

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



Manual de procesos operativos, fisicoquímicos y microbiológicos, para una microcervecera en Baja California.

PRESENTA

Erick Salvador Espinoza Rodelo

DIRECTORA

Dra. Mónica Carrillo Beltrán

CO-DIRECTOR

Dr. Juan José Sevilla García

Mexicali, B. C. Agosto de 2021

Contenido

Portada	1
Capítulo 1 Introducción	4
Planteamiento del problema	5
Justificación	6
Objetivos de investigación	7
Objetivo general.....	7
Hipótesis	7
Capítulo 2 Marco Teórico	8
Efectos adversos de microorganismos contaminantes en cerveza	12
Bacterias.....	12
Lactobacillus.....	12
Pediococcus	12
Pectinatus y Megasphaera.....	13
Acetobacter y Gluconobacter	13
Zymomonas.....	13
Enterobacterias (Obesumbacterium, enterobacter, citrobacter, klebsiella).....	13
Levaduras Contaminantes	14
No-Saccharomyces (Candidas, Torulaspora, Kluveromyces, schizosaccharomyces).....	14
Brettanomyces.....	14
Saccharomyces Cerevisiae cepas diastáticas	14
Capítulo 3 Metodología Experimental	15
Metodología.....	16
Control microbiológico	17
Limpieza en Sitio (CIP: Cleaning in place)	17
Pasivado de Acero inoxidable	18
Método de cultivo.....	19
PCR.....	22
PCR PAL: Lactobacillus y pediococos resistentes a lupulo	22
PCRSTAT: Saccharomyces cerevisae variedad diastatica.....	22
MALDI-TOF	24
Procedimiento estándar	24

Método de transferencia directa.....	24
Control de levaduras.....	25
Conteo de Celulas y Viabilidad.....	25
Capítulo 4 Resultados	31
Selección de candidatos para muestras.....	32
Bitácora de pruebas realizadas en el laboratorio El Dorado.	34
Casos de Estudio	38
Cervecería #1	38
Cervecería #2	39
Cervecería #3	40
Cervecería #4	41
Cervecería #5	43
Cervecerías Foráneas	44
Cervecería Ens #1	45
Planta piloto.....	47
Producción del lote 0	50
Pruebas de calidad en lote 0.....	50
Resultados de análisis	51
Cultivos generales en placa 48hrs.....	52
Bibliografía	56

Capítulo 1

Introducción

Planteamiento del problema

La región de Baja California tiene una larga historia en la producción de bebidas fermentadas, desde los viñedos en la zona valle de Ensenada, las cuales fueron introducidos por las colonias de inmigrantes rusos; la histórica cerveza Mexicali de la época de la prohibición en Estados Unidos, cerveza Tecate que actualmente es parte de una de las transnacionales más grandes del mundo; y en los últimos años, la aparición de pequeños productores de cerveza artesanal, los cuales fueron impulsados por una corriente originada en la zona de California EE.UU.

Para visualizar el potencial de crecimiento en la industria de bebidas alcohólicas en México, la producción de cerveza “convencional” fue estimada en más de 78.4 billones de pesos en 2014. Las 55 principales compañías productoras fueron valoradas en más de 66.6 Billones de pesos y crearon más de 11,800 trabajos en México. Nuestro país obtuvo el 6to lugar en consumo de cerveza a nivel mundial, con más de 63 millones de consumidores con un consumo promedio de 62 L/año. Sin embargo, la cerveza artesanal sólo es el 0.5% de dicho mercado, y de ese porcentaje, $\frac{1}{3}$ se encuentra establecido en Baja California. La explicación a esto se debe a la gran colaboración que existe entre la industria Cervecera de California EE.UU. y Baja California MX., generando una retroalimentación de información y una ventana de oportunidad a la industria local. (Cabrera-Flores, 2019)

Baja California, al ser la región con mayor densidad en producción de cerveza artesanal en la República Mexicana, es el lugar adecuado para el desarrollo tecnológico y científico en procesos de producción cervecera. La mayoría de los productores son autodidactas y desarrollan conocimiento empírico, el cual muchas veces podría generar innovación en la industria en forma de patentes o metodologías, lamentablemente mucho de esto se pierde por la falta de investigación en el área.

Justificación

- La industria de la cerveza artesanal se encuentra en un punto de crecimiento importante en Baja California, los productores locales están migrando al uso de técnicas más especializadas e industrializadas, pues su producción no se limita al mercado local, llegando a enviar producto de manera constante al centro del país e incluso a Estados Unidos.
- A consecuencia de las medidas sanitarias ocasionadas por la pandemia de COVID-19, muchas MIPYMES en el Estado, se vieron forzadas a detener sus operaciones, reducir e incluso despedir a su personal y finalmente cerrar sus negocios.
- Con la necesidad de reactivar la economía, se realizó un acercamiento las micro cervecerías artesanales de la región, exponiéndoles las ventajas de innovar desde sus procesos de producción, su estrategia de comercialización hasta su modelo de negocio.

Objetivos de investigación

Objetivo general

Desarrollar un manual de procesos operativos que implemente técnicas y herramientas de identificación microbiológica para su relación con el diagnóstico de problemas originados en el proceso, que deterioran las propiedades sensoriales del producto, así como los principales parámetros fisicoquímicos para el control de calidad.

Hipótesis

La implementación de un manual de procedimientos, permitirá la reducción de problemas en el proceso de elaboración, logrando identificar la causa de afectación de la calidad en producto final, minimizando las pérdidas.

Capítulo 2

Marco Teórico

Cerveza

Bebida alcohólica fermentada realizada a base de 4 principales ingredientes: agua, granos, lúpulo y levadura. Cada uno de estos ingredientes puede tener diferentes variaciones las cuales generan una gran variedad estilos desarrollados a lo largo de los años y regiones en las que son producidos. Por nombrar algún ejemplo, en la Inglaterra de la revolución industrial, nacieron 2 de los estilos más populares de la actualidad, fue una mezcla de las condiciones del agua de la zona norte del país, su alto contenido en sales Epson brindó un balance para el dulzor de las maltas tostadas que se desarrollaron por esa misma época, combinado con los lúpulos terrosos y suaves de la región y las levaduras *Saccharomyces*, que brindaron niveles altos en alcohol, dando como resultado los estilos Porter y Stout. Para la producción de cerveza existe un proceso general el cual se muestra en el Figura 2, donde se describen las diferencias por etapas en los procesos (De Ross, 2019).

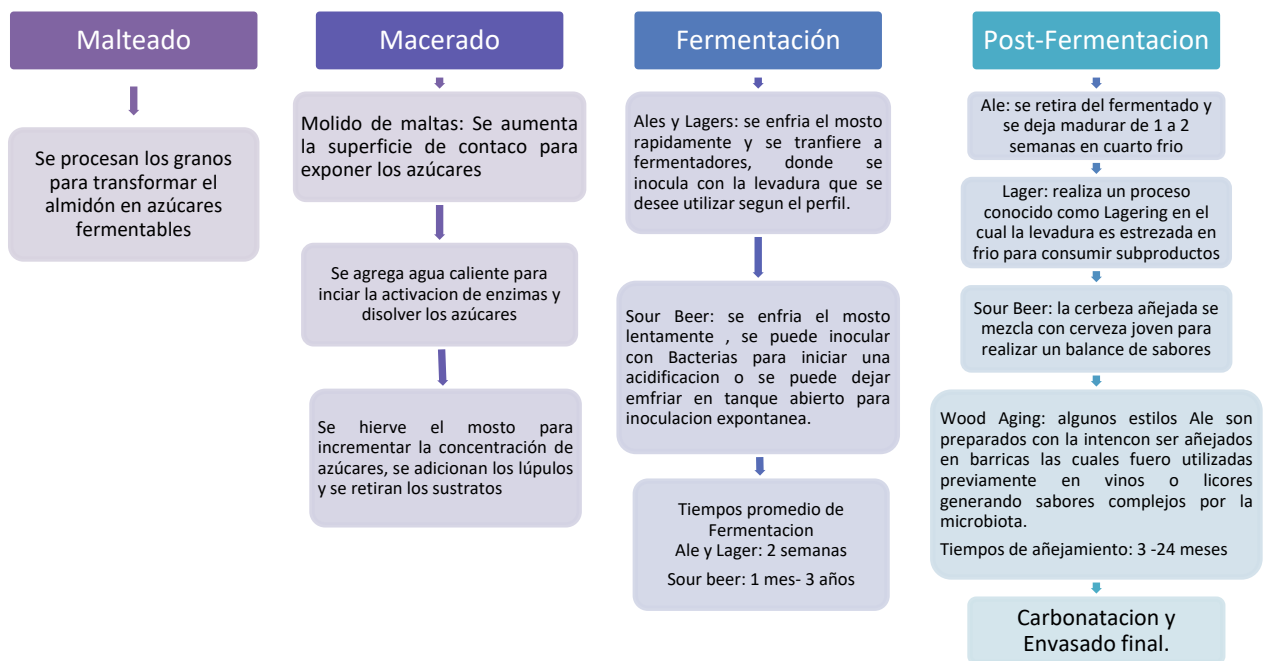


Figura 1: Proceso General de producción de cerveza

Compuestos volátiles en la cerveza

Además de la formación de etanol y dióxido de carbón, los microorganismos utilizados en la fermentación, producen un amplio rango de metabolitos secundarios, aunque estas sustancias son producidas en baja concentración, son las responsables de los complejos aromas presentes en la cerveza; algunos son llamados Biosabores (bioflavors), otros se consideran errores y generalmente son llamadas desviaciones (off-flavor)

- Alcoholes superiores
- Esteres
- Ácidos orgánicos

La percepción de estos compuestos es de carácter organoléptico, es decir sabores que son percibidos por más de un sentido, en este caso el gusto y olfato, por lo mismo muchas de las descripciones encontradas sobre sabores son expresadas de forma más conocidas, tal como se muestra en las Tablas 1 y Tabla 2.

Tabla 1: Lista de compuestos asociados con los sabores en la cerveza

Compuesto	Sabor en la cerveza	Percepción Organoléptica (ppm)
Alcoholes superiores		
n-Propanol	Alcohol	800
Isobutanol	Alcohol	200
Alcohol amílico activo	Alcohol, Plátano, Medicinal, Solvente	65
Alcohol isoamílico	Alcohol	70
2-fenil etanol	Rosas, Dulzor, Perfumado	125
Esteres		
Acetato de etilo	Solvente, Frutal, Dulzor	30
Acetato de isoamilo	Plátano, Manzana, Solvente	1.2
2-fenil etil acetato	Rosas, miel, Manzana, Dulzor	3.8
Etil Caprolato	Manzana Verde	0.21
Etil Caprilato	Manzana Verde	0.9
Grupo carbonilo		
Acetaldehído	Hojas Verdes, Frutal	25
Diacetilo	Mantequilla	0.15

(Olaniran, 2017)

Tabla 2: Descripción organoléptica de volátiles importantes en madera de roble americano

Componente	Descripción organoléptica
2-Furaldehído	Ligero tostado, caramelo
Benzaldehído	Almendra, dulce
5-metil Furfural	Especial, Tostado, dulce
2- Acetil furano	Tostado, granos tostados
Alcohol Bencílico	Floral, rosas
Guaiacol	Espicias, tostado, ahumado
2-Fenil etanol	Floral, rosas
p-Creosol	Espicias, ligero herbal, fenólico
Trans-whisky lactone	Vainilla, roble, clavo, coco
Cis-whisky latone	Vainilla, roble, clavo, coco
eugenol	Espicias, clavo, canela
vainillin	Dulce, vainilla
Trans- isoeugenol	Espicias, clavo, Madera/roble

(Setzer, 2016)

En la industria cervecera las levaduras son clasificadas en 3 grupos como se muestra en la Tabla 3: Fermentación Superior (Top Fermentation), Fermentación Inferior (Bottom Fermentation) y Levaduras salvajes (Wild Yeast). Las primeras 2, son clasificadas por su capacidad de floculación, es decir, las levaduras superiores tienen la capacidad de formar flóculo y trabajan en la parte superior del mosto, generalmente conocidas como levaduras Ale. Las levaduras inferiores como su nombre lo indica, tienen muy baja floculación y se acumulan en el fondo del mosto dando sabores más tenues que las anteriores, generalmente conocidas como Lager. El tercer grupo, las levaduras salvajes, generalmente son descritas como levaduras de deterioro, pues muchos de los sabores que desarrollan son desviaciones para los estilos que se producen con las otras 2 clases. Este tipo de levaduras generan perfiles ácidos y fenólicos ideales para los estilos ácidos y añejados en barrica. (Bokulich, 2013).

