

TÈCNiques RÀPIDES PER A LA SUPERVISIÓ DE LA HIGIENE A LA INDÚSTRIA CERVESERA

MARTA ORIVE

San Miguel, Fàbriques de Cervesa i Malta, S. A., Lleida

INTRODUCCIÓ

Històricament, la cervesa, com altres begudes alcohòliques tradicionals, té unes característiques que l'han feta especial entre els aliments, perquè no és vehicle ni suport de microorganismes perillosos per a la salut humana. L'elaboració d'aquests beures ve de molt antic; se'n tenen notícies de fa vora 3000 anys. Hom creu que la gran acceptació que va tenir responia no solament al seu sabor agradable, sinó també al fet que era més segura per a la salut que no pas l'aigua a partir de la qual s'elaborava.

La cervesa és un producte natural que s'obté a partir del malt d'ordi cerveser, que es transforma en most dolç —al qual s'addiciona part de la flor femenina del llúpul, que li confereix la seva amargor característica—, i de l'activitat del llevat cerveser *Saccharomyces cerevisiae*. Durant la fermentació, el llevat consumeix la major part dels nutrients presents al most i genera etanol i gas carbònic, com a productes principals. A l'acabament de la fermentació, el llevat pot ser recollit i novament inoculat en most fresc per tornar a començar.

Hi ha una sèrie de característiques pròpies del procés i d'altres intrínseques de la cervesa, en les quals rau principalment la seva innocuïtat. Els factors més importants relacionats amb el procés tradicional cerveser que determinen la innocuïtat són: l'ebullició del most, l'addició de llúpul —que té un efecte bacteriostàtic—, i la multiplicació d'un cultiu seleccionat de llevat que s'afegeix en quantitats massives. Com a resultat de la fermentació, els canvis principals que es produeixen en el most i defineixen la cervesa són: l'aparició d'etanol com a producte principal; la generació d'anhídrid carbònic i la disminució de l'oxigen inicial fins a concentracions molt baixes, que equivalen a un alt grau d'anaerobiosi; la baixada del pH i del contingut en nutrients com a resultat del consum que en fa el llevat. Aquestes peculiaritats fan que sigui estable a la major part de microorganismes de tot tipus, i que només hi hagi unes poques espècies de llevats i de bacteris làctics que puguin sobreviure en aquest medi advers, i per tant, poden ser preocupants només des del punt de

vista de l'estabilitat microbiològica del producte. Com a altres indústries alimentàries, però, hi ha a més unes mesures actives clarament dirigides a evitar l'accés i la colonització del producte per part dels microorganismes: processos sota pressió d'anhidrid carbònic, circuits tancats, utilització del fred a la major part de les fases de producció, aplicació de sistemes de filtració i/o pasteurització, manteniment de la higiene, i la vigilància de tots aquests processos.

MANTENIMENT DE LA HIGIENE

Les mesures per al manteniment de la higiene es basen en el següents factors: (a) accions preventives, com ara disposar de dissenys de les instal·lacions adequats i de programes de neteja i desinfecció sistemàtics; (b) mesures de les variables del procés que són fàcilment determinables i que es prenen al moment (temperatura, pressió, temps, concentracions de productes i el tipus de producte en ús); (c) aplicació de sistemes de supervisió de l'efectivitat dels programes de neteja i desinfecció.

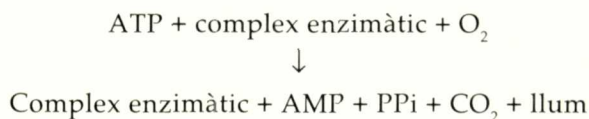
Les característiques ideals d'un test per a la supervisió de la higiene aplicats a la fabricació de cervesa, o d'altres aliments, són: (i) possibilitat de detectar els residus de matèria orgànica, tant si hi ha microorganismes com si no n'hi ha; (ii) els resultats que doni han de ser repetitius; (iii) els aparells han de ser fàcils d'usar i les anàlisis, senzilles, i (iv) els resultats del test han de ser immediats o, si més no, han d'estar disponibles abans de començar qualsevol operació de producció, és a dir, han de ser operatius.

La tècnica tradicional més ràpida per avaluar l'eficàcia de les neteges ha estat tradicionalment l'observació visual de les superfícies. Només a posteriori, les anàlisis microbiològiques basades en la incubació de mostres donaven una informació més completa sobre l'efectivitat de les neteges. Els últims anys s'ha popularitzat una tècnica instrumental ràpida per a la detecció de matèria orgànica, que s'anomena bioluminometria. La supervisió de la higiene es pot fer en dos tipus principals de mostres: les obtingudes a partir de superfícies i les que provenen de les aigües d'esbandit.

