

**Antonio Jesús Galán Jiménez**

**“ANÁLISIS E IMPLANTACIÓN DE CONTROL DE CALIDAD  
EN MICRO CERVECERÍA LES CLANDESTINES DE  
MONTFERRI”**

**TRABAJO FINAL DE MÁSTER**

**dirigido por Roger Plata Cots**

**Máster en BEBIDAS FERMENTADAS**

**Facultat d’Enologia**



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

**Tarragona  
Septiembre de 2017**

ÍNDICE

1) RESUMEN.....	1
2) INTRODUCCIÓN.....	2
2.1) Antecedentes.....	2
2.2) Importancia de control de procesos.....	3
2.2.1) Análisis y tratamiento de agua.....	3
2.2.2) Control y seguimiento de levadura durante reutilización.....	4
2.2.3) Molturado.....	4
2.2.4) Oxigenación durante el embotellado.....	5
3) OBJETIVOS.....	6
3.1) Objetivo principal.....	6
3.2) Objetivos específicos.....	6
4) MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
4.1) Determinación de minerales en agua.....	7
4.2) Seguimiento de levadura.....	7
4.3) Determinación de fracciones de molturado.....	8
4.4) Medición de oxígeno disuelto en cerveza.....	8
5) RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	9
5.1) Composición de agua y ajuste para diferentes cervezas.....	9
5.2) Seguimiento durante reutilización y dosis de inoculación de.....	13
5.3) Análisis de fracciones de molturado.....	16
5.4) Incremento de oxígeno disuelto en cerveza durante embotellado.....	17
6) CONCLUSIONES.....	18
7) BIBLIOGRAFÍA.....	20
8) ANEXOS.....	21
9.1) Anexo 1: Ficha de levadura utilizada en el estudio.....	22

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Molturador.....	5
Figura 2. Embotelladora.....	5
Figura 3. Tamices para molturado.....	8
Figura 4. Oxímetro.....	8
Figura 5. Evolución mineral del agua entre 2014 - 2017.....	11
Figura 6. Evolución de viabilidad respecto a generaciones reutilizadas.....	13
Figura 7. Tinción celular con azul de metileno.....	13
Figura 8. Morfología levadura (WLN).....	14
Figura 9. Aparición de bacterias (YEPD).....	14
Figura 10. Separación de fracciones de molturado.....	16
Tabla 1. Relación entre generación reutilizada, estilo de cerveza y fecha de elaboración.....	7
Tabla 2. Resultados generales obtenidos en el análisis de agua.....	9
Tabla 3. Clasificación de aguas según la dureza total, por Claude E. Boyd (2014).....	10
Tabla 4. Ajuste de agua para Espelta.....	11
Tabla 5. Ajuste de agua para Negra.....	12
Tabla 6. Comparación de atenuación aparente y cambio de pH.....	14
Tabla 7. Contaminación de bacterias.....	15
Tabla 8. Recuentos de levaduras correspondientes a las generaciones inoculadas.....	15
Tabla 9. Distribución de molturado en distintas fracciones.....	16
Tabla 10. Incremento de oxígeno durante el embotellado.....	17

## 1. RESUMEN

### Castellano

La industria cervecera de pequeño y mediano tamaño están creciendo de forma vertiginosa en toda España, de la misma manera aumenta la preocupación de los maestros cerveceros en elaborar cervezas de calidad. Para fabricar un producto de calidad es necesario tener control tanto de las materias primas utilizadas, como de todos los procesos que se realizan en una cervecería hasta que la cerveza llega al consumidor final, no dejando nada al azar. “Les Clandestines de Montferri” ubicada en Tarragona, es una micro cervecería muy preocupada en ir superando sus estándares de calidad, para ello se han realizado diferentes análisis: Se ha determinado la composición mineral del liquor, viendo la evolución mineral durante años anteriores y para posteriormente ajustar el agua de las diferentes recetas. De igual forma, se ha realizado un seguimiento de reutilización de levadura, determinando la dosis de inoculación necesaria, su viabilidad y contaminación. El proceso de molturado ha sido analizado mediante sistemas de retención de tamices. Y, por último, han sido estudiadas los incrementos de oxígeno disuelto durante el embotellado de cerveza.