Tabla 3: Clasificación de microorganismo para cerveza.

Tipo	Microorganismo representativo	Temperaturas de acción	Uso
Ales (Fermentación superior)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15 – 25 °C	Producción de Cerveza estilo Ale, cultivos mixtos para cerveza y vinos para incrementar el nivel de alcohol.
Lagers (Fermentación inferior)	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	6 – 12 °C	Exclusivo de cervezas lager
Levaduras salvajes y bacterias	Levaduras <i>Saccharomyces spp</i> <i>Brettanomyces spp</i> Bacteria <i>Lactobacillus</i> <i>Pediococcus</i> <i>Acetobacter</i>	Varias según el organismo. Para levaduras comúnmente se utiliza un rango similar a Ale, *la pre-acidificación con lactobacillus se realiza a 40-45 °C durante el macerado a esto se le llama Sour keattle	Se utilizan en cultivos mixtos, se encuentran en barricas y son utilizados en fermentaciones espontaneas,

(Buglass, 2010)

Efectos adversos de microorganismos contaminantes en cerveza

Bacterias

Lactobacillus

- Acidificación
- Turbidez
- Sedimentos
- Algunas especies resisten iso-a-acido y altas temperaturas
- Alta atenuación
- Generan aminas biogenicas

Pediococcus

- Acidificación
- Diacetilo, (genera sabores a mantequilla)
- Exopolisacaridos (generar una sensación de viscosidad y consistencia oleosa, generan filamentos en grandes concentraciones)
- Biopelícula
- Floculación prematura de levaduras, retardo en fermentación
- Capacidad de crecer en bajas temperaturas.

Pectinatus y Megasphaera

- Anaerobios estrictos, crecen en cervezas envasadas.
- Sedimentos
- Turbidez
- Coágulos
- Olores Nauseabundos: Fecal
- Sobreviven en aerosoles y en biopelículas
- Inhibe crecimiento de *Saccharomyces* y detienen la producción de alcohol
 - Presentan baja resistencia a alcohol y aumentos de temperatura

Acetobacter y Gluconobacter

- Acetificación
- Biopelícula
- Turbidez
- Viscosidad

Zymomonas

- Anaerobios, algunos toleran bajo oxígeno
- Acetaldehído
- S₂H
- DMS Dimetil Sulfuro y DMDS Dimetil disulfuro, (olor a maíz enlatado o huevo podrido)

Enterobacterias (Obesumbacterium, enterobacter, citrobacter, klebsiella)

- Anaerobios Facultativos
- No toleran alcohol (medio a alto) y pH menores a 4.3
- DMS: Dimetil Sulfuro
- Diacetil
- Inhibición de levaduras
- Aminas biogénicas
- Pueden contaminar mostos y lodos de levadura

Levaduras Contaminantes

No-Saccharomyces (Candidas, Torulaspora, Kluyveromyces, schizosaccharomyces)

- Turbidez
- Acidos organicos
- Sedimentos
- Sabores fuera de estilo fenolicos

Brettanomyces

- Compuestos fenolicos :4-etil guaiacol, 4-etil-fenol
- Acido acético en presencia de oxigeno
- Los perfiles organolépticos generados son muy variados
- Usadas en cervezas lambicas y acidas

Saccharomyces Cerevisiae cepas diastáticas

Capaces de producir glucoamilasa extracelular: les permiten degradar oligosacaridos y almidon

- Forman espeoras
- Extienden la fermentación
- Aumentan niveles de CO₂ y alcohol
- Generan un final seco en producto
- 4-vinyl guaiacol (especias, clavo)
- Efervescencia y reflujo de botella
- Explosión de botellas

Capítulo 3

Metodología

Experimental

Metodología

Se desarrollo una planta piloto para realizar las pruebas de producción, y establecer las metodologías más apropiadas para el nivel de producción, a su vez se trabajo junto al laboratorio el dorado para utilizar equipos especializados.

Se separaron las técnicas propuestas en 3 tipos: Microbiológicas, Fisicoquímicas y Levaduras.

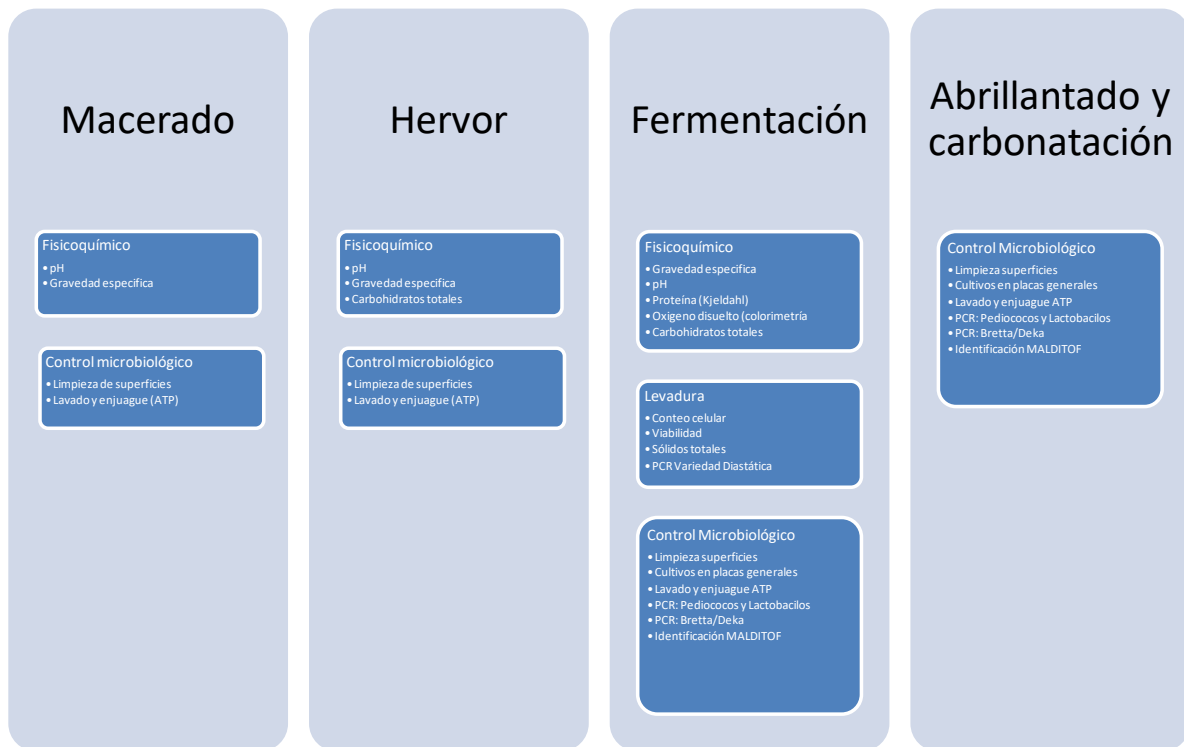


Figura 2: Diagrama de proceso con relación de metodologías aplicadas en cada etapa.

Control microbiológico

Limpieza en Sitio (CIP: Cleaning in place)

Equipo de Seguridad:

Guantes de Nitrilo

Lentes de seguridad

Botas de seguridad

Productos a utilizar:

Acido:(Nítrico 30-50%/Fosfórico 1-5%)

Alcalino: (Hidróxido de Sodio 30-50%)

Acido Per-acético (Acético15%/Peroxido23)

Agua

1. Prevenciones de accidentes y recomendaciones.

EL PROCESO ES AGRESIVO CON CUALQUIER TIPO DE METAL QUE NO SEA ACERO INOX

El contacto de los químicos en materiales con cubiertas metálicas tales como Bronce, Cromo, Aluminio, o sus variantes, provocara grandes daños a dichos metales creando un riesgo de derrame. Por lo cual se recomienda retirar todas las piezas que no sean compatibles.

Es altamente recomendado tener a la mano las medias de prevención de accidentes y control de derrames antes de Iniciar operación

Verificar que la bomba que se está utilizando para el proceso CIP pueda sostener la demanda de flujo y presión constante, así como que todos los accesorios estén en buen estado para evitar derrames.

1. Diluciones de producto.

Acido: 0.9 % - 2.3 %

Alcalino: 0.4% - 2.1%

Acido Peracetico: 1.2 – 2 ml por litro de agua.

2. Procedimiento.

- **Enjuague de Suciedad:** Limpiar con agua de proceso (agua de la llave) el exceso de suciedad que se encuentre en el equipo (fermentador, tanque, olla) Enjuague Agua Temperatura: 20 – 32C (Ambiente) Tiempo: 5-10 min.
- **Lavado Alcalino:** Preparar la solución necesaria para la limpieza según la concentración deseada determinada por el grado de suciedad. Temperatura: 60-70 C Tiempo: 5-20 min.
- **Enjuague Alcalino:** Realizar enjuague del producto alcalino con agua de proceso, Enjuague Agua Temperatura: 60 C Tiempo: 5-10 min.
- **Lavado Acido:** Preparar la solución necesaria para la limpieza según la concentración deseada determinada por el grado de suciedad. QIA ACI Temperatura: 60-70 C, Tiempo: 5-20 min
- **Enjuague Acido:** Realizar enjuague del producto alcalino con agua de proceso, Enjuague Agua Temperatura: 60 C Tiempo: 5-10 min
- **Desinfección:** Preparar la solución necesaria para la Desinfección de superficies, Acido peracetico Temperatura: 25 -30 C (Ambiente) Tiempo:3-5 min

Pasivado de Acero inoxidable

- Equipo de Seguridad:

Guantes de Nitrilo

Lentes de seguridad

Botas de seguridad

- Productos a utilizar:

Acido:(Nítrico 30-50%/Fosfórico 1-5%)

Alcalino: (Hidróxido de Sodio 30-50%)

Agua

- Prevenciones de accidentes y recomendaciones.

EL PROCESO ES AGRESIVO CON CUALQUIER TIPO DE METAL QUE NO SEA ACERO INOXIDABLE

El contacto de los químicos en materiales con cubiertas metálicas tales como Bronce, Cromo, Aluminio, o sus variantes, provocara grandes daños a dichos metales creando un riesgo de derrame. Por lo cual se recomienda retirar todas las piezas que no sean compatibles.

Es altamente recomendado tener a la mano las medias de prevención de accidentes y control de derrames antes de Iniciar operación

Verificar que la bomba que se está utilizando para el proceso CIP pueda sostener la demanda de flujo y presión constante, así como que todos los accesorios estén en buen estado para evitar derrames.

- Diluciones de producto.

Acido: 20%

Alcalino: 10%

- Procedimiento.

Enjuague de Suciedad: Limpiar con agua de proceso (agua de la llave) el exceso de suciedad que se encuentre en el equipo (fermentador, tanque, olla) Enjuague Agua Temperatura: 20 – 32C (Ambiente) Tiempo: 5-10 min.

Lavado Alcalino: Preparar la solución necesaria para la limpieza de grasas y aceites usados en el maquinado, o para retirar materia orgánica.

Temperatura: 60-70 C Tiempo: 30-40 min.

Enjuague Alcalino: Realizar enjuague del producto alcalino con agua de proceso, Enjuague Agua Temperatura: 60 C Tiempo: 5-10 min.

Lavado Acido: Preparar la solución necesaria para el pasivado Temperatura: 60-70C Tiempo 30-40

Enjuague Acido: Realizar enjuague del producto alcalino con agua de proceso, Enjuague Agua Temperatura: 60 C Tiempo: 5-10 min

Secado y Oxidado: Se deja escurrir el metal, y se retiran todos los accesorios el equipo, se deja a temperatura ambiente y en contacto con el aire durante 24 hrs. Después de este periodo se revisa si el terminado es el deseado. Y realizar un CIP completo antes de usar.