BIOLUMINOMETRIA

La bioluminometria es basa en la detecció del trifosfat d'adenosina (ATP) molècula que emmagatzema i transporta l'energia en tots els organismes vius. Es pot trobar a tots els residus d'origen viu; per tant, és un bon indicador de l'existència de restes d'aliments. En presència d'ions magnesi, a partir d'ATP i d'oxigen es formen, de manera immediata, AMP, pirofosfat, anhidrid carbònic i llum. Aquest fenomen, anomenat bioluminiscència, es produeix de forma natural en alguns éssers vius com en una espècie de lluerna, o cuca de llum (*Photinus pyralis*), de la qual s'extreu el complex enzimàtic luciferina-lucifera-

sa que catalitza la reacció (4). De forma simplificada, la podem escriure de la següent manera:



La quantitat de llum formada és proporcional al nombre de molècules d'ATP presents en començar la reacció. En la pràctica és molt fàcil comprovar i mesurar la baixada de nivells d'ATP després de fer una neteja.

La llum emesa en forma de fotons és mesurada en la longitud d'ona de la llum groga-verda de 562 nanòmetres, mitjançant uns fotòmetres molt sensibles, també anomenats luminòmetres. La quantitat de llum es mesura tot integrant el nombre de fotons emesos durant 10 segons. Es mesura en unitats relatives de llum o RLU. Aquestes unitats varien segons l'aparell i per a conèixer la seva equivalència s'ha de fer amb solucions estàndards d'ATP.

Els aparells per a determinar la presència d'ATP són en general de còmodes dimensions i fàcils de transportar. Es presenten en maletins especials, que inclouen tot el necessari per a realitzar les anàlisis a peu de la línia de producció, si així es vol. Els reactius reconstituïts són suficientment estables per a permetre l'autonomia de la persona que supervisa la higiene de la planta, fins a 24 hores a temperatura ambient (1, 3).

Si comparem les característiques dels mètodes convencionals amb la bioluminometria trobarem el que reflectim a la Taula 1 (5). En la detecció de microorganismes és difícil d'establir comparacions entre ambdues tècniques quan s'apliquen a mostres reals (2, 7), perquè les variables mesurades són de naturalesa ben diferent i les mostres solen ser molt complexes. En proves realitzades per nosaltres sobre parelles de mostres processades paral·lelament per tècniques tradicionals i bioluminometria, s'observa que només en el 6 per cent de mostres analitzades classificades com no acceptables en les tècniques habituals no es detectava ATP; per contra, fins al 53 per cent de mostres en què es detectava ATP, no presentaven microorganismes (6). Aquest fet fa veure la importància d'usar la tècnica nova en lloc de la tradicional, perquè, en més de

TAULA 1. Comparació entre tècniques tradicionals i bioluminometria

	Tradicional	Bioluminometria
Materia orgànica	No	Sí
Microorganismes	Sí	Sí
Resultats	2-3 dies	1-2 min
Repetitivitat	Baixa	Alta
Fàcil d'usar	No	Sí
Diferència principal	Retrospectiu	Operatiu

la meitat dels casos, donaríem per acceptables mostres que en realitat contindrien residus orgànics que en poc temps podrien ser colonitzats.

Així doncs, la bioluminometria supera les tècniques tradicionals en dos qüestions fonamentals: la detecció de matèria orgànica i l'obtenció immediata dels resultats que fan que aquest mètode sigui clarament operatiu i no retrospectiu com ho eren els tradicionals.

Per a avaluar la higiene d'una instal·lació seria bo determinar-hi la presència o absència de matèria orgànica, tant en superfícies com en aigües d'esbandit, ja que la informació que s'obté és complementària. Però, quan hom vol detectar quantitats significatives d'ATP en aigües d'esbandit, se sol necessitar un pas intermedi d'enriquiment per filtració i incubació que fa el protocol molt més laboriós, complex i lent (1). És, de totes maneres, una alternativa aplicable als sistemes tancats als quals no es pot accedir a prendre mostres de les superfícies interiors. En el cas de les nostres fàbriques, s'ha imposat la presa de mostra de superfícies mitjançant frotis i la seva anàlisi directa per bioluminometria.