### English

The Spanish microbrewing industry is growing at a vertiginous speed all over the country, and as such, head brewers' concerns about the quality of the beer are rising. To create a quality product, total control over everything from the raw materials to all the brewery processes involved in bringing the beer to the consumer must leave nothing to chance. “Les Clandestines de Montferri”, based in Tarragona, is a microbrewery which is highly focused on surpassing quality standards, for which various analyses have been performed: the mineral composition of the brewing liquor has been determined, also examining the changing composition from previous years, to be able to subsequently adjust the various recipes. To the same end, a yeast re-use analysis has been performed to determine the necessary pitching rate, and study the viability and contamination of the yeast samples. The milling process had been analysed via sieve retention systems. Lastly, the increases in dissolved oxygen during the bottling of the beer have been studied.

## 2. INTRODUCCIÓN

La cerveza se puede definir como una bebida alcohólica, no destilada, proveniente de la fermentación de azúcares extraídos de cereales, por medio de hidrólisis, a la que mediante la infusión del lúpulo se le es confiere amargor, sabor y protección frente a bacterias. La elaboración de cerveza es un proceso simple y natural, con el que se obtiene un producto muy complejo.<sup>1,2</sup>

Comenzaremos definiendo el término cerveza de calidad, el subcomité de calidad de “Brewer Association” (octubre, 2014) lo define como: “Una cerveza producida de forma responsable utilizando ingredientes saludables, técnicas de elaboración consistentes y buenas prácticas de fabricación, cuyas características de sabor están alineadas con las expectativas tanto del maestro cervecero como del consumidor”.<sup>3</sup>

La industria cervecera está experimentando un rápido crecimiento, por lo que es necesario que entendamos los riesgos potenciales de la calidad y tener métodos para su control. Es responsabilidad del maestro cervecero crear un producto que cumpla con las expectativas de los consumidores de una manera segura, trazable y repetible.<sup>3,4</sup>

En España, la legislación aplicable a la cerveza en tema de calidad es recogida en:

Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta.

### 2.1 ANTECEDENTES

“Les Clandestines de Montferri” es una micro cervecería situada en la localidad de Montferri (Tarragona), en la cual se elabora cerveza siguiendo un proceso artesano y natural. A principios de 2017, esta cervecería renovó el equipo de cocción y la ubicación de elaboración, con el fin de aumentar la calidad y el volumen de producto. En la actualidad en cada lote se elaboran alrededor de 900 litros de cerveza, realizando una cocción a la semana, alcanza una producción media de 500 hectolitros por año. Estas elaboraciones se dividen en 8 estilos de cervezas, formados por: pale ale, blonde ale, stout, spice ale, belgian ale, american ipa, y weissbier (ANEXO 1).

A partir de la estancia de prácticas en esta empresa y condicionados por los cambios que se habían llevado a cabo recientemente. Se tuvieron diferentes reuniones con el maestro cervecero y se decidió realizar un estudio para mejorar la calidad de sus productos con los medios técnicos disponibles. El estudio se centró en los siguientes procesos:

- Análisis y tratamiento de agua.
- Control y seguimiento de levaduras.
- Molturado.
- Ingreso de oxígeno durante el embotellado.

La importancia de estos controles en la mejora de calidad de la cerveza será explicada en el siguiente punto.

## 2.2 IMPORTANCIA DE CONTROL DE PROCESOS.

### 2.2.1 ANÁLISIS Y TRATAMIENTO DE AGUA

En esta cervecería, el agua utilizada es suministrada por la red pública, proveniente de un manantial subterráneo. El liquor, o agua de elaboración, es tratada con un declorador, también la fábrica cuenta con un osmotizador para des-ionizar una parte de liquor. El análisis de agua resulta importante para conocer los minerales que se encuentran disueltos en ella, ya que algunos iones tienen un papel fundamental en las reacciones de maceración y otros influyen directamente en el perfil sensorial de la cerveza final<sup>5</sup>. Conociendo este contenido podría ajustarse la composición iónica para cada estilo, aumentando la calidad de la cerveza.<sup>6</sup>

