción anual (L/año)	Tamaño de Bach (L)	Principales estilos
La 40 (Lencina Nicolas)	Epuén	No informa	450	Session IPA, NEIPA, Red IPA, Belgian dark y Pilsen
Chaura (Francisco Huisman)	El Hoyo	36.000	700	IPA Argenta, IPA Americana Session IPA, Blonde y Barley Wine

Radal (Diego Mayorca)	Lago Puelo	33.500	1.500	Scottish, IPA Argenta, Blonde, APA, Porter
Arvejas Partidas (Pablo Leo)	Epuayén	120.000	750	Doble IPA, IPA Americana, Pale Ale, Scottish, Red IPA, Pilsen Porter
Origen (Nicolas Nagahama)	Esquel	44.500	175	IPA Americana, Kölsch, Altbier, Irish Ale, Cream Stout
Euthopia (Tomás Bajar)	Trevelín	25.000	250	IPA, Pale Ale , Tripel, FarmHouse, Sour
Esquel (Carlos Miguens)	Esquel	30.000	600	Golden, Session IPA, Amber ale, IPA, Honey
Heiskel (Williams Randal)	Esquel	30.000	1.000	Golden, Scottish, Brown ale, Porter, IPA, IPA citrica
Huemul (Cristian Lignac)	Lago Puelo	40.000	450	IPA, Irish, Stout, Dorada, Frambuesa
El Bolsón (Guillermo Bahlaj)	Paraje Entre Ríos	120.000	2.000	Rubia, IPA de frambuesas, Red Ale, Session IPA

IPA: India Pale Ale; APA: American Pale Ale; NEIPA: New England IPA.

Fuente: elaboración propia.

1.2. Fraccionamiento de la cerveza y pasteurización de productos

Además de acondicionar la cervezas en barriles, el 80 % de las cervecerías (8 de 10) informaron que envasan entre 10 y 30 % de la producción total en formato de botella y/o lata. En la figura 1a puede verse la proporción de cervecerías que eligen el formato de botella y/o de lata para el fraccionamiento de la cerveza. Por su parte solo 3 de las 8 (37 %) cervecerías informó que pasteuriza la cerveza fraccionada (figura 1b).

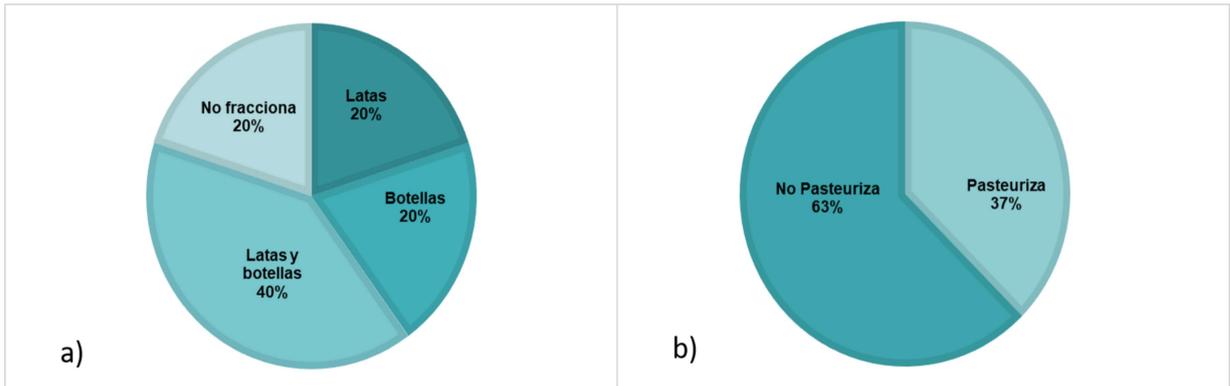


Figura 1. Porcentaje de cervecerías que fraccionan la cerveza en botellas y latas (a) y proporción de cervecerías que realizan prácticas de pasteurización en las cervezas envasadas en formato lata/botella (b).

Fuente: elaboración propia.

1.3. Información relevante al uso y manejo de levaduras cerveceras

Todos los productores relevados utilizan únicamente levaduras en formato seco para sus producciones, siendo las levaduras secas marca Fermentis S-04, US-05 y en tercer lugar la levadura S-33 las levaduras mas utilizadas por las cervecerías (Figura 2). Las tres levaduras mas utilizadas se caracterizan por su versatilidad en la elaboración de múltiples estilos, lo cual facilita el trabajo operativo y la planificación de reutilización de la cepa.

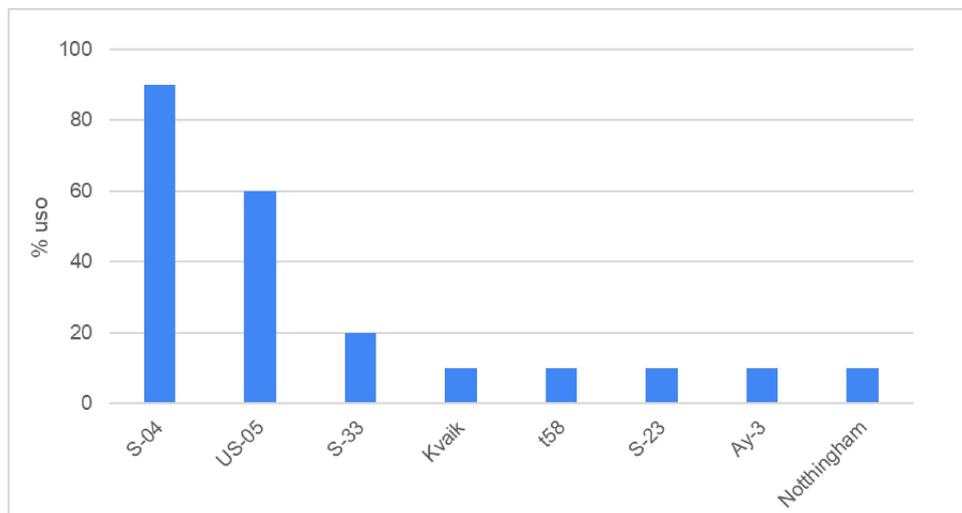


Figura 2. Principales levaduras en formato seco utilizadas por las cervecerías de Chubut.

Fuente: elaboración propia.

Todas las fábricas informaron que reutilizan levadura, aunque en su mayoría, las cervecerías reutilizan de vez en cuando y pocas generaciones (1-3 veces). Solo dos cervecerías (20 %) reutilizan con frecuencia y por mas de 5 generaciones.

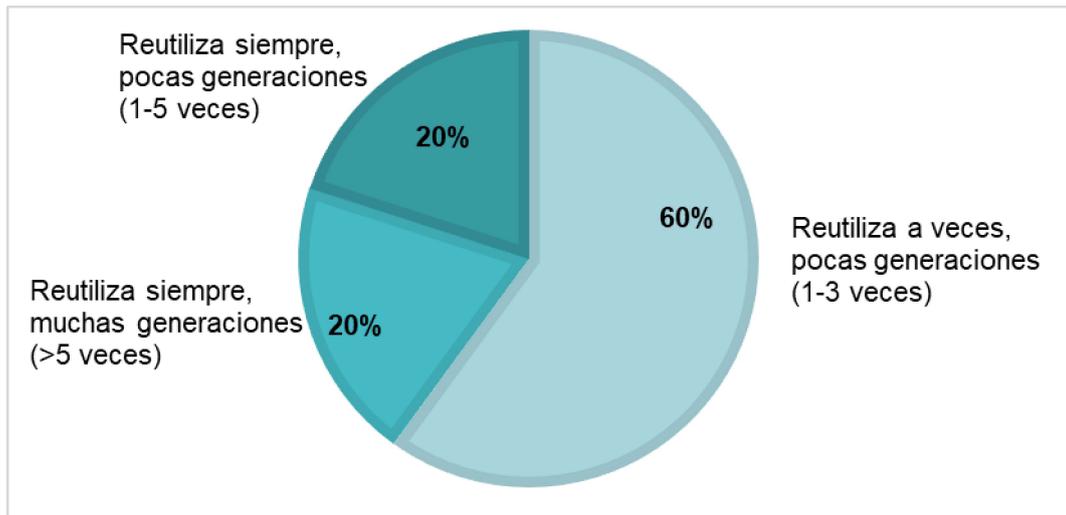


Figura 3. Proporción de cervecerías que reutilizan levaduras para inocular nuevos lotes de cerveza.