Factors que influeixen la reacció de bioluminiscència

Es tracta d'una reacció enzimàtica ben coneguda i se sap que és influïda per factors diversos (4). N'hi ha que afecten la reacció o la lectura de la llum emesa disminuint el nombre de fotons llegit pel fotodetector. Aquest fenomen s'anomena *quenching* o apagament, i provoca resultats més baixos dels reals. El *quenching* pot ser bàsicament de dos tipus: (a) l'**òptic**, provocat per una mostra massa tèrbola, que impedeix, per absorció o dispersió, la mesura de la llum formada en el tub d'anàlisi, pot detectar-se amb un cop d'ull i pot ser compensat per dilució o per estandardització interna; i (2) el **químic**, que és una inhibició ocasionada per factors diversos, com ara la presència d'agents quelants que segresten el magnesi necessari per a la reacció, o bé per la presència de determinats elements com ara el clor. De la mateixa manera, els pH o temperatures extremes provoquen la frenada de la reacció i per tant, de la formació de llum.

La producció de valors més alts que els reals respon bàsicament a dues causes ben conegudes i fàcils de verificar. La més freqüent és l'entrada d'ATP als reactius per una manipulació poc acurada o per la seva alteració microbiològica, igualment causada per una mala manipulació o per una conservació deficient. A vegades, però, es pot deure a l'entrada de fotons a la càmera de recompte pel deteriorament d'alguna de les juntes de tancament. Normalment els aparells ja estan pensats per a evitar l'entrada de llum i porten sistemes de tancament molt eficaços. La substitució de la junta soluciona el problema.

Avaluació d'aparells

A l'hora de seleccionar entre els aparells en el mercat és recomanable comparar-los. Malgrat que siguin bàsicament molt semblants, hi ha alguns

paràmetres que varien d'uns a d'altres (3). Hem realitzat unes proves als nostres laboratoris sobre tres dels aparells portàtils que es poden trobar al nostre mercat. Totes les variables van estudiar-se en mostres quintuplicades sobre solucions preparades d'ATP estàndard. Els resultats es troben a la Taula 2.

Els coeficients de variació (CV) trobats són diferents per a cada combinació d'aparell i reactius, considerant-se millor com més baix sigui. La correlació amb la concentració d'ATP ha estat molt bona en tots els casos, com es podia esperar. La sensibilitat s'ha valorat tot cercant la dilució més gran que donés un resultat significatiu respecte als resultats dels controls. L'extinció de la formació de llum en el temps es refereix a la baixada en l'emissió de llum a partir del temps «zero», en què s'addiciona l'enzim. Hem pogut observar lleugeres diferències que podrien explicar les variacions en els CV esmentats abans. Si es realitzen les anàlisis en el moment adequat, aquest factor no influeix de forma significativa.

Els graus d'inhibició de la quantitat de llum formada o apagament (*quenching*) causat per un detergent basat en clor actiu han estat diversos, essent millor com més baix és. Malgrat que el clor sigui un producte rarament usat en cerveseria, ens és útil en aquest treball per a fer la comparació. Per a poder-lo determinar, es van comparar controls amb solucions problema que incorporaven un 0,2 per cent de producte. Aquesta quantitat equival a una mostra d'una superfície molt mal esbandida i en què la presència de clor és detectable per l'olor de l'aigua de l'esbandit. El valor expressat en la taula és la diferència de RLU, en forma de percentatge, que es llegeix en la mostra amb clor respecte als controls.

En conclusió, es veié que tots els aparells tenien aspectes negatius i positius, de forma que tots poden ser aplicats a l'avaluació de la higiene en la rutina, sempre que es tinguin en compte les característiques particulars de cadascun.

CONSIDERACIONS PRÈVIES A L'AVALUACIÓ DE LA HIGIENE

Definició de netedat

A l'hora d'aplicar la tècnica a la rutina de producció cal definir alguns conceptes bàsics: La «netedat» pot definir-se com l'absència de residus orgà-

TAULA 2. Comparació entre equips diversos

	Equip A	Equip B	Equip C
Aparell (C.V)	5,4	5,5	17,5
Anàlisi (C.V)	27	26	40
Correlació amb ATP	0,999	0,997	0,988
Sensibilitat (pg ATP)	10	10	100
Extinció de temps (%)	5,5	10	—
Apagament pel clor (%)	25	35	24

nics. Per a l'avaluació de la higiene ens trobem, a més, amb uns inconvenients lògics: la distribució dels residus orgànics no és uniforme a les superfícies i per tant, els mostratges mitjançant els frotis donaran uns resultats sovint difícils d'interpretar. Per això, cal referir-la a una unitat de superfície i és molt important ser constant en la forma de prendre la mostra.