Los iones que influyen en la cerveza y tienen mayor interés para el maestro cervecero son<sup>5,6,7</sup>:

- **Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ):** Respecto al gusto, le aporta un sabor neutral. Reacciona con el fosfato de la malta, precipitando y disminuyendo el pH. También, proporciona claridad y estabilidad en la cerveza final, provocando que la proteína coagule y la levadura flocule.
- **Magnesio ( $\text{Mg}^{+2}$ ):** Reduce el pH menos que el calcio, durante el macerado. Sin embargo, es importante como nutriente para la levadura. El magnesio puede ser adicionado para darle un carácter ácido y astringente a la cerveza.
- **Cloruro ( $\text{Cl}^-$ ):** Ayuda a acentuar el dulzor de la malta y plenitud de cerveza, pero en niveles altos (>250ppm), puede provocar gusto pastoso o salado.
- **Sulfato ( $\text{SO}_4^{-2}$ ):** Realza el amargor del lúpulo, haciendo que parezca más seco y nítido. En concentraciones altas (>400 ppm) el amargor puede llegar a ser astringente y desagradable.
- **Relación sulfato/cloruro:** afecta al balance lupulado frente a maltoso en la cerveza final.

Otros parámetros importantes para el maestro cervecero, respecto al agua, son<sup>5,6,7</sup>:

- **Alcalinidad total:** es parámetro que tiene mayor repercusión durante el macerado. Se define, como la cantidad de ácido (mEq/l) necesaria para convertir el carbonato y bicarbonato en dióxido de carbono, a pH 4,3. Normalmente se expresa en ppm de  $\text{CaCO}_3$ .
- **Alcalinidad residual:** Es la alcalinidad que permanece en el agua, tras las reacciones del calcio y magnesio con los fosfatos de la malta.
- **El pH del macerado** tiene gran importancia para la elaboración de cerveza, es necesario que se encuentre en un estrecho intervalo (5,2 – 5,6) para favorecer la actividad enzimática y el rendimiento. Este pH es el resultado del equilibrio entre las maltas y el agua utilizada,
- **Dureza total:** es la suma del calcio y magnesio disueltos en el agua, expresados como  $\text{CaCO}_3$ . Existen dos tipos de dureza:
  - **Dureza temporal (carbonática):** se debe a la presencia de carbonato y bicarbonato cálcico o magnésico. Estos iones producen el aumento del pH, empeorando el desarrollo de la elaboración y la calidad de la cerveza. Eliminados por ebullición.
  - **Dureza permanente (no carbonática):** restantes iones de calcio y magnesio, formados por cloruros o sulfatos. Disminuyen el pH. No pueden ser eliminados por ebullición.

### 2.2.2 CONTROL Y SEGUIMIENTO DE LEVADURA DURANTE REUTILIZACIÓN.

La levadura utilizada en la cervecería Les Clandestines es de tipo ale (fermentación alta) adquirida en formato líquido en la casa comercial White Labs (ANEXO 2). Esta levadura es reutilizada, extraída del fondo del depósito e inoculada de fermentador a fermentador, de modo “cono a cono”, momentos previos del trasvase del mosto frío (20°C). Este tipo de inoculación evita que la levadura se deteriore por el tiempo de almacenamiento, evitando del mismo modo la exposición de la levadura a la intemperie, al realizarse en sistema cerrado<sup>14</sup>.