Fuente: elaboración propia.

Por otro lado, se pudo confirmar que a pesar de que todas las cervecerías reutilizan levadura aunque sea de vez en cuando, más de la mitad de los cerveceros (6) no utilizan microscopio para realizar el recuento de células para inocular levaduras en la cantidad apropiada, ni evalúan la viabilidad de las levaduras, incluso contando con el equipamiento para llevar a cabo esta práctica.

Además se pudo constatar que en muchos casos (más del 50 %) no se agregan los nutrientes necesarios para el buen desempeño fermentativo de las levaduras reutilizadas. Por ejemplo, se pudo conocer que a pesar de aplicar reutilizaciones, el 70 % de las cervecerías no agregan oxígeno en el mosto. Este nutriente es esencial para la fase de crecimiento y replicación de las levaduras en las primeras horas de la fermentación. Se observó que 40 % no agrega ningún nutriente que aporte zinc, nutriente necesario para tener una fermentación eficiente. Por último se registró que 3 (30 %) cervecerías no utilizan sales de calcio y magnesio, nutrientes involucrados en la floculación (precipitación conjunta) de las levaduras al final de la fermentación.

1.4. Control de Calidad

Todas las cervecerías reportaron medir la densidad de las fermentaciones regularmente, utilizando densímetros o refractómetros, mientras que el 70 % de las fábricas (7 de 10) realiza mediciones de pH.

Por su parte, solo el 30 % (3 fábricas) realiza algún tipo de control de calidad microbiológico en la fábrica (Figura 4).

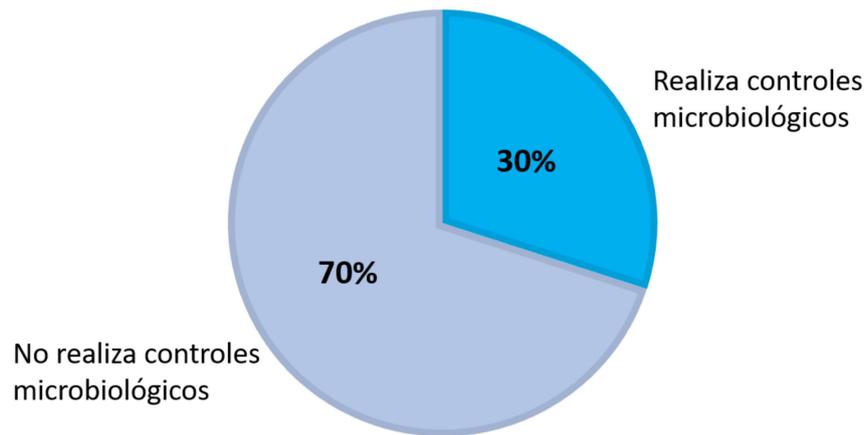


Figura 4. Proporción de cervecerías que aplica algún tipo de control microbiológico.
Fuente: elaboración propia.

Las cervecerías que declararon realizar controles microbiológicos expresaron que realizan el “test de mosto forzado”, procedimiento realizado para validar los procesos de limpieza y sanitización en la zona “caliente” de la fábrica y en fermentadores.

Por último, las 10 cervecerías encuestadas (100 %), confirmaron que no hay personal contratado en la fábrica dedicado a control de calidad (medición de densidad, pH y/o test de mosto forzado), mientras que el 40 % afirmó que el control lo realiza el mismo productor.

1.5. Productos de limpieza y sanitización

Todos los productores declararon que realizan limpieza con detergente alcalino en el equipo de cocción (*Brew house*) de manera manual, y que periódicamente utilizan ácido fosfórico como desincrustante de la “piedra” cervecera (acumulación de minerales). Por su parte los fermentadores además de ser limpiados con detergente alcalino son sanitizados con productos a base de ácido peracético (con una excepción que utiliza un producto a base de ácido fosfórico y ácido dodecilbencenosulfónico). En todos los casos la limpieza y desinfección de fermentadores se realiza utilizando sistemas CIP (*Cleaning in Place*).

2. Análisis de calidad de cerveza (Línea de base)

Se analizaron 8 lotes de cervezas provenientes de 8 cervecerías de Chubut (cada lote se analizó por triplicado). Dos cervecerías (codificadas como #8 y #9) decidieron no formar parte del proyecto luego de la encuesta, por lo cual se continuará con el análisis y transferencia de cultivos iniciadores de la levadura nativa Euby® (*Saccharomyces eubayanus*) en 8 cervecerías. Para contrarrestar esta falta se sumó un análisis molecular

para detectar contaminantes microbianos por PCR en tiempo real. Esta primera etapa (línea de base), se llevó a cabo para conocer la calidad de las cervezas antes de realizar la transferencia de Euby® (*S. eubayanus*). Con tal fin, se realizó un análisis fisicoquímico, un análisis microbiológico utilizando técnicas de cultivo tradicionales, un análisis sensorial y por último un análisis genético de las cervezas para detectar contaminaciones a nivel molecular.

2.1. Métodos de análisis

➤ Análisis Físicoquímico

Se realizaron análisis fisicoquímicos para determinar los siguientes parámetros: IBU's (Unidades de amargor), Color (SRM - *Standar Reference Method*), % de Alcohol, Densidad final y pH.

Para determinar IBU's se empleó la muestra fría sin desgasificar; en cambio para determinar los demás valores, las muestras fueron sometidas a agitación durante 15 minutos para eliminar el gas.

Para la determinación de IBU's y Color de las muestras, se siguieron los protocolos descritos en el *ASBC Methods of analysis (American Society of Brewing Chemists)*: Beer 10A para color y Beer 23A para IBU's.

Para la determinación de % de Alcohol y Densidad final, se empleó el medidor de alcohol y extracto Alex 500 de Antoon Paar siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Para determinar pH se empleó el equipo "Sartorius PR15 Pro Series".

Todos los análisis se realizaron a partir de muestras de 3 latas o botellas (triplicado). En el caso de las mediciones de alcohol y densidad final, a cada muestra se le realizó un duplicado. Todos los datos fueron promediados y se calculó el desvío estándar.

➤ Análisis microbiológico

A partir de muestras de 3 cervezas envasadas (latas/botellas) se le realizaron análisis microbiológicos en medios de cultivos específicos para detección de contaminantes de cerveza (WLD, LCSM y HLP). El Medio diferencial de Wellerstein o WLD es un medio de cultivo selectivo y diferencial, que se utiliza para detectar bacterias contaminantes de cervecería; el Lin's Cupric Sulfate Medium o LCSM es un medio de cultivo para detectar levaduras salvajes; mientras que el Hsu' Lactobacillus-Pediococcus o HLP, se utiliza para detectar *Lactobacillus spp.* y *Pediococcus spp.*

Para el análisis en WLD y LCSM, se extrajo una alícuota de 1 ml de cerveza, la cual se colocó en una placa de Petri y luego se le añadió 15 ml de medio de cultivo fundido y enfriado a 40°C. La placa fue puesta a incubar por 72 hs en estufa; para el primer caso a 30°C y para el segundo, a 25°C.