Límits d'acceptabilitat

El grau de netedat serà sempre relatiu, perquè dependrà de la sensibilitat dels aparells de mesura. Per a poder decidir si una superfície és «acceptablement neta» o no, és molt pràctic utilitzar criteris qualitatius que ens permetin decidir d'emprendre accions. Per això establim valors de referència o «límits d'acceptabilitat», que poden definir-se de diferents formes. Poden estar referits a la mitjana dels valors d'ATP més baixos obtinguts en les neteges regulars. O bé als valors dels controls. En aquest cas, poden seguir-se les indicacions de molts dels fabricants (1), que indiquen que haurien de ser de 3 a 5 vegades els valors dels controls, o poden determinar-se uns intervals de confiança al voltant dels controls. En qualsevol cas, el límit d'acceptabilitat serà més baix com més sensible sigui l'aparell.

Els fabricants recomanen també: a) que els límits es calculin en funció del valor del control de cada lot nou de reactius, i b) que es fixi un límit d'acceptabilitat i d'un límit de rebuig, quedant entre ambdós una zona dubtosa (1). Segons la nostra experiència (5), d'un dia per l'altre en tots dos casos es produïen canvis en els límits, que provocaven confusió. És preferible, per tant, calcular un valor mitjà dels controls de diferents lots, en diferents dies i en condicions de treball variades, i a partir d'ell, determinar un sol límit d'acceptabilitat.

En qualsevol cas, els valors seran classificats en dues o tres classes i es reflectiran a les pantalles dels luminòmetres de forma fàcil d'interpretar i que ajuden a prendre decisions ràpides pel que fa a les neteges.

Els fabricants recomanen també que, a l'hora d'escollir uns límits d'acceptabilitat, hom tingui en compte el tipus de material a mostrejar (1). En el nostre cas, els límits solen ser els mateixos per a tots (5). Però, si es vol treballar amb límits diferents per a diversos materials, s'introdueixen els valors a la memòria de l'aparell, i el resultat serà igualment classificat i interpretat de forma senzilla.

Punts de mostratge en una instal·lació

Els punts de mostratge seleccionats a cada instal·lació hauran de ser una representació del conjunt. Per determinar-los, cal fixar alguns criteris i tenir en compte alguns factors. En primer lloc, cal que es mostregin alguns punts de cada tipus de neteja (automàtica i manual), com també algun punt de cada tipus de material. El disseny influeix molt; hi ha zones, com ara les aixetes de mostratge, que són més difícils de netejar, cosa que fa que s'hi puguin

acumular més residus. Els punts per a l'anàlisi de rutina han de ser fàcils de mostrejar sense que calguin desmuntatges complicats. Així mateix, els punts fixats han de ser representatius també d'altres zones; no oblidem que la superfície mostrejada és sempre una part molt petita del total. En zones homogènies, però, podem trobar fàcilment uns punts que ens orientin de forma fiable. Cal determinar el nombre mínim de punts; sovint dos punts es poden comportar de forma semblant i per tant, amb els resultats d'un, podem orientar-nos sobre el comportament de l'altre.

Les fletxes de la Fig. 1 indiquen punts interessants de mostrejar en un tanc de geometria cilindre-cònica, habitual a les cerveseries, tenint en compte els criteris abans exposats.

La llista de punts a mostrejar es pot fixar i també introduir a la memòria del luminòmetre. En supervisar la instal·lació, la llista estarà predeterminada.

APLICACIONS

L'ús d'aquesta tècnica per a la supervisió de la higiene en la planta es pot fer tenint en ment diferents finalitats. Pot combinar-se amb la inspecció visual,

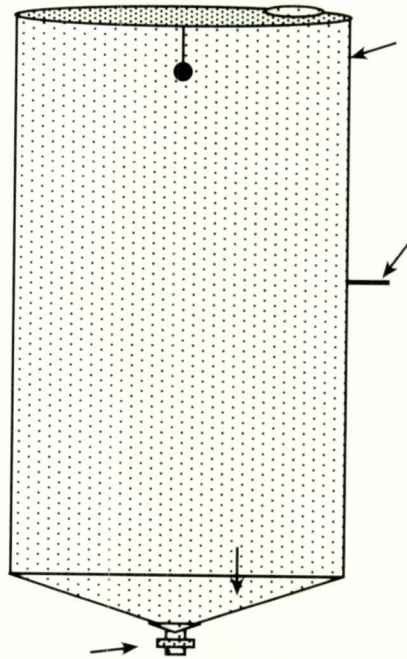


FIG. 1. Esquema de mostratge bàsic d'un tanc cilindre-cònic.