La fuente más común de contaminación bacteriana en una cervecería es probablemente en la inoculación de levadura. Sobre todo, cuando es reutilizada pueden transferirse contaminantes de fermentación a fermentación, poniendo en riesgo la calidad y el gusto de la cerveza final.<sup>8</sup> Entre los microorganismos contaminantes se encuentran: Bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Bacillus*...) bacterias acéticas (*Acetobacter*, *Gluconobacter*...) enterobacterias, levaduras salvajes *Saccharomyces* y no *Saccharomyces* (*Brettanomyces*, *Candida*, *Dekkera*, *Torulasporea*...). El albergar estos contaminantes puede enturbiar la cerveza y dar gustos de ácido acético, láctico, dimetil sulfuro, acetaldehído y ácido sulfhídrico.<sup>14</sup>

Es imprescindible que la levadura se encuentre viva y en un estado saludable para poder ser inoculada y realizar una fermentación de forma óptima.<sup>9</sup> Por lo que en este tipo de reutilización, de fermentador a fermentador, es necesario tener una buena organización y un buen calendario de elaboraciones, para que sea inoculada en el menor tiempo posible para que no afecte a su viabilidad.

Por otro lado, calcular la tasa de levadura que va a ser inoculada es importante, ya que una menor cantidad puede dar malos sabores, mientras que si es mayor podemos poner en riesgo la salud de las mismas. En ambos casos pueden aparecer altos niveles de diacetil, acetaldehído y una baja atenuación.<sup>9</sup> Este es uno de los problemas de la reutilización “cono a cono” ya que resulta complejo el manejo de las dosis exactas de inoculación.

Con un cuidadoso manejo y los controles necesarios, una cervecería puede llegar a reutilizar la levadura entre cinco y diez generaciones, sin pérdida de calidad<sup>9</sup>.

### 2.2.3 MOLTURADO

Es el proceso mediante el cual se trituran los granos de malta, convirtiéndolos en partículas más pequeñas, preparándolos para la maceración y el filtrado<sup>10</sup>. En esta cervecería, el molturador disponible es de dos rodillos del modelo Sommer- Haferboy (figura 1), estos tipos de molturador son de los más comunes en micro cervecerías y sencillos de utilizar. El grano pasa por los dos rodillos giratorios estrechamente espaciados y es molturado<sup>12</sup>.

La distancia de estos rodillos debe de ser manipulada cuidadosamente para encontrar un equilibrio entre una molienda demasiado fina y otra demasiado gruesa.<sup>10</sup> Con una trituración fina aumentamos la superficie de ataque de las enzimas, mejorando la degradación de los azúcares durante el macerado. A su vez, necesitamos una molienda gruesa que conserve las cáscaras, para formar el lecho filtrante, esencial para una rápida separación del extracto.<sup>11,12</sup>



Figura 1. Molturador

El problema de una molturación demasiado fina, es la producción de polvo que suele enturbiar el mosto e impide el flujo a través del lecho filtrante, por lo que durante el filtrado no se extraen todos los azúcares. Al igual, la rotura de las cáscaras puede aportar polifenoles al mosto, aportando sabores ásperos.<sup>12</sup>

#### 2.2.4 OXIGENACIÓN DURANTE EL EMBOTELLADO.

En la fábrica donde se desarrolla el estudio, la cerveza se embotella en condiciones isobáricas. La embotelladora es de la marca SEIT WERKE BAD KREUZNACH modelo SF 12 del año 1961. Consta de 12 caños, de tamaño mediano. El proceso de llenado se realiza mediante la secuencia:

Pequeño barrido de CO<sub>2</sub> - Presurización – Llenado –  
Despresurización

La importancia de realizar estos análisis, viene dada por la antigüedad de la embotelladora, ya que claramente puede ser un punto de entrada de oxígeno y comprometer la calidad del mismo.

La oxidación es una reacción que deteriora la calidad de la cerveza. La exposición al oxígeno puede ocurrir en cualquier paso de la elaboración, durante la fermentación, el envasado, incluso en la botella durante el almacenamiento. Uno de los puntos más comunes es en la línea de envasado. La cantidad de oxígeno que se incorpore en la cerveza, va a depender de la sofisticación del equipo y del cuidado de los operadores, no obstante, es imposible una captación nula.<sup>13</sup> Bamforth (1999) afirma que el sabor de la cerveza comienza a deteriorarse desde el momento que es envasada, debido a la oxidación de compuestos como ácidos insaturados, alcoholes y alfa-ácidos.<sup>15</sup> Estas oxidaciones contribuyen a la formación de carbonilos, confiriéndole a la cerveza un sabor de pasta, papel o cartón. El término de enranciamiento es mayormente atribuido al incremento de compuestos carbonilos, como trans-2-nonenal y acetaldehído.