Para el análisis en HLP, se extrajo 1 ml de cerveza, el cual se colocó en un tubo cónico tipo falcón con tapa a rosca de 15 ml y se llevó hasta volumen final con medio de cultivo fundido y enfriado a 40°C. La muestra fue puesta a incubar durante 72 hs a 25°C.

➤ Análisis sensorial

Para evaluar la presencia de deméritos a nivel sensorial, el panel de Cata perteneciente al grupo Centro de Referencia en Levaduras y Tecnología Cervecera (CRELTEC) perteneciente al IPATEC (CONICET - UNCo) llevó a cabo 2 catas.

En primera instancia, el panel de cata (6-7 panelistas) evaluó las muestras de cervezas terminadas envasadas, se les solicitó que las califiquen como muestra contaminada o no contaminada, según la percepción de atributos relacionados con eventos de contaminación (por ejemplo presencia de acidez láctica o acética y compuestos fenólicos). La segunda cata se centró en detectar la presencia de indicadores sensoriales de contaminación mediante un análisis descriptivo (Sensory Analysis–10, ASBC Methods). El análisis fue realizado por 7 panelistas entrenados, los descriptores fueron evaluados utilizando una escala de 0 (no presente) a 5 (muy intenso). Los descriptores evaluados tanto en aroma como en sabor fueron los siguientes: ésteres, diacetilo, fenólico, acidez láctica, acidez acética, sulfuros y alcohol.

➤ Análisis molecular

A cada muestra de cerveza envasada, se le extrajo una alícuota de 30 ml a la cual se centrifugó a 7085 rpm. Se descartó el sobrenadante y sobre el pellet se realizó una extracción de ADN total utilizando el kit QuickGEN Sample Preparation Centrifugation, Q-002. El ADN extraído se utilizó como molde para la técnica de reacción en cadena de la polimerasa Real-Time (qRT-PCR) utilizando el kit QuickGEN PCR Kit Beer yeast and bacteria differentiation - low - Kit Q-072 (GEN-IAL GmbH) y empleando el equipo Applied Biosystems StepOne Plus. Esta técnica permite amplificar y detectar fragmentos específicos de ADN. En este caso se utilizó el protocolo de presencia/ausencia para la determinación como positiva o negativa de la muestra para los siguientes microorganismos o grupos de microorganismos:

- *Enterobacterias*: son un grupo de bacterias que se emplean para el control de calidad en alimentos, su presencia es indicadora de las condiciones sanitarias, ya que indica contaminación, ya sea fecal (algunas son habitantes naturales del intestino de los animales), o ambiental (algunas habitan en restos vegetales y suelo). Pueden estar presentes en mosto no fermentado, pero no es común en cerveza terminada.
- *Lactobacillus* y *Pediococcus*: son bacterias ácido lácticas muy frecuentes en las contaminaciones microbianas de cerveza y causan principalmente acidez y diacetilo.

- *Bacterias acéticas*: son bacterias que producen ácido acético, son aeróbicas estrictas y poseen un rol importante en la formación de *biofilms*.
- *Levaduras salvajes “grupo 1”*: incluye levaduras contaminantes como *Dekkera anomala*, *Dekkera bruxellensis*, *Dekkera custersiana*, *Dekkera naardenensis*, *Debaromyces hansenii*, *Hanseniaspora guillermondii*, *Hanseniaspora osmophila*, *Hanseniaspora uvarum*, *Issotchenkia orientalis*, *Kazachstania exigua*, *Kluyveromyces marxianus*, *Metschnikowia pulcherrina*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia fermentans*, *Pichia membranaefaciens*, *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Torulaspota delbruckii*.
- *Levaduras salvajes “grupo 2”*: incluye *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida kefyr*, *Candida intermedia*, *Candida parapsilosis*, *Candida sake*, *Candida tropicalis*, *Naumovozyma dairenensis*, *Pichia guillermondii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces rouxii*.
- *Levaduras cerveceras*: diferenciando levadura Ale y Lager.

Para el análisis molecular se incluyeron 3 cervezas industriales a modo de control negativo.

2.2. Resultados

Se evaluaron muestras de cerveza de tipo Ale no pasteurizada (cervezas fermentadas con levadura *S. cerevisiae* de “fermentación alta” o “top fermenting”) en formato de botella o lata. Los estilos de cervezas analizados se muestran en la tabla 2. La cervecería no especificó el estilo de cerveza (n.d).

Tabla 2. Estilos y código de análisis de cervezas estudiadas. Fuente: elaboración propia.

# Cervecería	Nombre Cervecería	Código cerveza	Estilo
1	La 40	C	Pilsen
2	Chaura	E	Hoppy Blond
3	Radal	I	Scottish
4	Arvejas partidas	G	Pale Ale
5	Origen	K	n. d
6	Euthopia	D	Ipa Argenta
7	Esquel	P	Red Ale
10	El Bolsón	J	Golden Ale

➤ Análisis fisicoquímico

Los resultados de los análisis fisicoquímicos (promedios de 3 replicas) pueden observarse en la tabla 3. El pH de las cervezas analizadas varió entre 4,24 - 4,57 (en promedio 4,36) mientras que el color varió entre 3,10 y 29,93 SRM, observandose colores que fueron desde amarillo pajizo a marron oscuro en el caso de las cervezas mas oscuras. Por su parte el amargor de las muestras se encontró entre 18 y 43 IBUs (en promedio 33 IBU) y el porcentaje de alcohol varió entre 3,58 y 5,15 %. Por último se observó que las densidades finales se encontraron entre 1,003 y 1,016 g/L. No se encontraron valores fuera de lo esperado para los estilos estudiados.

Tabla 3. Resultados de los análisis fisicoquímicos de cervezas de Chubut. Fuente: elaboración propia.

# cerveza	pH	Color	IBU	% Alcohol	Densidad
C	4,24 ± 0,00	3,10 ± 0,10	32,67 ± 0,58	3,72 ± 0,04	1,010 ± 0,000
E	4,37 ± 0,12	4,10 ± 0,17	36,00 ± 0,00	4,09 ± 0,04	1,003 ± 0,000
I	4,30 ± 0,01	19,97 ± 0,06	37,67 ± 0,58	n.d	n.d
G	4,32 ± 0,01	6,87 ± 0,06	35,00 ± 0,00	3,58 ± 0,03	1,012 ± 0,000
K	4,41 ± 0,01	3,53 ± 0,06	34,67 ± 1,53	3,71 ± 0,01	1,006 ± 0,001
D	4,31 ± 0,06	4,40 ± 0,35	43,00 ± 5,00	4,24 ± 0,05	1,003 ± 0,000
P	4,57 ± 0,00	29,93 ± 0,38	27,00 ± 1,00	5,15 ± 0,06	1,016 ± 0,001
J	4,38 ± 0,01	5,97 ± 2,71	18,00 ± 1,73	3,77 ± 0,19	1,012 ± 0,000

n.d: *no data*, no fue posible la medición por presencia de turbidez en la muestra

➤ Análisis microbiológico

Como se explicó anteriormente, se utilizaron medios de cultivo específicos para detectar contaminaciones microbianas en cerveza: HLP para detectar bacterias lácticas, WLD para bacterias aerobias totales y LCSM para levaduras salvajes. El análisis realizado demostró que el 75 % de las cervecerías superó los valores recomendados de bacterias y/o levaduras contaminantes de cerveza (valores de referencia según Hill, 2015 <10 UFC/mL). Es importante destacar que 3 cervecerías (3, 5 y 10) mostraron recuentos excesivos de UFC /mL (Unidades formadoras de colonias muy numerosas para contar , MNPC).

Tabla 4. Resultados de los análisis microbiológicos de 8 cervezas artesanales de Chubut. Fuente: elaboración propia.