en les proves d'avaluació en les operacions diàries de producció i per tant, serveix per a donar el vist-i-plau abans d'iniciar-la. Amb un bon *software*, que habitualment se suministra amb tots els luminòmetres, podem fer seguiments de l'estat higiènic de les instal·lacions al llarg del temps mitjançant gràfiques molt il·lustratives, fins i tot punt per punt. Es pot avaluar el comportament de determinats programes de neteja automàtica, que és el sistema de neteja més habitual a les cerveseries, o de neteja manual, que en determinades peces és obligada. També poden fer-se auditories de diferents fàbriques, atès que els diferents aparells poden calibrar-se amb solucions estàndard d'ATP. La bioluminètria permet així mateix detectar anomalies precoçment i aplicar-hi solucions immediates; si en un moment determinat es capten uns nivells d'ATP més alts dels habituals en alguns punts de les instal·lacions, es preparen mostratges més exhaustius i es pot arribar a conclusions clares en poques hores. A més, proporciona informació per decidir quins són els dissenys més conflictius i quins els més adequats.

Exemples d'aplicacions a la indústria cervesera

A la Taula 3, exposem un exemple de resultats reals en RLU d'un tanc de fermentació sense netejar i després de la neteja automàtica de rutina. Hi observem que, de vegades, alguns tipus de peces, com ara les aixetes de mostratge, necessiten neteja manual, o que certs materials, com és el cas de les juntes de goma alimentària, cal que es netegin dos cops per ésser considerats «acceptablement nets».

Com a exemple del seguiment històric de les neteges podem veure el gràfic de la Fig. 2. Després de cada tanda d'ús d'un tanc, o d'altres instal·lacions de producció, es fa una neteja de rutina, els resultats de la qual no sempre són dins dels estàndards i per tant, és necessari aplicar-hi una segona neteja fins que el resultat sigui «acceptablement net». En les ordenades, es troben els resultats (RLU) corresponents a les primeres neteges de rutina, en escala logarítmica, per a un punt concret al llarg del temps. Lògicament, no té sentit fer gràfics dels resultats finals després de les neteges correctives.

Els luminòmetres portàtils emmagatzemen fins a 1000 dades que poden ser després transferides directament a un ordinador. El *software* que suministren

TAULA 3. Exemple de resultats abans i després de les neteges

	Abans	Neteja automàtica	Neteja manual
Sostre	250	123	
Junta	11054	252	46
Aixeta	457008	365	43
Vàlvula	6258	33	
Paret	22639	54	

els fabricants permet elaborar, ràpidament, gràfics com el que podem veure a la Fig.2.

La Fig. 3 és un exemple d'avaluació d'un nou programa de neteja lligat a tancs d'igual geometria i netejats amb la mateixa unitat neteja CIP (Cleaning in place) automàtica. Es pot determinar el percentatge de mostres «acceptablement netes» per als diferents punts mostrejats, a partir d'un total de 20 neteges i es compara amb una tanda de 20 neteges realitzades segons el nou programa.

CONCLUSIONS

Els principals avantatges de la bioluminètria poden resumir-se en els següents punts: a) junt amb la inspecció visual, permet de fer un control de la higiene en temps real, i pot combinar-se amb les tècniques tradicionals per a complementar resultats, b) permet detectar residus orgànics no visibles fins i tot abans que siguin colonitzats; c) la interpretació de les dades és fàcil i ajuda a prendre decisions ràpides en funció de les necessitats de producció i a peu de la línia; d) la disponibilitat del *software* adequat permet emmagatzemar les dades i així determinar senzillament els límits d'acceptabilitat, avaluar els diferents materials i seleccionar els punts de mostratge; i e) permet de seguir els resultats de cada instal·lació o fins i tot, punt per punt, al llarg del temps i per tant, fer comparacions de diferents dissenys, programes de neteges, auditories, etc.