Método de cultivo

- En un tubo para centrifuga de 50 ml se toma la muestra a analizar y se centrifuga por 10 minutos a 3000 X G. para concentrar la muestra.
- Se retira el sobrenadante y se reconstituye el sedimento con un vortex.
- Utilizando un asa calibrada para microbiología desechable de 1 μl se toma la muestra y se siembra en una placa, utilizando técnica de cuadrícula para conteos cuantitativos (a), o estriado por arrastre para conteo cuantitativo (b).
- La placa inoculada, se rotula y se deja en incubación a un rango de 27-30c durante 48 hrs, (con revisión de crecimiento las primeras 24hrs)
- Si existe crecimiento después de 48hrs en la placa cuantitativa (a) se cuentan las colonias existentes en la placa, ese número se reporta como 1 X 1000 UFC/ml

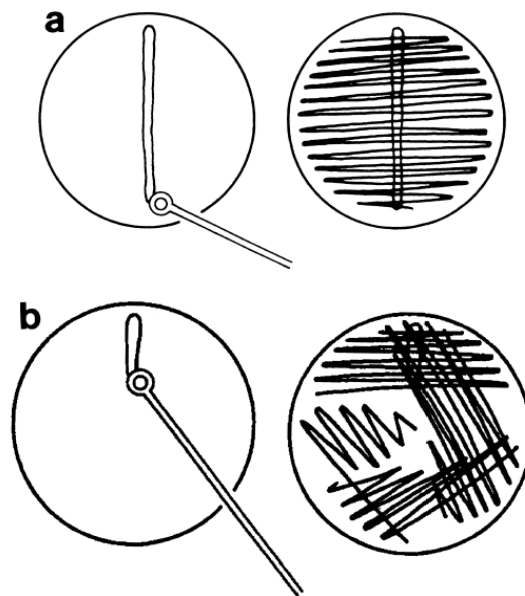
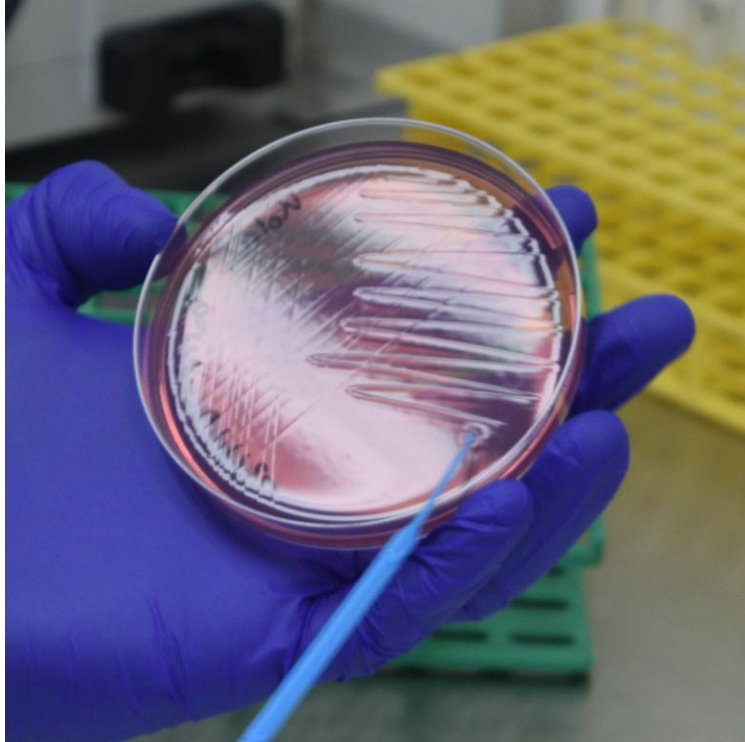
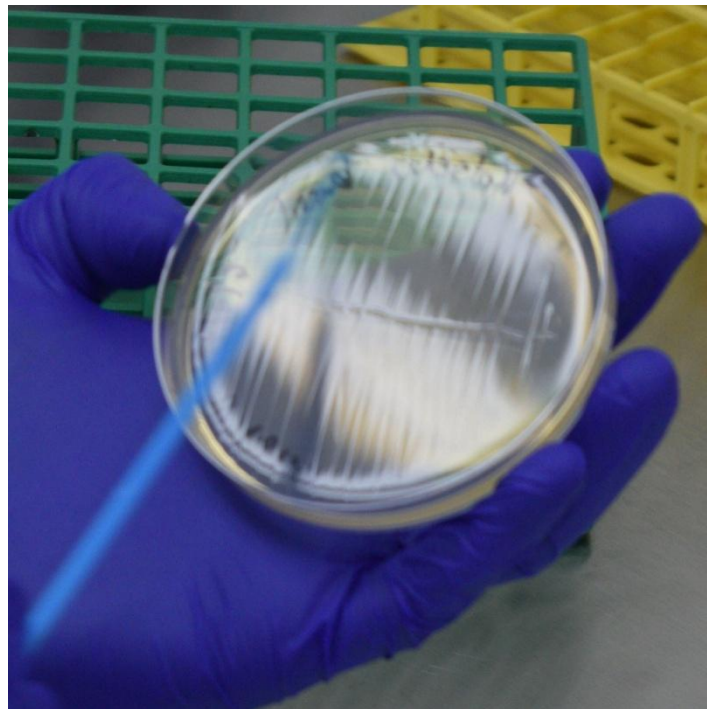


Figura 3 Método de estriado para asa de 1 μl (a): Cuantitativo, (b): Cualitativo.



Medio de cultivo Agar sangre de cordero 5% con técnica de estriado por arrastre



Medio de cultivo Agar Sabouraud con técnica de estriado cuantitativo con asa calibrada 1 μ l

Nombre del medio	Tipo del medio	organismos	Organismos comunes en cerveza
Agar Universal Cerveza (UBA)	Aerobios (puede ser usado anaerobio)	Levaduras Salvajes, Bacterias	Lactobacillus, Pediococcus, Acetobacter, Enterobacter
Diferencial Wallerstein (WLD)	Aerobios (puede ser usado anaerobio)	Levaduras Salvajes, Bacterias, mohos	Brettanomyces, cándidas, Saccharomyces salvajes, Lactobacillus, Acetobacter
Diferencial Schwarz (SDA)	Aerobios (puede ser usado anaerobio)	Bacterias	Acetobacter, bacillus, lactobacillus, enterobacter
Hsu lactobacillus y pediococos (HLP)	anaerobio	Bacteria	Lactobacillus y pediococos
Lin Levadura salvaje (LWYM)	aerobio	Levaduras salvajes	Saccharomyces tipo salvaje
Lin medio sulfato cúprico (LCSM)	Aerobio	Levadura salvajes	Levaduras salvajes No-Saccharomyces
Agar MacConkey	Aerobio	Enterobacter	Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Hafnia y Citrobacter

[Medios de cultivo usados en análisis de calidad en cerveza.](#)

PCR

PCR PAL: Lactobacillus y pediococos resistentes a lúpulo

Muestra de Cerveza

- 1) Transfiere 25ml de muestra a un tubo cónico de 50ml.
- 2) Centrifuga el tubo de 50ml durante 10 min s 3000 x g.
- 3) Decanta el sobrenadante del tubo de 50ml, cuidando no romper el sedimento.
- 4) Resuspender el sedimento en el tubo de 50 ml con 250 ul del Buffer A, mezclar hasta no ser visible.
- 5) Transferir 5ul del resuspendido generado en el tubo 50ml, al tubo PCR BrewPAL.
 - a. Solo abrir el Tubo de PCR para transferir la muestra, para evitar contaminación cruzada, solo abrir dentro de campana de flujo laminar.
- 6) Ingresar el Tubo de PCR BrewPAL en el Termociclador seleccionando el programa BrewPAL y seleccionar START RUN.

Muestra de Cerveza con Dry Hop

- 1) Transferir 5ml de muestra en un tubo cónico de 50ml con 45ml de Caldo MRS 1X
- 2) Incubar en una cámara anaerobia durante 24 hrs a 30 – 32 °C
- 3) centrifuga el tubo de 50ml durante 10 min s 3000 x g.
- 4) Decanta el sobrenadante del tubo de 50ml, cuidando no romper el sedimento.
- 5) Resuspender el sedimento en el tubo de 50 ml con 250 ul del Buffer A, mezclar hasta no ser visible.
- 6) Transferir 5ul del resuspendido generado en el tubo 50ml, al tubo PCR BrewPAL.
 - a. Solo abrir el Tubo de PCR para transferir la muestra, para evitar contaminación cruzada, solo abrir dentro de campana de flujo laminar.
- 7) Ingresar el Tubo de PCR BrewPAL en el Termociclador seleccionando el programa BrewPAL y seleccionar START RUN.

Análisis del Cassette de muestra.

- 1) Remover el tubo PCR del Termociclador y agregar 4 gotas de Buffer B directamente en el tubo PCR BrewPAL.
- 2) Transferir el contenido completo (200 ul) del Tubo PCR al Cassette de BrewPAL con una micropipeta.
- 3) Espera 2 min (+/- 15 seg).
- 4) Agregar 4 gotas de Buffer B, directamente en el cassette.
- 5) Esperar 1 min (+/- 15 seg) para recorrer el visor del cassette y realizar la lectura.

PCRSTAT: Saccharomyces cerevisae variedad diastatica

Muestra de Cerveza

- 1) Transfiere 25ml de muestra a un tubo cónico de 50ml.
- 2) Centrifuga el tubo de 50ml durante 10 min s 1800 x g.

- 3) Decanta el sobrenadante del tubo de 50ml, cuidando no romper el sedimento.
- 4) Re suspender el sedimento en el tubo de 50 ml con 250 ul del Buffer ACB, mezclar hasta no ser visible.
- 5) Transferir 100ul del re suspendido generado en el tubo 50ml, al tubo de digestión.
 - a. Solo abrir el Tubo para transferir la muestra, para evitar contaminación cruzada, solo abrir dentro de campana de flujo laminar.
- 6) Ingresar el Tubo de digestión en el Termociclador seleccionando el programa DIGEST y seleccionar START RUN.
- 7) Remover el tubo de digestión del termociclador
- 8) Transferir 5ul del tubo de digestión, procurando recuperar solo el sobrenadante superficial. Al tubo PCR BrewSTAT
- 9) Ingresar el Tubo PCR STAT en el Termociclador seleccionando el programa brewSTAT y seleccionar START RUN.

Muestra de levadura enriquecida con caldo nutritivo

- 1) Transfiere 1ml de muestra a un tubo cónico de 50ml que contenga 49ml de caldo.
- 2) Incubar 48 hrs 30-35c
- 3) Homogenizar la muestra y tomar 10 ml y trasferir a un nuevo tubo de 50 ml.
- 4) Centrifuga el tubo de 50ml durante 10 min s 1800 x g.
- 5) Decanta el sobrenadante del tubo de 50ml, cuidando no romper el sedimento.
- 6) Re suspender el sedimento en el tubo de 50 ml con 1 ml del Buffer ACB, mezclar hasta no ser visible.
- 7) Transferir 100ul del re suspendido generado en el tubo 50ml, al tubo de digestión.
 - a. Solo abrir el Tubo para transferir la muestra, para evitar contaminación cruzada, solo abrir dentro de campana de flujo laminar.
- 8) Ingresar el Tubo de digestión en el Termociclador seleccionando el programa DIGEST y seleccionar START RUN.
- 9) Remover el tubo de digestión del termociclador
- 10) Transferir 5ul del tubo de digestión, procurando recuperar solo el sobrenadante superficial. Al tubo PCR BrewSTAT
- 11) Ingresar el Tubo PCR STAT en el Termociclador seleccionando el programa brewSTAT y seleccionar START RUN.

Análisis del Cassette de muestra.

- 1) Remover el tubo PCR del Termociclador y agregar 4 gotas de Buffer B directamente en el tubo PCR BrewSTAT.
- 2) Transferir el contenido completo (200 ul) del Tubo PCR al Cassette de BrewPAL con una micropipeta.
- 3) Espera 2 min (+/- 15 seg).
- 4) Agregar 4 gotas de Buffer B, directamente en el cassette.
- 5) Esperar 1 min (+/- 15 seg) para recorrer el visor del cassette y realizar la lectura.