# Cerveza	HLP	WLD	LCSM
-----------	-----	-----	------

C	Ausencia	52 UFC / mL (+)	25 UFC / mL
E	Ausencia	1 UFC / mL (-)	<1 UFC / mL
I	MNPC	MNPC (+)	42 UFC / mL
G	Ausencia	<1 UFC / mL (-)	<1 UFC / mL
K	Ausencia	MNPC (+)	MNPC
D	Ausencia	14 UFC / mL (+)	9 UFC / mL
P	Ausencia	<1 UFC / mL (-)	74 UFC / mL
J	MNPC	MNPC (+)	1 UFC / mL

UFC: Unidades formadoras de colonias. MNPC: muy numeroso para contar (>300 UFC/mL). (+) presencia de acidos organicos que generaron cambio color (disminución de pH) en el medio de cultivo. (-) No se observó cambios de pH en el medio de cultivo

➤ Análisis sensorial

El panel de cata detectó que 4 de las 8 muestras estudiadas mostraron evidencia de contaminación a nivel sensorial. Estos defectos asociados a contaminación fueron compuestos fenólicos detectados como clavo de olor/medicinal (asociado generalmente a la contaminación con levaduras) y/o acidez (causado principalmente por bacterias). En el caso de la cerveza D, no pudo llegarse a un concenso, ya que 4 panelistas la consideraron con indicios de contaminación y 4 panelistas no. Por esta razón la muestra fue considerada como indefinida.

El detalle de los aromas y sabores percibidos para cada muestra de cerveza puede verse en los graficos de araña (Figuras 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11). La cerveza numero P no fue evaluada ya que fue enviada despues de la fecha pactada para la cata. Los descriptores fueron puntuados según escala de 0 (no presente) a 5 (muy intenso) y se graficó su promedio (escala en gráfico hasta 2,5).



Figura 5. Análisis sensorial descriptivo de la cerveza C.



Figura 6. Análisis sensorial descriptivo de la cerveza E.



Figura 7. Análisis sensorial descriptivo de la cerveza I.



Figura 8. Análisis sensorial descriptivo de la cerveza G.



Figura 9. Análisis sensorial descriptivo de la cerveza K.



Figura 10. Análisis sensorial descriptivo de la cerveza D.



Figura 11 Análisis sensorial descriptivo de la cerveza J.

➤ Análisis molecular

Los resultados de PCR en tiempo real de las 8 cervezas analizadas (por triplicado) pueden verse en la tabla 5. La presencia de ADN de bacterias de la familia *Enterobacteraceae* se registró en el 50 % de las muestras. Sin embargo, es posible que estas bacterias no se encuentren viables en la cerveza terminada ya que estas bacterias en general, no toleran el etanol y los pH bajos (Vriesekoop et al., 2012). Su crecimiento en las primeras etapas de la fermentación puede causar sabores y aromas desagradables que pueden ser detectados en la cerveza final y su ADN puede ser detectado por esta técnica aunque las células no se encuentren vivas. Por su parte, se detectó ADN de bacterias ácido lácticas en 3 muestras (38 %) y bacterias ácido acéticas en 6 de las 8 cervezas evaluadas (75 %). Por último se registró la presencia de levaduras contaminantes en 6 muestras (75 %). Los controles realizados con cervezas industriales, mostraron ausencia.

Tabla 5. Resultados de la identificación de microorganismos mediante PCR en tiempo real. Fuente: elaboración propia.

Microorganismo	# Cerveza							
	C	E	I	G	K	D	P	J
Enterobacterias	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>Lactobacillus/Pediococcus</i>	-	+	+	-	-	-	-	+

<i>Pediococcus</i>	-	-	+	-	-	-	-	+
Bacterias acéticas	+	-	+	+	-	+	+	+
Levaduras salvajes 1	+	-	+	+	+	+	-	+
Levaduras salvajes 2	+	-	-	+	-	-	-	+
Levaduras <i>Ale</i> *	+	+	+	+	+	+	+	+
Levduras <i>Lager</i> *	-	-	-	-	-	-	-	-

*Levaduras cerveceras

➤ Análisis adicionales

Ya que las enterobacterias son consideradas de importancia sanitaria (indicadoras de higiene), se consideró que era importante ampliar el estudio de estas bacterias para evaluar si se trataba de células vivas o si el ADN detectado por PCR era de células no viables. Para esto se analizaron las cervezas **C**, **D** y **E** utilizando 2 metodologías en simultáneo: 1) Protocolo de Alimentos CRELTEC. Se realizó dilución 1/10 y 1/100 con Caldo de Tripteína Soja (muestra 10 ml + 90 caldo), luego se sembró en profundidad 1 ml de muestra en Agar Chromocult (Merck). Se incubó 24 hs a 35°C y 2) Protocolo de detección de enterobacterias según MANUAL DE MICROBIOLOGÍA APLICADA A LAS INDUSTRIAS FARMACÉUTICA, COSMÉTICA Y DE PRODUCTOS MÉDICOS. Asociación Argentina de Microbiología. 2da ed. Se realizó dilución 1/10 (10ml + 90 de diluyente) de muestra en caldo de tripteína soja. Se incubó 2 hs a 25°C. Se diluyó nuevamente 1/10 en caldo de enriquecimiento para enterobacterias Mossel. Se incubó 48 hs a 35°C y se sembró en agar VRBD para detectar presencia ausencia de enterobacterias incubando 35°C por 24 hs. En todos los casos se confirmó **ausencia de enterobacterias viables cultivables**.

2.3. Resumen de resultados “línea de base”

En la tabla 6 se puede observar un análisis global de los resultados obtenidos. Se consideró que una muestra fue aceptada satisfactoriamente cuando no registró problemas de contaminación por bacterias ni levaduras (<10 UFC/mL por método de cultivo y ausencia de ADN contaminante por método molecular) y no se evidenció contaminación a nivel sensorial. Se consideró una muestra aceptada de manera condicional (amarillo) cuando presentó problemas de contaminación moderados (10-100 UFC/mL o se detectó presencia de ADN contaminante por método molecular y/o se evidenció de contaminación a nivel sensorial). Una muestra se rechazó (no aceptado) cuando los indicadores de contaminación superaron ampliamente los valores recomendados para contaminantes en cerveza (MNPC). Se encontró ADN contaminante por método molecular y se evidenció contaminación a nivel sensorial.

Tabla 6. Balance de resultados obtenidos con foco en la detección de contaminaciones microbianas. Fuente: elaboración propia.

Cervecería	Cerveza	Bacterias (+/-)*	Levaduras contaminantes (+/-)*	Análisis Sensorial	Balance
1	C	10-100 UFC/mL (+)	10-100 UFC/mL (+)	Sin evidencia de contaminación	ACEPTADO CONDICIONAL
2	E	<10 UFC/MI (+)	<10 UFC/MI (-)	Sin evidencia de contaminación	ACEPTADO CONDICIONAL
3	I	MNPC (+)	MNPC (+)	Evidencia de contaminación	NO ACEPTADO
4	G	<10 UFC/MI (+)	<10 UFC/MI (+)	Evidencia de contaminación	ACEPTADO CONDICIONAL
5	K	MNPC (-)	MNPC (+)	Evidencia de contaminación	NO ACEPTADO
6	D	10-100 UFC/mL (+)	10-100 UFC/mL (+)	Indefinida	ACEPTADO CONDICIONAL
7	P	<10 UFC/MI (+)	10-100 UFC/MI (-)	Sin datos	ACEPTADO CONDICIONAL
10	J	MNPC (+)	MNPC (+)	Evidencia de contaminación	NO ACEPTADO

*. Signo entre paréntesis indica el resultado del test por método molecular. MNPC (muy numeroso para contar)

Las cervecerías fueron informadas acerca de los resultados obtenidos mediante un informe escrito y mediante una reunión online.