Cuanto mayor sea la cantidad de oxígeno, menos tiempo tardará la cerveza en perder calidad. No obstante, la velocidad de oxidación se reduce considerablemente si el producto es almacenado a bajas temperaturas.<sup>13</sup>



Figura 2. Embotelladora.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

El objetivo principal del trabajo fin de master es el estudio de determinados procesos y materias primas involucradas en la elaboración de cerveza, con el fin de aumentar la calidad del producto final.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la composición del agua utilizada en la elaboración de cerveza, con la finalidad de modificarla según el estilo de cerveza y de esta manera aumentar su calidad sensorial.
2. Averiguar hasta que generación de levadura es posible reutilizar, sin comprometer la calidad de la cerveza. Calcular la dosis de inoculación necesaria para la fermentación del mosto.
3. Determinación de las fracciones de molturado, para hacer correcciones u optimizaciones si fuese necesario.
4. Calcular la intrusión de oxígeno en la cerveza durante la etapa de embotellado y considerar posibles acciones para su reducción.

#### 4. MATERIAL Y MÉTODOS.

Todo el material para analizar fue cedido por la cervecería Les Clandestines. Los análisis se llevaron a cabo en las inmediaciones de la facultad de enología, en la universidad Rovira i Virgili, excepto los análisis realizados “in situ”.

##### 1.1 DETERMINACIÓN DE MINERALES EN AGUA

La muestra de agua fue extraída del declorador y se analizó utilizando los siguientes métodos:

- **Sulfatos:** Se utilizó el kit comercial de la casa HANNA. HI38001.
- **Cloruros:** Se utilizó un kit comercial de la casa HANNA. HI3815.
- **Dureza total:** Se utilizó un kit comercial de la casa HANNA. HI38033 .
- **Alcalinidad total:** Se determinó mediante la reacción de HCl hasta la neutralización de los carbonatos, hidrogenocarbonatos e hidróxidos disueltos en el agua, con ayuda de un indicador.
- **Magnesio y Calcio:** Se utilizó el método complexométrico, mediante una valoración con EDTA.
- **pH:** con un medidor de pH, anteriormente calibrado.
- **Alcalinidad residual:** fue calculada siguiendo la ecuación de Paul Kolbach<sup>7</sup>.

##### 4.2 SEGUIMIENTO DE LEVADURA

La levadura es de tipo ale pertenece a la casa White Labs, adquirida en formato líquido y reutilizada durante 5 fermentaciones (ANEXO 1). La relación entre cervezas elaboradas, la generación de levadura utilizada y las fechas de producción se pueden observar en la tabla 1. Entre las elaboraciones existe alrededor de una semana de diferencia, excepto en el caso de la cuarta generación que por diferentes causas se realizó dos semanas después.

Tabla 1. Relación entre generación reutilizada, estilo de cerveza y fecha de elaboración.

GENERACIÓN	ESTILO CERVEZA	FECHA ELABORACIÓN
Primera	Session IPA	09/05/2017
Segunda	Stout	18/05/2017
Tercera	Indian Pale Ale	24/05/2017
Cuarta	Pale Ale	07/06/2017
Quinta	Golden Ale	13/06/2017
Sexta	No se utilizó	22/06/2017

La muestra se extraía momentos antes de ser inoculada al mosto, en tubos estériles y más tarde refrigerados. Los análisis se realizaron en el laboratorio de la universidad, a ser posible en menos de 24h para obtener resultados más fiables. Las determinaciones que se realizaron fueron las siguientes:

- Recuento celular y observación al microscopio: fue necesaria Cámara de Neubauer
- Viabilidad: Mediante una tinción celular con azul de metileno y observación en microscopio.