MALDI-TOF

Procedimiento estándar

Método de transferencia directa

Químicos requeridos

- Agua desionizada
- Acetonitrilo (ACN)
- Acido Trifluoroacético (TFA)
- MATRIX HCCA #8255344
- Solvente estándar (acetonitrilo 50%, agua 47.5%, TFA 2.5%) #19182
- Aplicador de madera, puntas de pipeta o asa de inoculación plástica.
- 50-1000 ul puntas y micro pipeta
- 2-200 ul puntas y micro pipeta
- 0.5-10 ul puntas y micro pipeta
- Plato de MALDI

Equipos requeridos

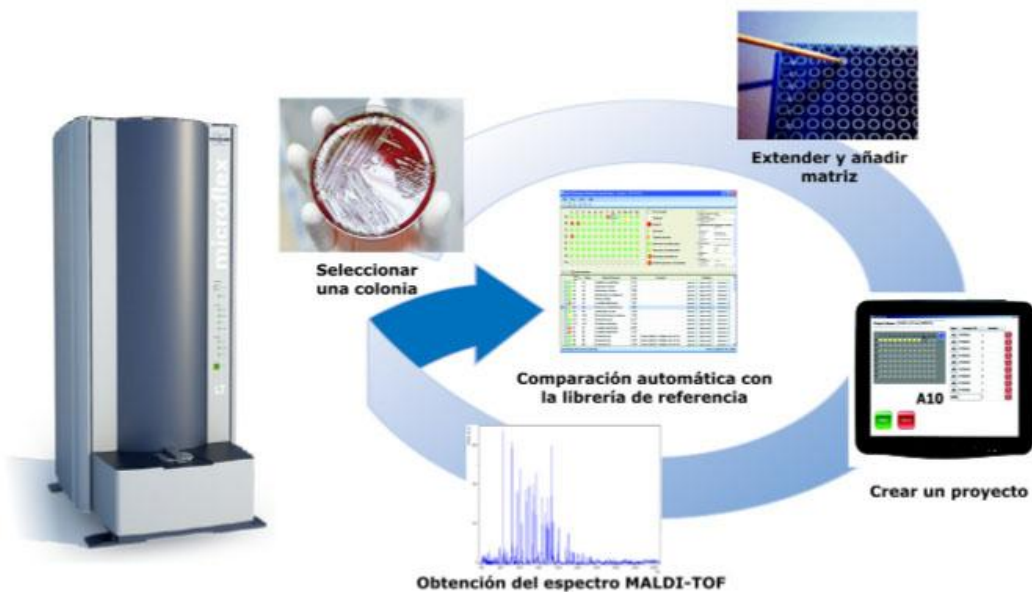
- Vortex

Preparación de solución Matrix HCCA

1. Agrega 250ul de solvente estándar al tubo de HCCA
2. Disolver el HCCA mediante vortex a temperatura ambiente hasta que la solución este clara.

Método de transferencia directa

1. Frotar el material biológico (Colonia simple) como un filme delgado dentro del punto de muestra en la placa MALDI
 - a. Usar solo una pequeña cantidad de material para transferencia directa.
2. Cubre el punto con 1 ul de solución HCCA y deje secar a temperatura ambiente.
3. Realice lectura en el equipo.



Control de levaduras

Conteo de Células y Viabilidad

Conteo de Células

Cerveza	Sin dilución
Cerveza fermentando	dilución 1:10 o 1:100
Barro de levadura	dilución 1:1000

Requisitos comunes de dilución para diversas fuentes de levadura.

Materiales

- Microscopio con un aumento mínimo de 400X para contar la levadura.
- Hemocitómetro
- Desliza el cubre objetos de hemocitómetro (más grueso que el cubreobjetos estándar)
- Pipetas de vidrio de punta fina
- Contador de mano
- Pipetas de transferencia
- Toallitas Kimwipes (o similar)
- Solución de azul de metileno 0.1%

Preparación de la muestra

1. El paso más crítico de este procedimiento es preparar una muestra debidamente diluida. Una muestra altamente concentrada puede ser demasiado difícil de contar, y una muestra muy diluida puede dar resultados erróneos. Desea menos de 100 células por campo de microscopio (5 x 5 cuadrados) a 400X. Asegúrate de anotar tu factor de dilución.
2. Al preparar la muestra, puedes usar agua destilada. Los grupos de levadura también producen imprecisiones. Si estás trabajando con una cepa altamente floculante, primero intente agitar violentamente. Si aún así no se rompe, es posible que debas usar una solución de H₂SO₄ al 0.5 por ciento en lugar de agua destilada o agrega EDTA, que unirá el calcio y permitirá que la levadura se separe. Para usar EDTA, centrifuga la levadura y elimina el líquido. Vuelve a agregar el mismo volumen de una solución de EDTA (100 g / L, 0.268 M) y procede con normalidad.
3. Si estás combinando el conteo de células con las pruebas de viabilidad de las células de levadura, tu etapa de dilución final debe ser mezclar 1 mililitro de su muestra de levadura con 1 mililitro de solución de azul de metileno. Mezcla y déjalo reposar

- durante aproximadamente uno o dos minutos antes de llenar la cámara del hemocitómetro. De nuevo, asegúrate de que la muestra esté bien mezclada.
4. Es imperativo que mezcles bien tu muestra (sin introducir burbujas). Una vez que hayas preparado la dilución correcta, mezcla la muestra invirtiendo y / o agitando durante varios minutos. Es posible que debas ventilar la muestra para evitar la acumulación de presión.
 5. Es importante que la muestra contenga la menor cantidad de burbujas de aire posible. De gas si es posible.

Azul de Metileno (MB)

El azul de metileno está disponible en muchas formas y grados. Generalmente puedes comprarlo en función del precio y la comodidad. Para preparar una solución madre a partir de polvo:

1. Pesar 0,1 gramos de azul de metileno y colocar en un recipiente.
2. Agrega agua destilada hasta un volumen final de 100 mililitros.
3. Haz girar la botella para disolver el polvo.
4. Esta es una solución de azul de metileno al 0.1 por ciento.

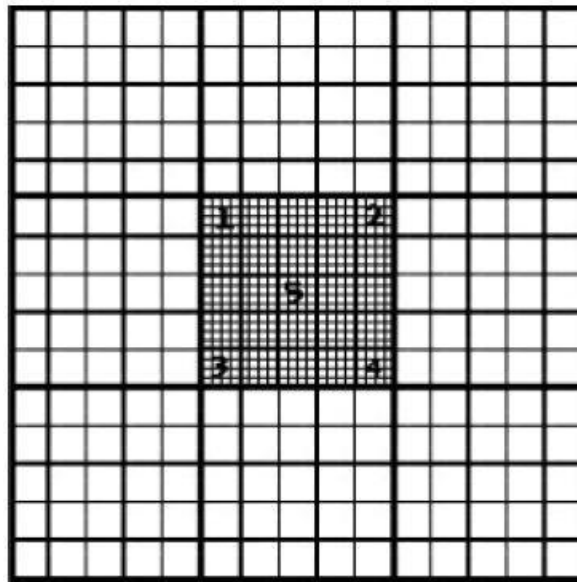
Mezcla o compra una solución madre de azul de metileno (0.1%). Cuando diluyas la levadura para el conteo de células, agrega 1 mililitro de tu muestra de levadura a 1 mililitro de azul de metileno como tu paso final. Mezcla y déjalo reposar durante aproximadamente uno o dos minutos antes de llenar la cámara del hemocitómetro. Las células muertas se tiñen de azul oscuro, ya que no pueden metabolizar el tinte intruso. Las células de color azul pálido y las células brotando que se tiñen de azul no están muertas.

Procedimiento

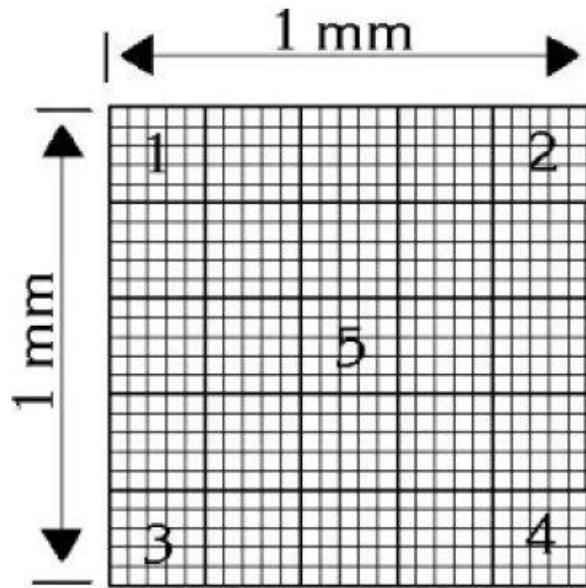
1. Asegúrate de que tu hemocitómetro esté limpio y seco antes de su uso. Puedes limpiarlo con agua. Si es necesario, puedes frotar suavemente la cámara de recuento con una toallita sin pelusa (Kimwipe), pero un enjuague adecuadamente después de cada uso evitarás que tengas que fregar la cámara.
2. Coloca un cubreobjetos de manera que el vidrio cubra ambas áreas de conteo por igual.
3. Coloca la punta de una pipeta de vidrio en el líquido de muestra, y deja que se llene por acción capilar (extendido hacia arriba automáticamente). Seca todo exceso de la punta en una toalla de papel antes de llenar la cámara del hemocitómetro. Coloca suavemente la punta de la pipeta en el borde de la cámara en el corte grabado y dispensa. Ten cuidado de no llenar demasiado la cámara; la muestra no debe fluir al foso. Si la cámara muestra burbujas de aire, tiene áreas secas (insuficientemente llenas) o está desbordando, debes limpiar el hemocitómetro y comenzar de nuevo.
4. Coloca con cuidado el hemocitómetro en la platina del microscopio. Comienza con un aumento bajo para centrar el hemocitómetro. Trabaja hasta 400 aumentos, teniendo en cuenta la distribución de las células de levadura en la cámara. Si las

celdas aparecen distribuidas uniformemente, puedes usar el método de recuento de células corto. Si las células aparecen agrupadas, es posible que debas utilizar el método de conteo de células largo o preparar otra muestra. Si parece que tienes muy pocas células o más de 100 células por cuadrícula pequeña de 5 x 5, entonces debes preparar una nueva muestra. Idealmente, debería haber aproximadamente 50 células por cuadrícula pequeña de 5 x 5.

5. Contarás las células en los cuadrados ubicados centralmente dentro del área de 1 mm² trazada en la cámara. Es útil establecer un protocolo de conteo para todos los conteos de células. Por ejemplo, no contamos células tocando o situadas en las líneas del límite superior e inferior, mientras que sí contamos las células que tocan o se encuentran en la parte inferior o en las líneas fronterizas izquierdas. Consideramos que los brotes de células de levadura emergen de las células madre solo si el brote tiene al menos la mitad del tamaño de la célula madre.
6. Si se realiza el conteo de viabilidad, las células muertas se teñirán de azul oscuro, ya que no pueden metabolizar el tinte intruso. Las células de color azul pálido y las células en ciernes que se tiñen de azul no están muertas. Si estás realizando un conteo de células y un recuento de viabilidad simultáneamente, es mejor contar todas las células (tanto vivas como muertas) en el contador del dispositivo portátil y registrar células muertas anotadas en un conteo escrito o en un segundo dispositivo de conteo.



Rejilla de conteo, números agregados.



Rejilla de conteo magnificada, números agregados.