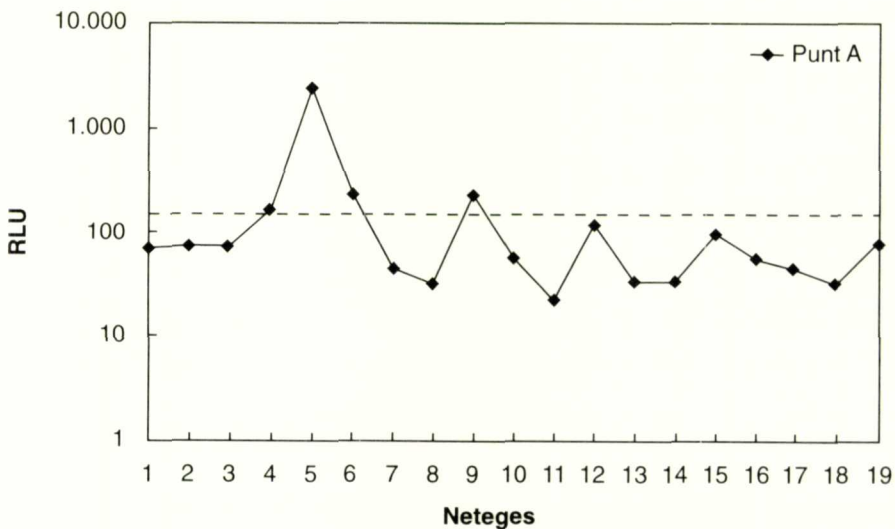


FIG. 2. Variació en el temps dels resultats després de primera neteja per a un punt determinat.

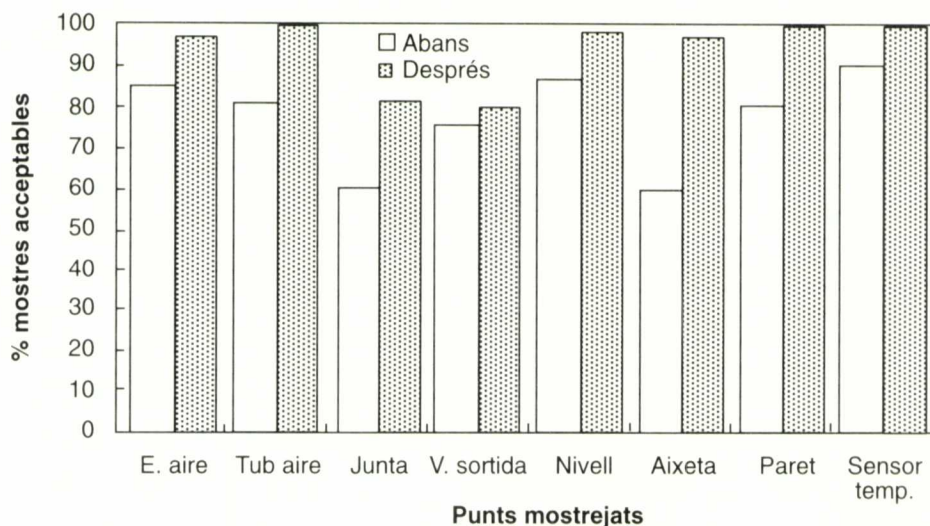


FIG. 3. Mitjana dels resultats de cada punt abans i després d'un nou programa de neteja.

És la millor tècnica de supervisió de la higiene de què es disposa actualment tant a la cerveseria com a altres indústries alimentàries. A més de les aplicacions a la higiene, és una tècnica emprada en el control de qualitat d'algunes matèries primeres i productes en procés o acabats. En els darrers anys, s'estudia la seva combinació amb altres tècniques instrumentals, per a aplicacions a tot tipus d'aliments, inclosa la cervesa.

REFERÈNCIES

1. Catàlegs de diversos fabricants: Lumac, Merck, Biotrace, Bioorbit, etc.
2. Graumlich, T. R. (1985). Estimation of microbial populations in orange juice by bioluminescence. *J. Food Science* **50**, 116–120.
3. Griffith, J., Blucher, A., Fleri, J., Fielding, L. An evaluation of luminometry as a technique in food microbiology and a comparison of six commercially available luminometers. *Food Science and Technology Today* **8**, 209–216.
4. Mackintosh, R. D. (1988). Bioluminescence: Basis of methods and measurement. Lumac Proceedings of the Brewing Workshop, 25 May 1988, 3–23.
5. Orive, M. (1995). Aplicaciones de la bioluminometria en la supervisión y control de higiene de la industria cervecera. *Cerveza y malta* **126**, 10–13.
6. Orive, M. (1996). Hygiene monitoring in draught beer dispensers. Pendent d'impressió per European Brewery Convention.
7. Theron, D. P., Prior, B. A., Lategan, P. M. (1987). Effect of minimum growth temperature on adenosine triphosphate content of bacteria. *Internat. J. Food Microbiology* **4**, 323–329.