- Siembra en placas:
  - o Yeast Extract Peptone Dextrose (YEPD): Medio de cultivo general.
  - o Lisina: Medio cultivo específico para levaduras no-*Saccharomyces*.
  - o Wallerstein Lab Nutrient (WLN): distinción de color y morfología de especies.
- Atenuación y cambio de pH de las correspondientes fermentaciones. Densímetro y Phmetro
- Cálculo de densidad de inoculación: se utilizó una balanza y una jarra tarada.

#### 4.3 DETERMINACIÓN DE FRACCIONES DE MOLTURADO.

La malta utilizada fue Pilsen Nature de la casa “Castle Malting”. Se tomaron alrededor de 100g de muestra molturada.

El análisis se realizó siguiendo el método descrito por “American Society of Brewing Chemist”<sup>22</sup>. Mediante el test de tamices y con agitación de forma manual. Consta de 5 tamices con poros de 1.25/ 1 /0,5/ 0,25/ 0.125 mm.

La comprobación de si el almidón había sido completamente transformado durante el macerado, se realizó con Iodo 0.1M.



Figura 3. Tamices para molturado

#### 4.4 MEDICIÓN DE OXÍGENO DISUELTO EN CERVEZA.

Para realizar esta determinación fue utilizado un sensor óptico portátil, modelo HQ10 marca Hach. La medición de oxígeno se llevó a cabo “in situ”, momentos antes de envasar, en el bright tank, y al finalizar el envasado, sin permitir que entrara aire en la botella.

Este sensor expresa las medidas en mg/l o ppm, por lo que no es idóneo para esta clase de estudios, ya que el nivel de oxidación normalmente se encuentra en µg/l o ppb.



Figura 4. Oxímetro

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 COMPOSICIÓN DE AGUA Y AJUSTE PARA DIFERENTES CERVEZAS.

Los parámetros determinados en el agua son detallados en la tabla 2. Se puede observar que la desviación estándar relativa no supera en ninguno de los casos el 5% por lo que podemos afirmar que cada grupo de valores de la misma medida son muy similares.

Vamos a contrastar los valores medios obtenidos para el liquor con los recomendados por Jhon Palmer y Colin Kaminski (2013)<sup>7</sup>.

Comenzaremos con el contenido de ion sulfato, este es de 326 mg/l se encuentra por encima del máximo recomendado para el liquor (0- 250mg/l). Cantidades entre 200 y 400 mg/l de  $\text{SO}_4^{2-}$  incrementan la persistencia del amargor y acentúan el sabor y aroma del lúpulo.

La recomendación de ion cloruro se encuentra entre 0-100 mg/l, por lo que el agua analizada se encuentra entre los límites con un valor medio de 43 mg/l. Este ion proporciona redondez, plenitud e incluso cuando supera los 50mg/l le da carácter dulce a la malta y a la cerveza.

Tabla 2. Resultados generales obtenidos en el análisis de agua.

	Media	Máximo	Mínimo	<sup>1</sup> DE	<sup>2</sup> DER
Sulfatos ( $\text{SO}_4^{2-}$ mg/l)	326	330	320	5,77	1,76
Cloruros ( $\text{Cl}^-$ mg/l)	43	45	41	2,06	4,82
Calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ mg/l)	223	232	216	8,23	3,69
Magnesio ( $\text{Mg}^{+2}$ mg/l)	35	37	34	1,29	3,69
Alcalinidad ( $\text{CaCO}_3$ mg/l)	715	720	708	6,00	0,84
Dureza total ( $\text{CaCO}_3$ mg/l)	703	731	680	25,97	3,70
pH	7,48	7,52	7,46	0,03	0,38

<sup>1</sup>DE: Desviación estándar.

<sup>2</sup>DER: Desviación estándar relativa

La cantidad media de ion calcio determinado es de 223 mg/l, este se encuentra mínimamente por encima de la referencia marcada en la guía (50-200 mg/l). La reacción de este con los fosfatos de la malta es el principal mecanismo para la bajada de pH de maceración. El calcio no es perceptible al gusto, pero en altas concentraciones puede provocar gustos mineralizados.