Método de conteo corto, para celdas uniformemente distribuidas

1. Cuenta las células dentro de los 5 cuadrados numerados (Figuras 1 y 2).
2. Hay 25 de estas cuadrículas más pequeñas. Para estimar el número total de celdas en toda la grilla, multiplica las 5 grillas contadas por 5.
3. Toda la cámara contiene una cantidad precisa de líquido, 1 / 10,000 mililitros. Para calcular cuántas células habría en un mililitro, multiplica el total de células en la cuadrícula por 104 (o 10,000).
4. La fórmula es: **Células de levadura/mililitro = células contadas x 5 x factor de dilución x 104**

Por ejemplo, si diluiste la levadura en un factor de 200 y contaste 220 células dentro de los 5 cuadrados numerados, calcularías:

Células de levadura/mililitro = 220 x 5 x 200 x 10,000 = 2,200,000,000 o 2.2 billones de células/mililitro

Método de conteo largo, para células distribuidas de forma despareja

1. Cuenta las células dentro de los 25 cuadrados (Figuras 6.18 y 6.19). Esta es la cantidad total de células en toda la grilla.
2. Toda la cámara contiene una cantidad precisa de líquido. Para calcular cuántas células habría en un mililitro, multiplica el total de células en la cuadrícula por 104 (o 10,000).
3. La fórmula es: **Células de levadura/mililitro = células contadas x factor de dilución x 104**

Por ejemplo, si diluyes la levadura por un factor de 200 y contabilizas 1.100 células dentro de los 25 cuadrados, deberías calcular:

Células de levadura/mililitro = 1,100 x 200 x 10,000 = 2,200,000,000 o 2.2 billones de células/mililitro

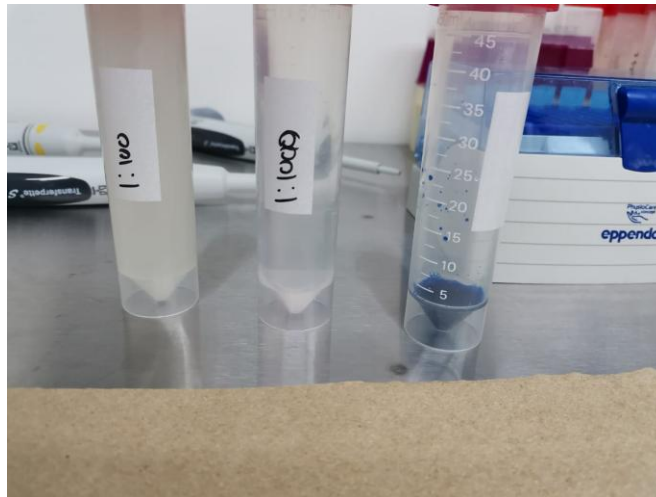
Cálculo de viabilidad.

La fórmula para calcular la viabilidad:

Viabilidad% = (total contado - recuento de células muertas) / total contado x 100

Suponiendo que contáramos 35 muertas de nuestras 1,100:

Viabilidad% = (1,100 - 35) / 1,100 x 100 = 96.8%



Diluciones para medición de Viabilidad



Uso de microscopio Óptico para conteo de células y viabilidad

Capítulo 4

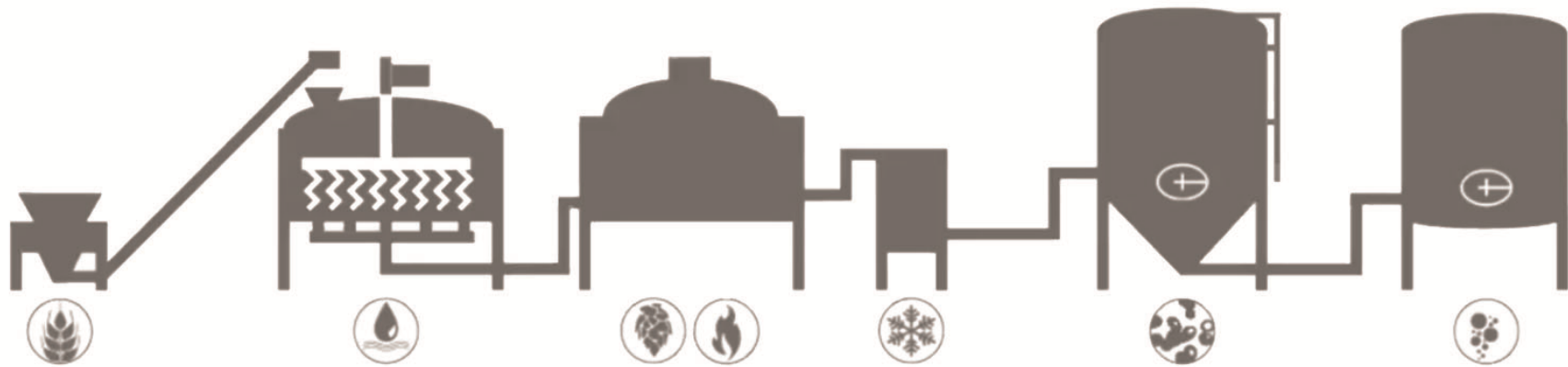
Resultados

Selección de candidatos para muestras

Para determinar posibles candidatos para el proyecto, se busco el apoyo de la asociación de cerveceros de Mexicali, para poder obtener la información general de los productores en la región. Lamentablemente por cuestiones de la pandemia el acercamiento mediante la asociación fue muy lento, por lo cual se inicio el acercamiento individual de los productores, esperamos tener un acercamiento con por lo menos el 80% de los productores con permiso en la asociación.

Cervecería	Tipo de Permiso	Muestreada
Cervecería Once Perros	Artesanal	Si
686	Comercial	Contactados
Amante	Artesanal	Si
Averno	Artesanal	No
Brew Capital	Artesanal	Contactados
Coralillo	Artesanal	Si
Fauna	Artesanal	Contactados
Ícono	Artesanal	Contactados
Juguete	Comercial	No
Legión	Artesanal	Si
Mandala	Comercial	No
Muxa	Comercial	No
Puerco Salvaje	Artesanal	Si
Rival	Comercial	No
San Felipe Brewing	Artesanal	No
Urbana	Artesanal	Contactados
Cerveza Valle	Artesanal	No

Relación de permisos de cervecerías entro de la asociación de cerveceros de Mexicali



MOLIDO

Se aumenta la superficie de contacto para exponer los azúcares

MACERADO

Se agrega agua caliente para iniciar la activación de enzimas, llevar a cabo la sacarificación y disolver los azúcares

HERVOR

hierve el mosto para su esterilización, incrementar la concentración de azúcares, se adicionan los lúpulos y se retiran los sustratos

ENFRIADO

El mosto caliente pasa por un intercambiador de placas, reduciendo su temperatura a temperatura de fermentación. Este es un punto crítico de

FERMENTACIO

Ales y Lagers: se enfria el mosto rapidamente y se tranfiere a fermentadores, donde se inocula con la levadura que se dese utilizar segun el perfil.

ABRILLANTADO

Maduración en frio, para permitir el ajuste de compuestos secundarios, sedimentación de levaduras y finalmente carbonatación.

CONTAMINANTES

Bacillus
Flavobacterium
Alcaligenes
Pseudomonas

Enterobacteriaceae
Actinomycetales
Lactobacillus
Acetobacteriaceae

Candida
Debaryomyces
Hansenula
Hanseniaspora
Rhodotorula
Sporobolomyces
Trichosporon

Penicillium
Aspergillus
Alternaria
Fusarium
Epicoccum
Cladosporum
Botrytis
Aureobasidium
Absidia

Enterobacteriaceae

Obesumbacterium
Rhanelia aquatilis

Lactobacillus
Pediococcus

Saccharomyces

Selenomonas
Micrococcus
Zymomonas
Acetobacter
Gluconobacter

Lactobacillus
Pediococcus
Pectinatus
Megasphaera
Zymophilus

Saccharomyces
Hansenula
Pichia
Hanseniaspora
Torulopsis
Schizosaccharomyces
Brettanomyces
Candida

Diagrama de proceso de producción con relación a contaminantes específicos de la cerveza.

Bitácora de pruebas realizadas en el laboratorio El Dorado.

➤ 3/sep

- Recepción de muertas, Cervecería #1
 1. Agua Intercambiador de placas
 2. kolsh Botella
 3. Gr.Dns Barril
 4. Heffe Fermentador
 5. Irish Barril
 6. Irish Fermentador
 7. Kolsh Barril
- Se realizaron Pruebas PCR con metodología BREWPAL (anexos), para muestras de Cervecería #1
- Inoculación en caldo Cerebro Corazón del Centrifugado de muestras, (2 ml /3500RPM x10mins)
- Recepción de muestras, Cervecería #2
 1. Blonde
 2. BrownAle
- Se realizo PCR con Metodología BREWPAL para Muestras de Cervecería #2

➤ 4/sep

- Se preparo Caldo Lactosado para inoculación de muestra 3 de Cervecería #1 Como se indica en metodología PCR BREWPAL Dryhop

➤ 5/Sep

- Sembrado de Placas en medios Sangre5% y Sabouraud sin adiciones, (Muestras 1 a 7)
- Cultivo caldo lactosado para PCR BREWPAL dryhop de muestra 3

➤ 6/Sep

- Se realizo Prueba PCR BREW PAL método Dryhop en muestra 3
- Se inocularon placas Sabouraud, Mc.Conkey y Agar Soya Trypticaseina y caldo Cerebro corazón.

➤ 7/Sep

- Identificación de colonias en placas positivas mediante Espectrómetro de Masa, MALDI-TOF (metodología en anexos).

➤ 16/Sep

- Recepción de muestras de Cervecería #3

Muestra	Filtrado	Pasterizado	Dryhop
1-Citrica	No	No	Si
2-Brown etiqueta	Si	Si	No
3-Brown sin Etiqueta	Si	No	No

- Las muestras de Brown son del mismo lote, pero se tomo una muestra antes de meter a pasterizar el lote
- Cultivos en placas de muestras 1 a 3.

Mc Conkey	Cualitativo (arrastre)
Soya Trypticaseina	Cualitativo (arrastre)/Cuantitativo (Cuadrícula) (metodología en anexo)

- Cultivo en caldo lactosado para muestra 1, metodología Dryhop BREWPAL
- PCR BREWPAL muestras 2 y 3

➤ 17/Sep

- PCR BREWPAL Dryhop a cultivo de muestra 1
- Identificación Molecular de placas positivas.(24hrs)

Placa	Soya Trip.	Mc Conkey
1	bacillus cereus (2000 UCF)	Negativa
2	Negativa	Negativa
3	b. oceanisediminis (1000 UCF)	Negativo

➤ 21/Sep

- Recepción de muestras Cervecería #4

	Pale Ale	Blonde	Porter
Fermentador	Si	Si	Si
Botella	Si	Si	Si
TAP	Si	Si	No

- Las muestras son del mismo lote pero se tomaron en diferentes puntos de producción
- Cultivos en placas de muestras

Mc Conkey	Cualitativo (arrastre)
Soya Trypticaseina	Cualitativo (arrastre)/Cuantitativo (Cuadrícula) (metodología en anexo)

- Cultivo en caldo lactado para muestra de Pale Ale de Fermentador para PCR BREWPAL Dryhops

➤ 22/Sep

- PCR BREWPAL Dryhop del cultivo de Pale ale fermentador.
- Identificación de placas con espectrómetro de masas, placas Soya Trip. Fermentador.

Porter Fermentador	Candida Krusei	20000 UFC
Pale Ale Fermentador	Candida Krusei	1000UFC
	paenibacillus favisporus	1000UFC
Blonde Fermentador	enterobacter asburiae	3000 UFC

➤ 1/Oct

- Se adquirió muestra de control de levadura para producción de Cerveza, de la compañía White Labs, tipo WLP001 Lote#11413620 con fecha de caducidad FEB/14/21
Se inoculo la muestra en Placas Sabouraud (Estriado Cuantitativo), Caldo Cerebro/Corazón (4ml/15ml) y Caldo de enriquecimiento para metodología de PCR BREWSTATS (anexos) (1ml/49ml)

➤ 3/Oct

- Identificación de placas mediante uso de Espectrómetro de masa, muestra de control WLP001.
No se detecto ningún contaminante externo en la muestra, se identifico en toda de placa crecimiento de saccharomyces cerevisiae.

➤ 5/Oct

- Se realizo Prueba PCR BREWSTATS del caldo de enriquecimiento, muestra WLP001, según metodología.
se obtuvo resultado negativo para saccharomyces cerevisiae variedad Diastática.
- Ingresas muestras de levaduras adquiridas por Cervecería #5, del proveedor Imperial Yeast y una levadura interna de la cervecería.

1. A09
2. A34
3. OSLO

- Se realizan los siguientes Cultivos

Cultivos	#1	#2	#3
Mc conkey	Negativo	Negativo	Negativo
Sangre	Negativo	Negativo	Negativo
SB	Negativo	Negativo	Negativo
PCR/STATS	Negativo	Positivo	Positivo

- Los resultados de las placas en negativo son específicos para contaminantes externos clásicos, se detecto Saccharomyces Cerevisiae en las 3 muestras
Se contacto al proveedor de levaduras para que se corrobore los resultados de dichos lotes, se comento que en la planta utilizan los mismos métodos e prueba y se espera actualización del problema.