Por su parte la destilería “La Alazana” al tratarse de un producto que no presenta riesgos de contaminación microbiana (como en el caso de la cerveza) y al no requerir los mismos parámetros de calidad establecidos para las cervecerías, se firmó la licencia para el uso de levaduras nativas

3. Asesorías técnicas en fábricas de cerveza

3.1. Evaluación de puntos débiles en el proceso de elaboración

Se realizaron asesorías en fábrica para dilucidar las fuentes potenciales de contaminación y evaluación de las capacidades técnicas para el uso de levaduras líquidas. A continuación, se resumen los principales puntos débiles de las cervecerías que pueden traer como consecuencia el desarrollo de contaminaciones microbianas.

1. Errores en la concentración de uso de productos de sanitización y/o en el tiempo de acción de los mismos.
2. Fermentadores plásticos y deteriorados (Imagen 1)
3. Válvulas esféricas (poco sanitarias) y deterioradas (Imagen 2)
4. Cosecha de la levadura para reutilización en recipientes inadecuados (Imagen 3)



Imagen 1. Fermentadores plásticos. Izquierda: cervecería Esquel, derecha: cervecería Radal.



Imagen 2. Interior de fermentador plástico con restos adheridos al plástico.



Imagen 3. Recipiente con levadura para reutilización en recipientes no adecuados para tal fin.



Imagen 4. Válvula esférica corroída

3.2. Test de mosto forzado

Durante las asesorías se acompañaron cocciones para tomar muestras de mosto durante el proceso de elaboración y evaluar la presencia de contaminantes en las superficies del equipo de elaboración. Este método es conocido como “Test de mosto forzado” y consiste en tomar muestras de mosto en distintos puntos del proceso en etapas anteriores a la inoculación de la levadura (después del proceso de enfriado,

mosto frío que circula por mangueras, mosto colocado en el fermentador). Una vez colectadas las muestras en recipientes estériles, se incuban para forzar el desarrollo de potenciales microorganismos contaminantes presentes (Brewing Science Institute, 2021; White & Zainasheff, 2010).

La toma de muestras en fábrica se realizó de la siguiente manera: el puerto de muestreo (conocido por los cerveceros como tomamuestras) se abrió al máximo y se descartó mosto por 5-10 s. Se cerró nuevamente el tomamuestras y se limpió utilizando algodón con alcohol 70 % (v/v) todas las superficies del puerto de muestreo. Se roció con alcohol 96 % (v/v) el puerto de muestreo en su interior y exterior y se flameó la superficie rociada con alcohol hasta que se consumió la llama (en los fermentadores con canillas plásticas en lugar de flamear, se embebió la canilla por 20 min con alcohol al 70 %). Se abrió el tomamuestras y se purgó nuevamente durante 5-10 s para que el puerto de muestreo vuelva a enfriarse. Con la válvula abierta, se colectó $\frac{3}{4}$ del volumen total del recipiente estéril (Tubos Falcon/ frascos de orina) (Brewing Science Institute, 2019). A modo de control negativo se tomó también una muestra de mosto después de realizar el Whirlpool. Todas las muestras fueron incubadas a 25-30 °C durante 7 días (White & Zainasheff, 2010) y fueron evaluadas diariamente durante este período.

Una muestra se consideró positiva cuando se registró la presencia de gas, turbidez y/o sedimentos en comparación con su control negativo, como muestra la Imagen 5. Durante el período de incubación se registró además el tiempo (en días) que las muestras tardaron en desarrollar alguna de las mencionadas características indicadoras de actividad microbiana.



Imagen 5. Test de mosto forzado positivo (derecha) detectado por la presencia de gas, turbidez y sedimentos en comparación con su control negativo (izquierda) en la que sólo se observa la presencia de proteínas coaguladas (trub).

En la tabla 7 se pueden observar los resultados obtenidos para el test de mosto forzado realizados en las distintas asesorías. Los casos que mostraron resultados positivos fueron evaluados puntualmente para dilucidar el origen del problema. Las acciones correctivas para cada caso se numeran en la tabla y se detallan posteriormente.

Tabla 7. Evaluación de la eficiencia de los protocolos de limpieza y sanitización mediante test de mosto forzado. Se detalla el lugar de muestreo, y los resultados (- ; +) según si se observó indicios de crecimiento microbiano (turbidez, gas, sedimentos). Además, se incluye el día en el que los resultados positivos fueron observados y las acciones realizadas para mejorar los parámetros de calidad

# Cervecería	Fecha	Punto de muestreo	Resultado	Día	Ver Acción
#1	s.d	s.d	s.d	s.d	n.a
#2	Agosto	Enfriador	(-)	n.a	n.a
	Agosto	Fermentador	(-)	n.a	
	Noviembre	Enfriador	(+)	2	1
	Noviembre	Fermentador	(+)	2	

	Diciembre	Enfriador	(-)	n.a	
	Diciembre	Fermentador	(-)	n.a	n.a
	Septiembre	Enfriador	(+)	3	
	Septiembre	Fermentador 1	(+)	3	2
	Septiembre	Fermentador 2	(+)	3	
	Octubre	Enfriador	(-)	n.a	
#3	Octubre	Fermentador 1	(-)	n.a	3
	Octubre	Fermentador 2	(+)	3	
	Noviembre	Enfriador	(-)	n.a	
	Noviembre	Fermentador 1	(-)	n.a	n.a
	Noviembre	Fermentador 2	(-)	n.a	
#4	Septiembre	Enfriador	(-)	n.a	n.a
	Septiembre	Fermentador	(-)	n.a	
	Agosto	Enfriador	(-)	n.a	n.a
#5	Agosto	Fermentador	(-)	n.a	
	Octubre	Enfriador	(-)	n.a	n.a
	Octubre	Fermentador	(-)	n.a	
	Agosto	Enfriador	(+)	2	4
	Agosto	Fermentador	(+)	2	
	Agosto	Enfriador	(-)	n.a	5
#6	Agosto	Fermentador	(+)	3	
	Septiembre	Enfriador	(-)	n.a	n.a
	Septiembre	Fermentador	(-)	n.a	
	Octubre	Enfriador	(-)	n.a	n.a
	Octubre	Fermentador	(-)	n.a	
	Agosto	Enfriador	(-)	n.a	
	Agosto	Fermentador 1	(+)	2	6
#7	Agosto	Fermentador 2	(+)	2	
	Septiembre	Enfriador	(-)	n.a	n.a
	Septiembre	Fermentador 1	(-)	n.a	

#10	Septiembre	Fermentador 2	(-)	n.a	7
	Agosto	Enfriador	(-/+)	n.a	
	Agosto	Fermentador	(-/+)	n.a	
	Septiembre	Enfriador	(-)	n.a	n.a
	Septiembre	Fermentador	(-)	n.a	
	Octubre	Enfriador	(-)	n.a	
	Octubre	Fermentador	(-)	n.a	
	Noviembre	Enfriador	(-)	n.a	
	Noviembre	Fermentador	(-)	n.a	

s.d: sin datos; n.a: no aplica

Acción 1 (cervecería #2). Se inspeccionaron mangueras, bombas y fermentadores. Se encontró una filtración en el sello de la bomba. Se reemplazó el sello y se revisaron los protocolos de limpieza y sanitización.

Acción 2 (cervecería #3). Se revisó el estado de las mangueras, fermentadores, bombas, canillas y se evaluaron los protocolos de limpieza. Las mangueras que conducen el mosto desde el enfriador hacia el fermentador fueron reemplazadas por mangueras sanitarias nuevas. Se desarmó el enfriador de placas y se limpió manualmente.

Acción 3 (cervecería #3). Se encontró acumulación de materia orgánica y deterioro de las canillas de entrada de los fermentadores, y fueron reemplazadas por canillas de acero inoxidable. Se ajustó el protocolo de limpieza de fermentadores. La muestra siguiente (tomada en noviembre) mostró resultados negativos.