En cuanto al ion magnesio, es recomendado que se encuentre en pequeñas cantidades entre 0 – 40 mg/l. Tiene una gran importancia como nutriente del mosto para la levadura (>5 mg/l). También, aunque en menor medida que el calcio, reduce el pH de macerado al reaccionar con el fosfato de la malta. En el agua analizado se han determinado una media de 35 mg/l de  $\text{Mg}^{+2}$ , encontrándose este valor dentro de las recomendaciones. Aunque el magnesio es generalmente necesario en pocas cantidades, puede ser añadido en niveles superiores para conferir un carácter amargo y astringente.

Respecto a la alcalinidad total, se obtuvo un valor medio de 715 mg/l  $\text{CaCO}_3$ , un valor 7 veces mayor del máximo recomendado (0-100). Esta cifra nos indica que el agua analizada tiene un alto poder tampón, por lo que va a ser muy resistente a cambios de pH, siendo esto un problema para el pH del macerado.

La suma de concentraciones de iones de calcio y magnesio (expresados en  $\text{CaCO}_3$ ) o lo que es lo mismo la dureza total, fue determinada obteniendo un valor medio de 703mg/l  $\text{CaCO}_3$ . Según la clasificación de Claude E. Boyd (2014) como podemos observar en la tabla 3, el agua analizada corresponde a muy dura (<300mg/l  $\text{CaCO}_3$ ). Para la elaboración de cerveza se recomienda que la dureza se encuentre entre 100 – 500mg/l.

Tabla 3. Clasificación de aguas según la dureza total, por Claude E. Boyd (2014).

Less than 50 mg/L	Soft
50–150 mg/L	Moderately hard
150–300 mg/L	Hard
More than 300 mg/L	Very hard

El pH medio determinado en el agua estudiada es de 7,48, se encuentra entre los límites recomendados para el pH del liquor (pH= 5 - 9,5). El pH del suministro de agua tiene poco efecto en la elaboración de cerveza, aunque nos puede dar indicios de su procedencia y tratamientos necesarios.

Por último, la alcalinidad residual calculada es 535 mg/l  $\text{CaCO}_3$ , por lo que durante la maceración se van a alcanzar pH más altos que utilizando agua destilada. Con el agua estudiada, sería aconsejable elaborar cervezas oscuras ya que este tipo de maltas ayudan a neutralizar la alcalinidad del agua, mejorando el rendimiento y el sabor de la cerveza.<sup>7</sup>

En la figura 5 podemos observar la evolución de los parámetros anteriormente estudiados, con los datos facilitados por el maestro cervecero, correspondientes a 2014 y 2015. Se puede ver como los iones Cloruro y Magnesio a lo largo de este tiempo han permanecido con valores muy similares. Por otro lado, el ion calcio, la dureza total y la alcalinidad alcanzan la máxima determinación en este último estudio realizado. En cambio, el ion sulfato alcanza máximos en el año 2014, durante 2015 disminuye aproximadamente al 50% y en 2017 vuelve aumentar llegando a 326 mg/l.

Como hemos podido observar analizando esta evolución, es que el agua está en continuo aumento y disminución de sus componentes, por ello es necesario un análisis continuo del agua y ajustar su composición para que no existan variaciones sensoriales en el producto final.