➤ 21/Oct

- Se decidió tomar muestras de otras partes del estado para tener un punto de comparación regional. Se inicio con muestreos aleatorios de cervecerías artesanales en Ensenada Baja California, y 2 muestras nacionales (Monterrey NL y Guadalajara Jalisco)

Prueba/Muestra	ENS1	ENS2	ENS3	ENS4	ENS5	ENS6	NAC1	NAC2
Mc Conkey	Neg.	Neg.	Neg.	Neg	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Sangre	Neg.	Neg.	Neg.	Neg	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
PCR PAL	Neg.	Neg	Neg.	21 UCF	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

➤ 27/Oct

- Continuando con la realización de pruebas fuera de Mexicali, se realizo una primera visita presencial a Tijuana B.C y a Ensenada B.C, para ofrecer pruebas a productores de cerveza artesanal de la región, y comentar sobre los resultados preliminares que se están observando, se recolectaron muestras en Tijuana y se logro crear un proyecto de monitoreo con algunos cerveceros en Ensenada, por lo cual se analizaron otros productos de esta cervecería.

P/M	TJ1	TJ2	TJ3	TJ4	TJ5	TJ6	ENS7	ENS8	ENS9	ENS10	ENS11
Mc C	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Sng	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
PCR PAL	-	NA	NA	-	NA	-	NA	-	9UCF	NA	-
PCR STATS	NA	NA	+	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

*La muestra TJ5, dio positivo a Psudomona monteilii

*La muestra ENS9 dio positivo para Lactobasilos y pediococos, en nivel de contaminación 1 de 5 niveles, se considera un valor permitido.

Casos de Estudio

Cervecería #1

Descripción del Usuario.

Cervecería Artesanal con equipo casero, no industrial. Su volumen de producción por batch aproximado es entre 32gal a 64 gal, cuentan con instalaciones dedicadas para el proceso y la venta del producto, el producto se vende en Tap, Barriles y botellas. Su proceso de fermentación es realizado en un cuarto a temperatura de 23 C con fermentadores de plástico.

Pruebas y Resultados

Muestra	PCR BrewPAL	Cultivos Cuantitativos	Microorganismos
Agua Intercambiador	Negativo	50,000 UFC/ml	-Pseudomonas Auriginosa -Citrobacter Freundii -Klebsiella Penumoniae
Kolsch Botella	>1000 Cell/ml	10,000 UFC/ml	Bacillus Cereus
GD Botella	Negativo	100,000 UFC/ml	-Klebsiella Penumoniae -Enterobacter Cloacae -Escherichia Hermannii
Hefe Fermentador	Negativo	50,000 UFC/ml	Enterobacter Cloacae
Irish Barril	Negativo	10,000 UFC/ml	Pseudomonas Aeruginosa
Irish Fermentador	>1000 Cell/ml	1,000 UFC/ml	Enterobacter asburiae
Kolsch barril	>1000 Cell/ml	10,000 UFC/ml	Enterobacter Cloacae Bacillus Megaterium Bacillus Oceanisedeiminis

Pruebas y resultados de Cervecería #1

Recomendaciones

- Las recomendaciones iniciales fueron deshacerse de todo el material plástico en su proceso, (mangueras, recipientes y fermentadores), pues la bio película que se puede formar en la porosidad de estos materiales puede ser un principal foco de contaminación.
- Se le invito a proporcionarnos sus metodologías de limpieza para revisarlas con detenimiento para verificar si existe algún error.
- Se le indico la metodología apropiada para limpieza en sitio (CIP).
- Se detectaron errores en la instalación y arreglo de sus equipos, específicamente su intercambiador de placas, el cual detectamos como fuente de contaminación.

Cervecería #2

Descripción del Usuario.

Cervecería Artesanal pequeña, tiene equipos de acero inoxidable y fomentadores de plástico. Se tomaron muestras de botellas, pues al momento de la visita se estaba instalando en la nueva instalación.

Pruebas y Resultados

1. Blonde
2. BrownAle

Se realizó PCR con Metodología BREWPAL para Muestras de Cervecería #2, se obtuvieron niveles de contaminación 5, arriba de 1000 Cell/ml, se realizaron cultivos cuantitativos pero no se realizó la identificación de las muestras.

Recomendaciones

- Las recomendaciones iniciales fueron deshacerse de todo el material plástico en su proceso, (mangueras, recipientes y fermentadores), pues la bio película que se puede formar en la porosidad de estos materiales puede ser un principal foco de contaminación.
- Se le invito a proporcionarnos sus metodologías de limpieza para revisarlas con detenimiento para verificar si existe algún error.
- Se le indico la metodología apropiada para limpieza en sitio (CIP).

Cervecería #3

Descripción del usuario

Cervecería artesanal con equipo industrial, una de las cervecerías más grandes de Mexicali, cuenta con un espacio dedicado para la producción y otro espacio dedicado para la venta del producto, el producto se distribuye en Tap, Barriles y botellas. Todo su proceso es realizado en Acero inoxidable Serie 300, y cuentan con un equipo de pasterización para botellas.

Pruebas y Resultados

Muestra	Filtrado	Pasterizado	Dryhop
1-Citrica	No	No	Si
2-Brown etiqueta	Si	Si	No
3-Brown sin Etiqueta	Si	No	No

Descripción de Muestras

Muestra	PCR PAL	Cultivos Cuantitativos	Microorganismos
1-Citrica	>1000 Cell/ml	1000 UFC/ml	Bacillus Cereus
2-Brown etiqueta	Negativo	Negativo	
3-Brown sin Etiqueta	Negativo	1000 UFC/ml	Bacillus Oceanisedeiminis

Pruebas y resultados de Cervecería #3

Recomendaciones

- La solución de la cervecería de utilizar pasterización en su botella con producto terminado, es una opción solo para solo algunos de los estilo de cerveza pues existe un daño a las características organolépticas del producto.
Al igual que solo puede ser aplicado a su producción en botella y no a su producción que queda en el barril y fermentadores.
- Se le propuso a la cervecería apoyo para la revisión de sus procesos de limpieza en sitio (CIP) muestreando los puntos críticos de proceso, con cultivos después de limpieza para determinar si se está realizando correctamente.
- Se les realizaron algunas observaciones en las instalaciones de la planta y proceso. Relacionadas con los flujos de aire y polvo exteriores a la planta, pues esta junto a una avenida principal. Y sus contaminantes principales son originados por polvo.

Cervecería #4

Descripción del usuario

Cervecería artesanal con equipo industrial, se encuentra entre las cervecerías más grandes de Mexicali, cuenta con un espacio dedicado para la producción y otro espacio dedicado para la venta del producto en el mismo terreno, el producto se distribuye en Tap, Barriles y botellas. Todo su proceso es realizado en Acero inoxidable Serie 300.

Pruebas y Resultados

En la etapa de muestreo, el usuario nos permitió el ingreso a todo su proceso y se le propuso una evaluación del producto en todos sus puntos críticos. Fermentadores, botella, y punto de venta. Se muestrearon 3 estilos, los cuales eran de su mismo lote en las 3 etapas respectivamente.

Muestra	PCR	Cultivos Cuantitativos	Microorganismos
Pale Ale Fermentador	PAL (+):71 Cell/ml STATS(+): var.diastatico	20,000 UFC/ml	Candida Krusei
Pale Ale Botella	NA	1,000 UFC/ml	Candida Krusei
Pale Ale Tap	NA	Negativo	
Blonde Fermentador	PAL(+): 80 Cell/ml STATS(+): var.diastatico	5,000 UFC/ml	Candida Krusei
Blonde Botella	NA	Negativo	
Blonde Tap	NA	Negativo	
Porter Fermentador	PAL(+):40 cell/ml STATS(+):var.diastatico	10,000 UFC/ml	Candida Krusei
Porter Botella	NA	1,000 UFC/ml	Candida Krusei

Recomendaciones

- Se detectaron 2 grandes contaminaciones en la cervecería, la levadura salvaje *Candida Krusei* y la Levadura *Saccharomyces Cerevisiae* var. Diastáticos.
- Se apoyo al equipo de trabajo de la planta revisando cuidadosamente su metodología de limpieza, con una recomendación inicial de duplicar las concentraciones de los productos químicos usados, pues el proveedor da un margen amplio y vago en su uso, con el fin de controlar la contaminación persistente de levaduras salvajes.
- Así mismo realizar limpieza a la planta, para retirar remanentes de polvo que se puedan encontrar.
- La variedad diastática del *saccharomyces cerevisiae*, no es común en el ambiente, por lo cual es un problema que están arrastrando directamente de su proveedor de inóculo.
- Se les explico las diferentes técnicas que existen para la propagación saludable de levaduras y se les recomendó cambiar a un proveedor de levaduras liofilizadas y preparar sus propias propagaciones.
- Se propuso una revisión de limpieza de superficie después de los cambios en la metodología, para confirmar si la nueva concentración es apropiada para el nivel de suciedad del equipo.

Cambios realizados

Se realizo un hisopado de la superficie interna del fermentador después del proceso de limpieza, con un hisopo de transporte de muestra con medio Stuart, el cual se utilizo para inocular caldo nutritivo cerebro-corazón y se incubo por 48hrs, esperar crecimiento, el resultado fue negativo. Lo cual nos indica que la superficie se encuentra libre de contaminante y la limpieza se realizo correctamente después de los cambios en la concentración.

La cervecería adquirió 2 tipos de levadura liquida con un proveedor extranjero. El laboratorio Imperial Yeast, se nos proporcionaron las levaduras nuevas sin romper los sellos y analizamos para detectar *saccharomyces* variedad diastáticos y otros contaminantes.

Muestra	PCR STATS	Cultivo Cuantitativo
A09	Negativo	Negativo
A34	Positivo	Negativo

[Pruebas y resultados de Cervecería #4](#)

Cervecería #5

Descripción del usuario

Cervecería artesanal con equipo industrial, primer permiso de cerveza artesanal en baja california. Cuenta con espacios dedicados para venta y para producción, las instalaciones fueron remodeladas recientemente. Su producto se encuentra en barril, latas y venta en TAP, y todo su proceso se realiza en acero inoxidable serie 300.

Pruebas y Resultados

Se les invito a participar en los análisis, pero por problemas de la contingencia sanitaria su producción estaba parada casi en su totalidad.

Junto a la cervecería#4 adquirió levaduras nuevas del proveedor Imperial Yeast y se procedió a realizar el análisis de una levadura recién adquirida y una levadura recuperada de un fermentador activo.

Muestra	PCR STATS	Cultivo Cuantitativo
A07	Negativo	Staphylococcus Epidermidis
Oslo	Positivo	Negativo

Pruebas y resultados de Cervecería #5

Se contacto directamente al proveedor para dar aviso de la contaminación del producto, se verifico con el proveedor que se utilizo análisis de PCR con equipos de la compañía biomeriux y nos hicieron saber que ellos utilizaban la misma tecnología. Se nos solicito repetir la prueba y el resultado fue positivo nuevamente. El usuario y el proveedor llegaron a un acuerdo.

Cervecerías Foráneas

Descripción del usuario

Se decidió obtener datos externos a Mexicali, para comparar el estado de la calidad en cervecerías artesanales en Baja California. Se decidió tomar algunas muestras de cervecerías en Ensenada, Baja California y en Tijuana, Baja California.

Muestra	PCR	Cultivos Cuantitativos	Microorganismos
ENS1 (Blonde)	PCR PAL (-)	-	
ENS2 (IPA)	PCR PAL (-)	-	
ENS3 (Lager)	PCR PAL (-)	-	
ENS4 (Pale ale)	PCR PAL (+): 21 cell/ml	-	
ENS5 (Light ale)	PCR PAL (-)	-	
ENS6 (Imp. Stout)	PCR PAL (-)	-	
TJ 1 (Porter)	PCR PAL (-)	-	
TJ 2 (Hoppy w.)	NA	-	
TJ 3 (Cream coffe)	PCR STATS (+)	-	
TJ 4 (Cream Orange)	PCR PAL (-)	-	
TJ 5 (IPA)	NA	+	Pseudomona monteillii
TJ 6 (IPA)	PCR PAL (-)	-	
Nac 1 (Gdl)	PCR PAL (-)	-	
Nac 2 (NL)	PCR PAL (-)	-	

Pruebas y resultados de Cervecerías Foraneas

Los resultados fueron entregados a las respectivas cervecerías y se intento un acercamiento directo con algunas.