Acción 4 (cervecería #6). Se revisó el estado de las mangueras, fermentadores, bombas, canillas y se evaluaron los protocolos de limpieza. Se desarmó el enfriador de placas y se limpió manualmente.

Acción 5 (cervecería #6). Se inspeccionó detalladamente el estado de los fermentadores y se detectó la presencia de “piedra cervecera” (precipitación de sales minerales que se incrustan en las superficies de acero inoxidable y otros materiales) que influyen en la eficiencia de los protocolos de limpieza y sanitización. Se realizó un lavado ácido para desincrustar la piedra y se realizó doble CIP (*Cleaning In Place*) del fermentador con detergente alcalino y ácido peracético.

Acción 6 (cervecería #7). Se inspeccionó detalladamente el estado de los fermentadores y se revisaron los procesos de limpieza y sanitización. Se encontró deterioro de las canillas de entrada al fermentador (Imagen 4). Las canillas fueron reemplazadas y se repitió el test

de mosto forzado al mes siguiente. No se encontraron problemas en la limpieza del fermentador luego de cambiar la canilla.

Acción 7 (cervecería #10). La cervecería #10 había presentado graves indicios de contaminación en las cervezas analizadas en la línea de base. En la primera visita a la fábrica, se revisó el estado de las mangueras, fermentadores, bombas, canillas y se evaluaron los protocolos de limpieza. Se observaron al microscopio óptico muestras de mosto y se evidenció un abundante número de bacterias, aunque los mostos forzados no presentaron indicios de crecimiento microbiano. Por esta razón, se decidió evaluar los mostos mediante análisis microbiológicos en el laboratorio de IPATEC, para confirmar si estas bacterias se encontraban vivas. Los resultados obtenidos mostraron que las bacterias observadas no se encontraban viables (ver anexo 2). Aunque esta fábrica inicialmente mostró elevados niveles de contaminación no se obtuvieron mostos forzados positivos.

3.3. Mediciones de oxígeno

Se midió la concentración de oxígeno disuelto en el mosto (Imagen 5), nutriente clave para el uso de levaduras líquidas y reutilizadas, antes de la fermentación, siendo el valor óptimo entre 8-10 ppm de oxígeno. Una de las fábricas visitadas (#3), no realiza ningún tipo de oxigenación, razón por la cual el valor medido se encontró cercano a 3 ppm de oxígeno. Esta fábrica se comprometió a comprar un sistema de oxigenación y actualmente cuenta con este equipo. En 3 casos (Cervecería #2, #5 y #7) se instaló el equipo de oxigenación (tubo de oxígeno puro y piedra difusora) y se determinaron las condiciones de tiempo y caudal para obtener entre 8-10 ppm de oxígeno en el mosto (estas cervecerías comenzaron a realizar la práctica de oxigenación a partir de la asesoría en todas las cocciones). Otro productor (#10) agrega oxígeno mediante aireación del mosto, sin embargo, la cantidad de oxígeno fue insuficiente (3,5 ppm). Este productor adquirió el equipo de oxigenación para incorporar oxígeno puro al mosto en próximas cocciones. Las restantes fábricas (#4, #6) incorporan oxígeno en línea de manera rutinaria y los valores se encontraron dentro de lo esperado.

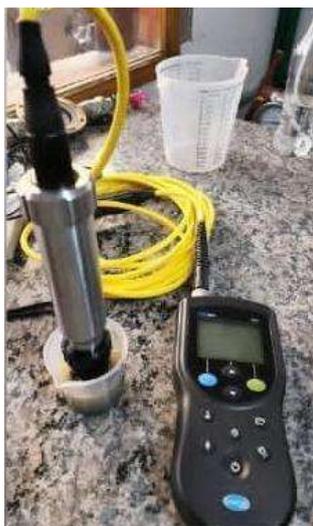


Imagen 5. Medición de oxígeno disuelto en mosto

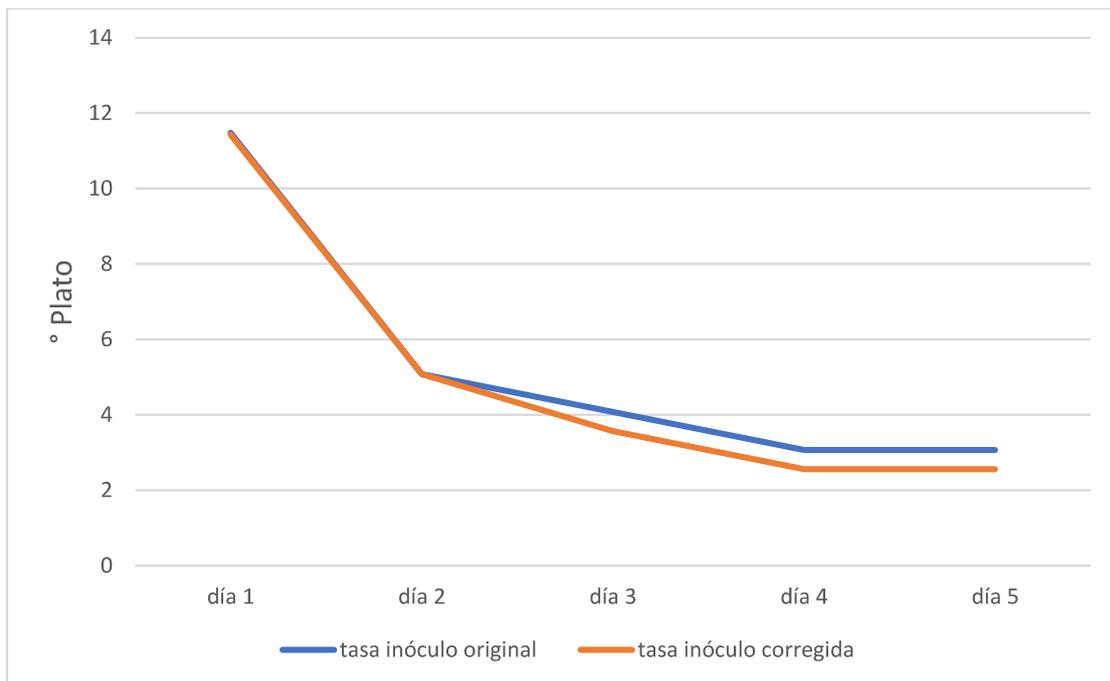
3.4. Manejo de levaduras cerveceras

Cervecería #1: no se acompañaron cocciones en esta cervecería ya que no contestaron los llamados para las asesorías.

Cervecería #2: la fábrica reutiliza levaduras cerveceras, pero no cuenta con microscopio y el equipamiento necesario para realizar la inoculación de manera precisa, sino que la inoculación se realizaba “a ojo” y se registró que los recipientes de cosecha de levadura, no se sanitizaban de manera adecuada. Se corrigió el protocolo de limpieza para dichos recipientes y se sugirió la inoculación de levaduras utilizando una estimación por peso (1kg de crema de levadura por hectolitro de mosto para levadura ale de densidad media). Esta estimación es muy frecuente en cervecerías que no realizan recuentos, y aunque no es un método preciso, suele dar buenos resultados. Además, se informó acerca de un método de estimación de número de levaduras en la crema para que la inoculación sea mas precisa. (IPATEC, 2020; disponible https://www.youtube.com/watch?v=VAp7IA6S_ws&t=1168s).

Cervecería #3: esta cervecería utiliza levaduras secas en todas las cocciones, aunque tiene microscopio y el equipamiento necesario para el recuento preciso de levaduras. El productor afirma que le da miedo hacerlo mal y por eso prefiere utilizar levaduras secas (aunque ha tomado cursos de reutilización en IPATEC). Se encontró que la tasa de inoculación de levaduras en formato seco era de 0,5 g/L. Este valor es menor al recomendado para levaduras ale (0,8-1 g/L) para tener fermentaciones vigorosas y eficientes. Se sugirió aumentar la tasa de inculo a los valores recomendados y se compararon las dinámicas de fermentación antes y después de realizar los cambios. Como

se puede notar en la figura la dinámica de la fermentación mejoró al aumentar la tasa de inoculación de levadura lo que resultó en una mejora en la atenuación final de la cerveza.



Cervecería #4: esta cervecería realiza recuento y evaluación de la viabilidad de las levaduras para reutilizar, utilizando el microscopio para tal fin. Se comprobó que esta práctica se realizaba de manera correcta. Sin embargo, se encontró que la tintura utilizada para la evaluación de la viabilidad de las células (azul de metileno) no estaba en la concentración adecuada, y por esta razón los recuentos daban 100% células vivas. Se preparó una nueva solución a la concentración indicada (0,01%) y se solucionó este problema.

Cervecería #5: esta cervecería cuenta con microscopio y el equipamiento necesario para el recuento preciso de levaduras. Sin embargo, no siempre lo utilizan y la reutilización de levaduras secas es más frecuente que el uso de levadura reutilizada. Se corroboró que la tasa de inoculación sea la adecuada.

Cervecería #6: la fábrica reutiliza levaduras cerveceras, pero no cuenta con microscopio y el equipamiento necesario para realizar la inoculación de manera precisa, sino que la inoculación se realiza por peso utilizando frascos de vidrio previamente sanitizados. Se informó acerca de un método de estimación de número de levaduras en la crema para que la inoculación sea más precisa, como se explicó para la cervecería #2.

Cervecería #7: la fábrica reutiliza levaduras cerveceras, pero no cuenta con microscopio y el equipamiento necesario para realizar la inoculación de manera precisa. Se encontró que la inoculación se realizaba a ojo con recipientes poco adecuados para tal fin y mal sanitizados (Imagen 3). Se reemplazaron los recipientes de cosecha por frascos de 3 litros de vidrio que puedan limpiarse y sanitizarse de manera adecuada y se sugirió la

inoculación de levaduras utilizando una estimación por peso. Asimismo, se informó acerca del método de estimación de número de levaduras en la crema para que la inoculación sea más precisa como se explicó en la cervecería #2.

Cervecería #10: esta cervecería cuenta con microscopio y el equipamiento necesario para el recuento preciso de levaduras. Los productores informaron que la práctica de reutilización es realizada durante la temporada alta cuando la producción de cerveza es mayor. Durante la temporada baja se utilizan levaduras secas para las fermentaciones. Se corroboró que la tasa de inoculación de levadura seca sea la adecuada y se despejaron dudas respecto al uso del microscopio y la práctica de recuento.

4. Acuerdos de transferencia de material

Una vez solucionados los problemas mencionados en los incisos anteriores, se realizó una reunión informativa en la que se expusieron los requerimientos técnicos y legales del uso de la levadura nativa EUBY. Se fijaron los tamaños de Bach a realizar por los productores, y se asesoró respecto a la mejor manera de utilizar la levadura en cuanto estilos y materias primas de elaboración. En la tabla 8 se listan las potenciales cervezas a utilizar la levadura *S. eubayanus*.

Tabla 8. Potenciales tamaños y estilos de cervezas a realizar con la levadura *S. eubayanus*

# Cervecería	Tamaño de Bach (L)	Estilo base	Extras
#2	250	Cerveza de trigo	Fruta fina
#3	100	Scottish	No
#4	400	A definir	A definir
#5	60	Kolsch o trigo	No
#6	245	Saison	Añejada en barrica
#7	500	A definir	A definir
#10	300	A definir	A definir

Las cervecerías #2, #4, #5, #6 y #7 ya firmaron el acuerdo de transferencia de materiales que es requisito indispensable para recibir la levadura para las primeras pruebas. Los documentos ya entraron al circuito de firmas del CONICET. Los productos de las cervecerías #3 y #10 están siendo actualmente evaluadas nuevamente para confirmar las mejoras en la calidad de los productos terminados.

La cervecería #1 no contestó ninguno de los llamados para continuar con el proyecto, por lo cual no se envió el acuerdo de transferencia de material.

Por su parte la destilería *La Alazana* firmó el acuerdo de transferencia de material y también la Licencia de transferencia tecnológica con el CONICET y la UNComahue, por lo cual se transfirió la levadura nativa *Saccharomyces uvarum* CRUB 209 a la empresa. El día 15 diciembre se formalizó la entrega de inóculo de levadura para la fermentación de 1000 litros de mosto de whisky, el cual fue elaborado con cebada cultivada en la Patagonia que es malteada por el mismo establecimiento. Esto sumado al uso de una levadura nativa para la fermentación, es un paso muy importante para incorporar valor e identidad regional a los productos y es un primer paso hacia la posibilidad de generar denominación de origen en el futuro.

La producción de cervezas con levaduras nativas para las cervecerías que están en condiciones se realizará luego de la temporada alta (a partir de marzo) ya que las cervecerías expresaron que no cuentan con la disponibilidad para este tipo de producción durante los meses de verano. Además, los fondos que financian la parte de [laboratorio](#), es decir el proyecto PFI “Identidad regional y agregado de valor para la cerveza y whisky artesanal andino patagónicos mediante el empleo de levaduras autóctonas” dirigido por el Dr. Libkind del IPATEC (CONICET – UNCo), se han demorado y estarán disponibles también para el inicio del 2023.

5. Conclusiones

Durante el transcurso de este proyecto, se evaluó la calidad de las cervezas y las capacidades técnicas de las cervecerías para el uso de levaduras nativas como forma de innovación productiva. La imagen 6 resume algunas de las actividades realizadas durante las visitas. Aunque en la línea de base se evidenciaron problemas de contaminación microbiana en muchas de las cervecerías, se realizaron acciones concretas en cada fábrica para revertir esta situación. Las asesorías realizadas en las fábricas visitadas, han generado un gran impacto en la calidad de las cervezas. Un ejemplo de esta mejora, es que 2 de las cervecerías involucradas en este proyecto (#3 y #7) recibieron premios por varias cervezas en la Copa Patagónica de Cervezas y en la Segunda Copa Cerveceros Caseros de Bariloche, eventos realizados durante octubre y noviembre de este año. Las mejoras en los parámetros de calidad logradas gracias a las asesorías técnicas durante el transcurso del proyecto, son evidencia de la importancia de la interacción entre el sector productivo y científico y permitirá la transferencia de levaduras nativas para cervezas diferenciales. Contar con cervezas de alta calidad permitirá una mejor recepción por parte de los consumidores de bebidas diferentes y especiales, y por lo tanto una mayor adopción y continuidad de producción por parte de los productores y sin duda será un primer paso fundamental para la posibilidad de generar denominación de origen en el futuro. Además, resolver la problemática de calidad microbiológica de las cervecerías es vital para la implementación de levaduras no convencionales, como es el caso de las levaduras nativas.



Ilustración 6. Fotos tomadas durante las visitas a las fabricas

6. Bibliografía

ASBC. (2011). Beer-9. Hydrogen ion concentration. En *Method of analysis*(14.^a ed.). American Society of Brewing Chemists. <https://doi.org/10.1094/ASBCMOA-Beer-9>

ASBC. (2011). Beer-23. Beer Bitterness. En *ASBC Methods of Analysis* (14.^a ed.). American Society of Brewing Chemists. <https://doi.org/10.1094/ASBCMOA-Beer-23>

ASBC. (2011). Beer-10. Color. En *Methods of Analysis* (14.^a ed.). American Society of Brewing Chemists. doi: <https://10.1094/ASBCMOA-Beer-10>

ASBC. (2011). Sensory analysis: flavor database. En *Method of analysis. American Society of Brewing Chemists*. www.asbcnet.org.
<https://www.asbcnet.org/Methods/SensoryAnalysis/Pages/default.aspx>

Back, W. (2005). *Atlas and Handbook of Beverage Biology*. Hans Carl Verlag. Nürnberg, Alemania 10-112.