Cervecería Ens #1

Descripción del usuario

Cervecería artesanal, con equipo industrial, cuenta con sistemas semi-automatizados, en todo su proceso, cuentan con un espacio dedicado para la venta y para la producción, se encuentran ubicados en una nave industrial. Es una de las 3 cervecerías más grandes de ensenada.

Pruebas y Resultados

Las muestras ENS2 y ENS6 son de la cervecería Ens # 1, el usuario solicito nuevas muestras para verificar la estabilidad del producto que esta enlatando, pues parte de su producción sale del estado y le gustaría tener forma de verificar si su producto es estable en mostrador.

Muestra	PCR	Cultivos Cuantitativos	Microorganismos
ENS7 (IPA)	NA	-	
ENS8 (Lager)	PCRPAL(-)	-	
ENS9 (Hoppy)	PCRPAL(+): 9 Cell/ml	-	
ENS 10 (California)	NA	-	

Pruebas y resultados de Cervecería Ens #1

Recomendaciones

- El usuario utiliza levaduras liofilizadas, y realiza sus recapturas para futuras propagaciones de los lotes subsecuentes. Se le recomendó la aplicación de conteo de levaduras para determinar los volúmenes de adición de lodos y evitar una falta o exceso de células en sus fermentaciones.
- Se le recomendó realizar manuales con sus procedimientos internos, y seguir utilizado la metodología actual pues está obteniendo resultados aceptables.
- Se le ofreció asesoría en temas de microbiología, para futuras dudas.

TABLA DE ANALISIS DE CERVEZA ENSENADA Y TIJUANA

Muestra	PCR	Cultivos Cuantitativos	Microorganismos
ENS1 (Blonde)	PCR PAL (-)	-	
ENS2 (IPA)	PCR PAL (-)	-	
ENS3 (Lager)	PCR PAL (-)	-	
ENS4 (Pale ale)	PCR PAL (+): 21 cell/ml	-	
ENS5 (Light ale)	PCR PAL (-)	-	
ENS6 (Imp. Stout)	PCR PAL (-)	-	
ENS7 (IPA)	NA	-	
ENS8 (Lager)	PCR PAL (-)	-	
ENS9 (Hoppy)	PCR PAL (+): 9 Cell/ml	-	
ENS 10 (California)	NA	-	
TJ 1 (Porter)	PCR PAL (-)	-	
TJ 2 (Hoppy w.)	NA	-	
TJ 3 (Cream coffe)	PCR STATS (+)	-	
TJ 4 (Cream Orange)	PCR PAL (-)	-	
TJ 5 (IPA)	NA	+	<i>Pseudomona montelii</i>
TJ 6 (IPA)	PCR PAL (-)	-	
Nac 1 (Gdl)	PCR PAL (-)	-	
Nac 2 (NL)	PCR PAL (-)	-	



TABLA DE ANALISIS DE CERVEZA EN MEXICALI

Muestra	PCR	Cultivos Cuantitativos	Microorganismos
Agua Intercambiador	Negativo	50,000 UFC/ml	- <i>Pseudomonas Auriginosa</i> - <i>Citrobacter Freundii</i> - <i>Klebsiella Penumoniae</i> <i>Bacillus Cereus</i>
Kolsch Botella	>1000 Cell/ml	10,000 UFC/ml	
GD Botella	Negativo	100,000 UFC/ml	- <i>Klebsiella Penumoniae</i> - <i>Enterobacter Cloacae</i> - <i>Escherchia Hermannii</i> <i>Enterobacter Cloacae</i>
Hefe Fermentador	Negativo	50,000 UFC/ml	
Irish Barril	Negativo	10,000 UFC/ml	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> <i>Enterobacter asburiae</i>
Irish Fermentador	>1000 Cell/ml	1,000 UFC/ml	
Kolsch barril	>1000 Cell/ml	10,000 UFC/ml	<i>Enterobacter Cloacae</i> <i>Bacillus Megaterium</i> <i>Bacillus Oceaniseideminis</i> <i>Bacillus Cereus</i>
Citrica	>1000 Cell/ml	1000 UFC/ml	
Brown filtrada y pasterizada	Negativo	Negativo	
Brown filtrada	Negativo	1000 UFC/ml	<i>Bacillus Oceaniseideminis</i>
Pale Ale Fermetador	PAL (+):71 Cell/ml STAT(+): var.diastatico	20,000 UFC/ml	<i>Candida Krusei</i>
Pale Ale Botella	NA	1,000 UFC/ml	<i>Candida Krusei</i>
Pale Ale Tap	NA	Negativo	
Blonde Fermentador	PAL(+): 80 Cell/ml STAT(+): var.diastatico	5,000 UFC/ml	<i>Candida Krusei</i>
Blonde Botella	NA	Negativo	
Blonde Tap	NA	Negativo	
Porter Fermentador	PAL(+):40 cell/ml STAT(+):var.diastatico	10,000 UFC/ml	<i>Candida Krusei</i>
Porter Botella	NA	1,000 UFC/ml	<i>Candida Krusei</i>

- Todas las identificaciones de microorganismos fueron realizadas con MALDI-TOF en el sistema MALDI Biotyper de la compañía Bruker.
- Todas las pruebas de PCR se realizaron en el termociclador del sistema Veriflow de la compañía Biomeriux.

Resumen comparativo de las pruebas realizadas a cervecerías artesanales en Baja California

Planta piloto

Dada las condiciones actuales de la pandemia, y las diferentes dificultades que genera ingresar a una empresa privada y monitorear sus procesos, se decidió crear una planta piloto para implementar las recomendaciones sugeridas a los procesos en las mismas circunstancias de las plantas de Mexicali.

Descripción de planta piloto.

Se adecuó un espacio de 6m X 12m con para funcionar como bodega, dentro se encuentra un cuarto frío de 4m x 3m.

Se adquirió equipo de acero inoxidable serie 300

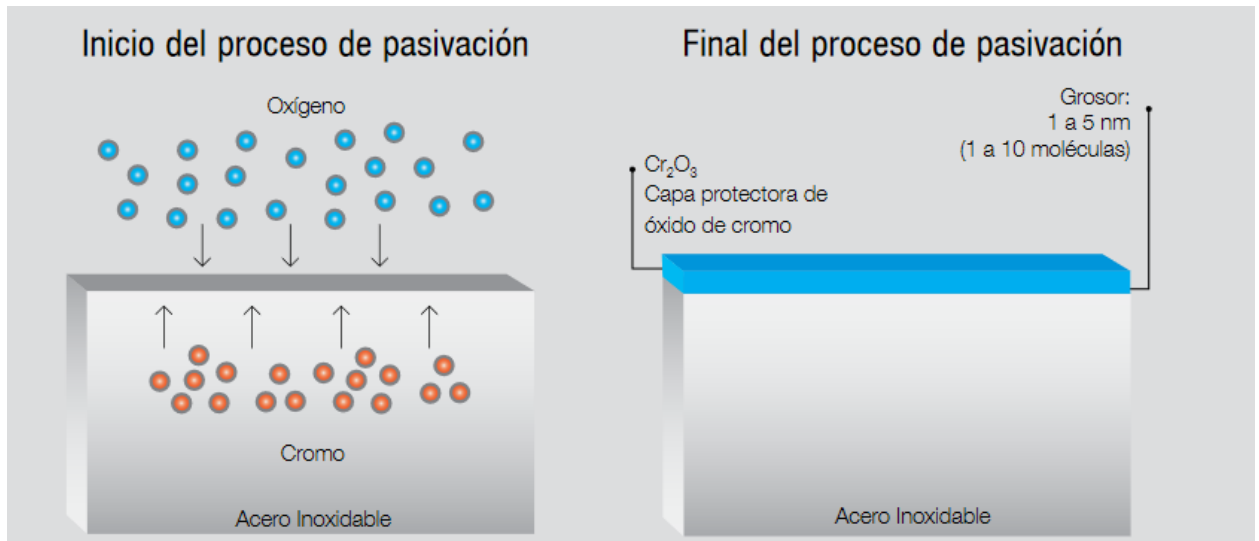
- Fermentador con chaqueta superior,
- Tanque de abrillantamiento con cono,
- Olla de hervor de acero inoxidable de capacidad de 600 lts
- 2 ollas de macerado con fondo falso, acero inoxidable con capacidad de 200lts
- Intercambiador de calor con 90 placas
- Accesorios con conexión tipo tri-clam.
- 2 Bombas de 1HP con carcasa de acero inoxidable.

Pasivado y Limpieza en sitio de equipos adquiridos

Antes de utilizar cualquier equipo de acero inoxidable para aplicaciones alimentarias, es necesario realizar un lavado agresivo para retirar cualquier imperfección o suciedad persistente. Este proceso se denomina Pasivado y es realizado de la misma manera que se realiza la limpieza de los equipos en sitio, solo con variaciones en las concentraciones de los químicos.

La primera parte del pasivado requiere retirar la capa exterior de óxido de cromo, mediante un ataque ácido. Esto ayudará a remover cualquier imperfección o incrustación existente en el metal. La segunda parte sucede cuando el cromo presente en el acero inoxidable entra en contacto con el oxígeno en el aire. Esta reacción química forma una nueva capa pasiva de óxido de cromo, la cual protege la superficie de acero inoxidable.

Se realizó la limpieza en todos los accesorios para poder descartar contaminaciones por suciedad en cualquier punto del proceso, se prestó particular importancia a los accesorios con micro perforación o placas, pues se detectó que es uno de los puntos de mas fácil contaminación en otras cervecerías. (Piedra de carbonatación, Pierda de oxigenación e Intercambiador de placas)



El cromo presente en el acero inoxidable se oxida en presencia del oxígeno para formar una capa externa de Oxido de cromo (Walter.com)



Fermentador y abrillantamiento antes del proceso de pasivado.



Fermentador y abrillantamiento despues del proceso de pasivado, sin oxidar.

Producción del lote 0

Datos de la Cerveza

Estilo: Kolsch

Alcohol: 4.5

Amargor: 23 IBU

Datos del Lote

Volumen Final: 230 Lts

Se fabricó una cerveza con un nivel de alcohol de 4.5% lo que se considera bajo para los niveles de la industria.

El volumen máximo fermentable del equipo actualmente es de 300lts, el lote 0 fue de aproximadamente 230 lts.

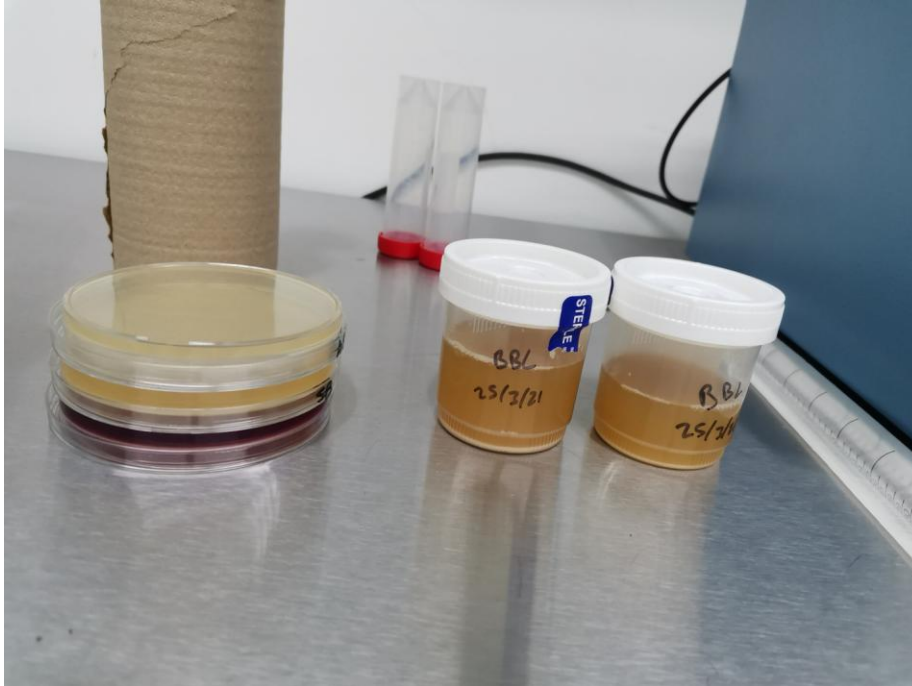
Pruebas de calidad en lote 0

La fermentación se puede dividir en 3 etapas: Exponencial (1 a 3 días), Estacionaria (3-5 días), Caída (5-8 días)

Para el proceso de control de calidad, las 3 etapas son importantes, pero se considera el punto más crítico el 4-5 días, pues para este tiempo la generación de alcohol y la caída de pH por parte de la levadura ya estarán terminada casi a su totalidad, sólo dejando subproductos que posteriormente serán metabolizados por la misma levadura. Asimismo, si existiera algún contaminante externo, la fase de crecimiento alcanzada complicaría poder detectarlo mediante pruebas de laboratorio.