Colino, E., Civitaresi, H. M., Capuano, A., Quiroga, J. M., & Winkelman, B. (2017). *Análisis de la estructura y dinámica del complejo cervecero artesanal de Bariloche, Argentina*. 20, 14.

Giovenzana, V., Beghi, R., & Guidetti, R. (2014). Rapid evaluation of craft beer quality during fermentation process by vis/NIR spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 142, 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.06.017>

Giovenzana, V., Beghi, R., & Guidetti, R. (2014). Rapid evaluation of craft beer quality during fermentation process by vis/NIR spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 142, 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.06.017>

Jespersen, L., & Jakobsen, M. (1996). Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 139-155. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01154-3](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01154-3)

Kaderian, S. M. (2018). Lo artesanal como mediación técnica y simbólica. Cultura, identidad local y aprendizaje en la cerveza artesanal de Bariloche, Argentina. *RIVAR* 5. 39-63.

Latorre, M. (2016). Incidencia de contaminantes microbianos en cervezas artesanales embotelladas de la Patagonia Andina. Universidad Nacional del Comahue. Tesis de grado.

Manzano, M., Giusto, C., Bartolomeoli, I., Buiatti, S., & Comi, G. (2005). Microbiological analyses of dry and slurry yeasts for brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 111(2), 203-208. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2005.tb00667.x>

Manzano, M., Iacumin, L., Vendrames, M., Cecchini, F., Comi, G., & Buiatti, S. (2011). Craft beer microflora identification before and after a cleaning process. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(3), 343-351. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00478.x>

Menz, G., Andrighetto, C., Lombardi, A., Corich, V., Aldred, P., & Vriesekoop, F. (2010). Isolation, identification, and characterisation of beer-spoilage lactic acid bacteria from microbrewed beer from Victoria, Australia. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(1), 14-22. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00393.x>

Moretti, E. (2013). *Development of guidelines for microbiological control in microbrewery*. University of Perugia. PhD thesis

Paradh, A. (2015). Gram-negative spoilage bacteria in brewing. En *Brewing Microbiology* (1.^a ed., pp. 175-194). Woodhead Publishing. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00008-3>

Schneiderbanger, J., Grammer, M., Jacob, F., & Hutzler, M. (2018). Statistical evaluation of beer spoilage bacteria by real-time PCR analyses from 2010 to 2016. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(2), 173-181. <https://doi.org/10.1002/jib.486>

Suzuki, K. (2015). Gram-positive spoilage bacteria in brewing. En *Brewing Microbiology* (pp. 141-173). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00007-1>

Suzuki, K. (2020). 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*, 78(4), 245-259. <https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1782101>.

ENCUESTA REALIZADA A PRODUCTORES DE CERVEZA

Cervecería:

Dirección de correo electrónico:

Nombre completo de quien llena la encuesta y rol en la empresa:

Nombre legal de la empresa y CUIT:

Dirección completa de la fábrica de cerveza:

DATOS DE PRODUCCIÓN

1. Volumen total (en litros) producido en 2021.
2. Marque las que correspondan. Produzco: LATAS – BOTELLAS - AMBAS
3. Declare el tamaño del/los batch
4. Declare el tamaño en Lts de los fermentadores con los que cuenta (de menor a mayor), ejemplo 500ltsx2, 1000lts x1...
5. Declare si cuenta con propagadores u otros equipos para tal fin mencionando volumen útil que poseen.
6. Liste los 5 estilos de cerveza que produce permanentemente y de mayor producción (de mayor a menor)
7. Liste las levaduras que mayormente utiliza para su producción en orden de mayor frecuencia a menor
8. ¿Oxigena el mosto? SI - NO
9. ¿Agrega Nutrientes al mosto? ¿Cuales?
10. ¿Agrega sales al mosto? ¿Cuales?

REUTILIZACIÓN DE LEVADURAS Y CONTROL DE CALIDAD

1. ¿Tiene a alguien encargado de Control de Calidad en la fábrica? Si la respuesta es sí, ingresar nombre completo y de contacto.
2. ¿Mide regularmente densidad en diferentes puntos de la fermentación? ¿Qué instrumentos usa?
3. ¿Mide pH?, agregue modelo de phmetro
4. ¿Reutiliza levaduras? SI – NO
5. ¿Con qué frecuencia reutiliza levaduras? Marque la opción q corresponda:
NO REUTILIZA
REUTILIZA DE VEZ EN CUANDO, POCAS GENERACIONES
REUTILIZA SIEMPRE, POCAS GENERACIONES
REUTILIZA SIEMPRE Y MUCHAS GENERACIONES
6. ¿Tiene microscopio y todos los elementos para hacer análisis de levaduras? ¿los usa?

7. ¿Utiliza la APP Microbrew.ar?
8. ¿Qué controles microbiológicos realiza?
9. ¿Tiene a alguien en la fábrica capacitado para realizar análisis sensorial? Incluir nombre/es y cuando fue la última capacitación?

LIMPIEZA Y SANITIZACIÓN

1. ¿Qué tipo de limpieza realiza? Marque las que correspondan: CIP - MANUAL
2. ¿Qué sustancia química (compuesto y marca) utiliza para la limpieza de los equipos? ¿a qué concentración, temperatura y tiempo la utiliza?
3. ¿Qué sustancia química (compuesto y marca) utiliza para la desinfectar los equipos? ¿a qué concentración, temperatura y tiempo la utiliza?

ANEXO II



Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
Universidad Nacional del Comahue

INFORME DE RESULTADOS SERVICIOS TECNOLÓGICOS DE ALTO NIVEL:

ANÁLISIS DE CERVEZA

Fecha: 29/09/2022

Solicitado por: Cervecería El Bolson

DATOS DE LA MUESTRA

Muestreo: Realizado por el cliente

Transporte: Realizado por el cliente

Fecha de Ingreso: 29/09/2022

Envase: Frascos de vidrio

Conservación: 5°C

Código interno: M 1029-1033

Fecha inicio análisis: 29/09/22

Fecha de finalización de análisis: 08/10/22

TIPO DE ANÁLISIS

Tipo de Análisis			
Microbiológico	X	Fisicoquímico	

Información de otros Servicios Tecnológicos de Alto Nivel que ofrece el IPATEC: <http://www.ipatec.conicet.gob.ar/stan/>

MÉTODOS

Se evaluó la presencia de bacterias aeróbicas, utilizando el medio de cultivo WLD. La presencia de bacterias anaeróbicas se realizó utilizando el medio específico HLP en condiciones de anaerobiosis. Se evaluó la presencia de levaduras salvajes en el medio específico LCSM. Se registró el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por ml de muestra.

RESULTADOS

Código de fábrica	Código interno	Medios de cultivo		
		WLD (bacterias aeróbicas)	LCSM (levaduras salvajes)	HLP (<i>Pediococcus</i> y <i>Lactobacillus</i>)
Hervidor Lote 62 15/9 (M1)	1029	<1 UFC/ml	<1 UFC/ml	<1 UFC/ml
Wirpool Lote 62 15/9 (M2)	1030	<1 UFC/ml	<1 UFC/ml	<1 UFC/ml
Enfriador Lote 62 15/9 (M3)	1031	<1 UFC/ml	<1 UFC/ml	<1 UFC/ml
Busca Claro Lote 62 15/9 (M4)	1032	<1 UFC/ml	<1 UFC/ml	<1 UFC/ml
Toma Muestra Lote 62 15/9 (M5)	1033	1 UFC/ml	<1 UFC/ml	<1 UFC/ml

Valores de referencia de nivel máximo aceptado de bacterias o levaduras contaminantes: <10 células por ml de cerveza. MNPC: muy numeroso para contar.



Dr. Diego Libkind
 Responsable Técnico