Se tomó una muestra de los lodos (material sedimentado del cono del fermentador) del 5to día, a la cual se le realizaran las siguientes pruebas de identificación microbiológica:

- Cultivo tradicional en placa
- Prueba PCR para diagnóstico molecular de lactobacilos y pediococos.

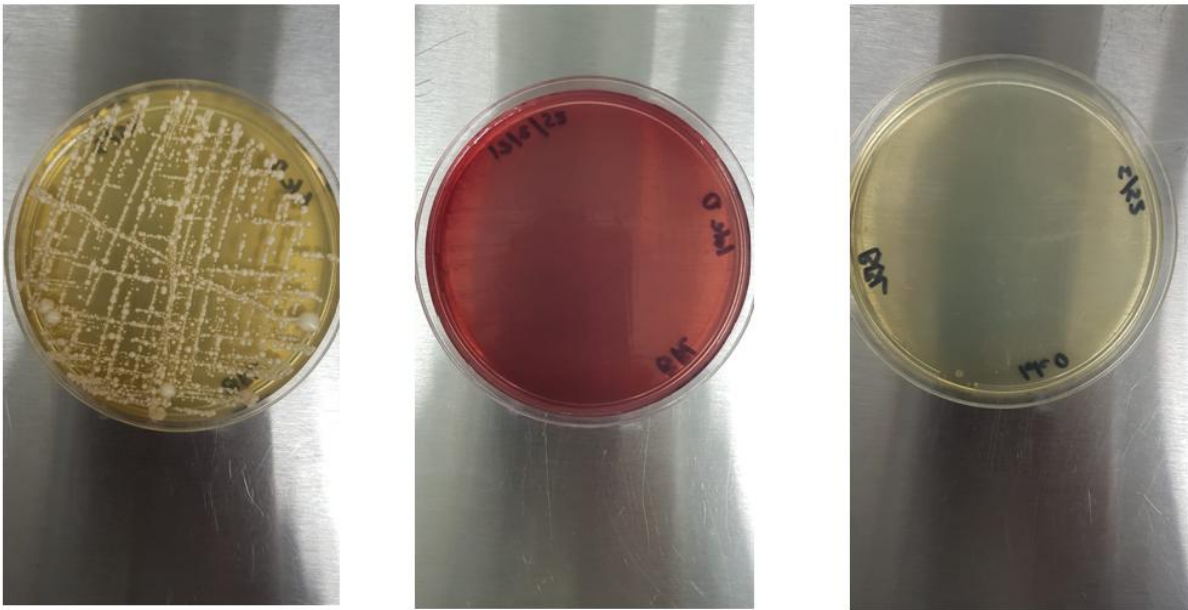


Recepción de muestras para su evaluación en el laboratorio.

Resultados de análisis

Tipo de Prueba	Resultado	Notas
Tradicional (Cultivo en placa)		
<ul style="list-style-type: none"> Sabouraud 	Positivo	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (identificación corroborada mediante MALDITOF)
<ul style="list-style-type: none"> Mc Conkey 	Negativo	
<ul style="list-style-type: none"> Sangre 5% 	Negativo	
Dx Molecular (PCR): Lactbacilos y Pediococos	Negativo	<1 UCF

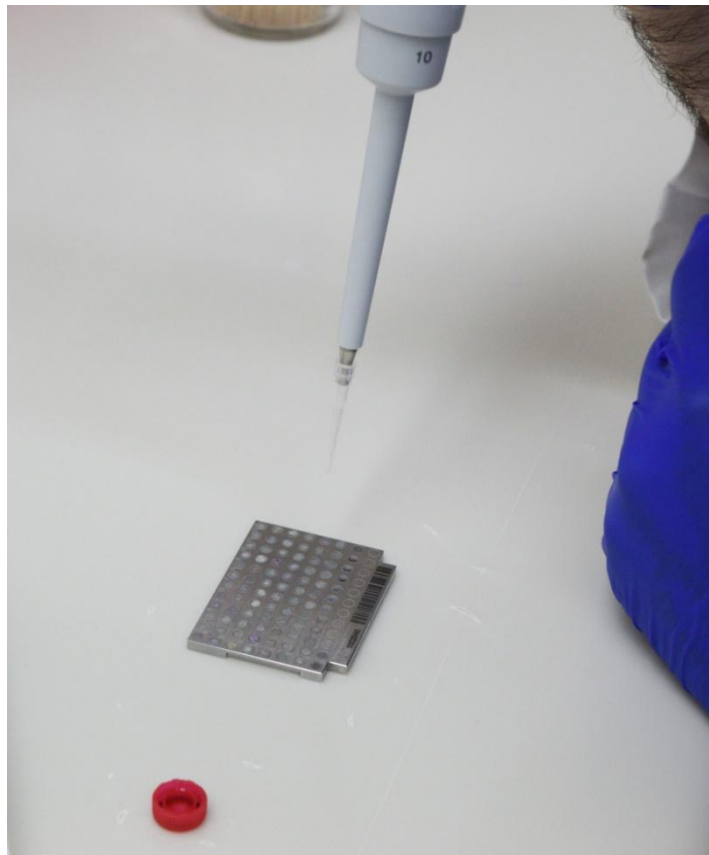
Cultivos generales en placa 48hrs



De izquierda a derecha: Placa Sabouraud con colonias de Saccharomyces cerevisiae (identificado mediante MALDITOF), Placa Sangre 5% Negativa, Placa Mc Conkey Negativa.



Material usado en identificación MALDI-TOF



Fijado de muestra con HCCA



Colocado y lectura de placa para iniciar secuencia del equipo MALDI Biotyper



Configuración y lectura de muestras en placa MALDI



Uso de microscopio Óptico para conteo de células y viabilidad



Células de Levadura *Saccharomyce cerevisiae*

Bibliografía

- Bokulich, N. A., & Bamforth, C. W. (2013). The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(2), 157–172. <https://doi.org/10.1128/membr.00060-12>
- Church D. (2016). Processing, Isolation, Detection, and Interpretation of Aerobic Bacteriology Cultures, p 3.3.1.1-3.3.2.15. In Leber A (ed), *Clinical Microbiology Procedures Handbook, Fourth Edition*. ASM Press, Washington, DC. doi: 10.1128/9781555818814.ch3.3
- Stewart, G. G. (2014). *BREWING MICROBIOLOGY Managing Microbes , Ensuring Quality* (pp. 11–12).
- White, C., & Zainasheff, J. (2010). *Yeast: The practical guide to beer fermentation. Igarss 2014* (p. 466).
Walter.com. (s.f.). Recuperado el 24 de 05 de 2021, de https://www.walter.com/documents/175001/1153924/Passivation_Mex.pdf/eafa0d0a-d7eb-43de-b147-e41b3b89874e
- Anchor Brewing. (6 de 12 de 2019). *anchorbrewing.com*. Obtenido de <https://www.anchorbrewing.com/blog/the-story-of-barrel-aged-beer/>
- Basso, R. F., Alcarde, A. R., & Portugal, C. B. (2016). Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations? *Food Research International*, 86, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.002>
- Bokulich, N. A., & Bamforth, C. W. (2013). The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(2), 157–172. <https://doi.org/10.1128/membr.00060-12>
- Buglass, A. J. (2010). *Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects. Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects* (Vol. 1–2). John Wiley and Sons. <https://doi.org/10.1002/9780470976524>
- Canonico, L., Agarbati, A., Comitini, F., & Ciani, M. (2016). *Torulasporea delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. *Food Microbiology*, 56, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.12.005>
- De Roos, J., & De Vuyst, L. (2019). Microbial acidification, alcoholization, and aroma production during spontaneous lambic beer production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1), 25–38. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9291>

- Gibson, B., Geertman, J. M. A., Hittinger, C. T., Krogerus, K., Libkind, D., Louis, E. J., ... Sampaio, J. P. (2017). New yeasts-new brews: Modern approaches to brewing yeast design and development. *FEMS Yeast Research*, 17(4), 1–13. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox038>
- Gòdia, F., Casas, C., & Solà, C. (1988). Batch alcoholic fermentation modelling by simultaneous integration of growth and fermentation equations. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 41(2), 155–165. <https://doi.org/10.1002/jctb.280410208>
- Holt, S., Mukherjee, V., Lievens, B., Verstrepen, K. J., & Thevelein, J. M. (2018). Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. *Food Microbiology*, 72, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.008>
- Holt, S., Miks, M. H., de Carvalho, B. T., Foulquié-Moreno, M. R., & Thevelein, J. M. (2019). The molecular biology of fruity and floral aromas in beer and other alcoholic beverages. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(3), 193–222. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy041>
- Hulin, M., Harrison, E., Stratford, M., & Wheals, A. E. (2014). Rapid identification of the genus *Dekkera/Brettanomyces*, the *Dekkera* subgroup and all individual species. *International Journal of Food Microbiology*, 187, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.028>
- Martinez Hoyos, A. M. (2016). *Evaluación del proceso fermentativo utilizando células libres e inmovilizadas para la elaboración de hidromiel*. 150. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/54884/>
- Michel, M., Kopecká, J., Meier-Dörnberg, T., Zarnkow, M., Jacob, F., & Hutzler, M. (2016). Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model. *Yeast*, 33(4), 129–144. <https://doi.org/10.1002/yea.3146>
- Moreno-García, J., García-Martínez, T., Mauricio, J. C., & Moreno, J. (2018). Yeast immobilization systems for alcoholic wine fermentations: Actual trends and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00241>
- Nedović, V., Gibson, B., Mantzouridou, T. F., Bugarski, B., Djordjević, V., Kalušević, A., ... Yilmaztekin, M. (2015). Aroma formation by immobilized yeast cells in fermentation processes. *Yeast*, 32(1), 173–216. <https://doi.org/10.1002/yea.3042>
- Olaniran, A. O., Hiralal, L., Mokoena, M. P., & Pillay, B. (2017). Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(1), 13–23. <https://doi.org/10.1002/jib.389>
- Rigg, I. R. T., Gardens, S., Petro, P. A., Szweda, J. A., & Vale, R. (1995). *United States Patent [19]*.
- Roger, J. M., Sablayrolles, J. M., Steyer, J. P., & Bellon-Maurel, V. (2002). Pattern analysis techniques to process fermentation curves: Application to discrimination of enological alcoholic

fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 79(7), 804–815.
<https://doi.org/10.1002/bit.10338>

Setzer, W. N. (2016). Volatile components of oak and cherry wood chips used in aging of beer, wine, and spirits. *American Journal of Essential Oils and Natural Products AJEONP*, 4(42), 37–40. Retrieved from <http://www.essencejournal.com/pdf/2016/vol4issue2/PartA/3-1-12-836.pdf>

Strong, G. (2015). *Beer Judge Certification Program: Style Guideline*.

Vanderhaegen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, K. J., Verachtert, H., & Derdelinckx, G. (2003). Evolution of Chemical and Sensory Properties during Aging of Top-Fermented Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(23), 6782–6790. <https://doi.org/10.1021/jf034631z>

Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., & Derdelinckx, G. (2006). The chemistry of beer aging - A critical review. *Food Chemistry*, 95(3), 357–381.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.006>

Verbelen, P. J., De Schutter, D. P., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., & Delvaux, F. R. (2006). Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. *Biotechnology Letters*, 28(19), 1515–1525. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9132-5>

Wang, Y., Zhao, Y. cun, Fan, L. lin, Xia, X. dong, Li, Y. hui, & Zhou, J. zhong. (2018). Identification and characterization of *Pichia membranifaciens* Hmp-1 isolated from spoilage blackberry wine. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(9), 2126–2136.
[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)62027-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)62027-1)