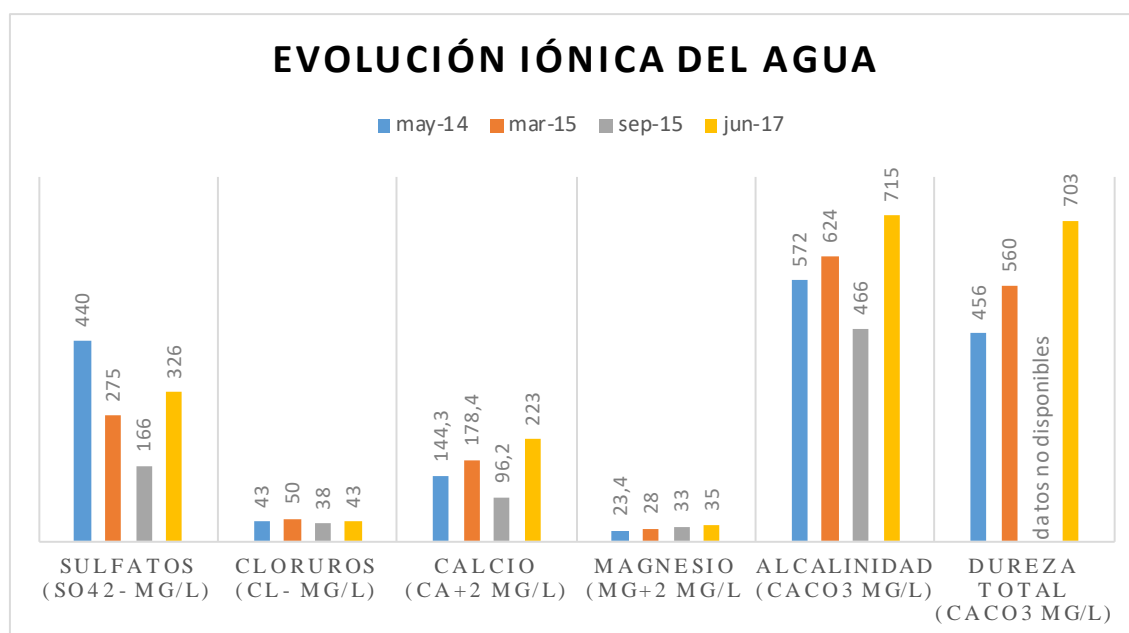


Figura 5. Evolución mineral del agua entre 2014 - 2017.

➤ Ajuste de agua para Espelta.

Espelta es una cerveza de estilo weissbier o cerveza de trigo, típica de Baviera (Alemania). El agua utilizada para su elaboración puede ser blanda o dura, ya que existen grandes variaciones entre las distintas fábricas alemanas. Algunas cervecías utilizan aguas con una dureza de 450 mg/l CaCO<sub>3</sub>, mientras que otras con aguas más blandas de 50 mg/l CaCO<sub>3</sub>. Nosotros siguiendo las recomendaciones de Jhon Palmer (2014)<sup>23</sup>, vamos a ajustar el agua.

En este caso, para reducir la carga mineral del agua, se diluiría agua de red en agua desionizada utilizaríamos 3/4 partes de agua osmotizada y 1/4 de agua de red proveniente del declorador. En la tabla 4 se observa que la relación sulfato/cloruro es de 7,4/1, se recomienda que esta relación se encuentre entre 5/1 - 1/0,5 para este tipo de cervezas. Para aumentar la cantidad de Cl<sup>-</sup> y obtener un balance ajustado, vamos a añadir 0,8g/l CaCl<sub>2</sub>. Esta adicción provoca un aumento de 39 ppm de Cl<sup>-</sup> y 22 ppm de Ca<sup>2+</sup>. Con el resultado de un balance final SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/Cl<sup>-</sup> de 1,6/1.

Tabla 4. Ajuste de agua para Espelta

	Alc. (CaCO <sub>3</sub> ppm)	Ca <sup>+2</sup> (ppm)	Mg <sup>+2</sup> (ppm)	aSO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (ppm)	Cl <sup>-</sup> (ppm)	Cloruro/ Sulfato
Recomendada	0-80	50-100	0-30	0-50	0-100	5/1 - 1/0,5
Dilución 1/4	179	56	9	81,5	11	7,5/1
Adicción	0	22	0	0	39	0
Final	179	78	9	81.5	50	1,6/1

## ➤ Ajuste de negra

Negra es una cerveza de estilo stout, necesita mayor cantidad de alcalinidad residual para equilibrar la acidez de las maltas especiales.<sup>21</sup> En el ajuste de agua para este estilo de cerveza seguiremos las recomendaciones de John J. Palmer (2017)<sup>21</sup>. Con el fin de disminuir la carga mineral se utilizará ½ de agua proveniente de la red (declorador) y ½ de agua des ionizada. Es importante en este estilo acentuar la maltosidad, para ello tiene que cumplir una relación sulfato/cloro aproximada de 1/1. Como podemos observar en la tabla 5, el agua diluida posee una cantidad de 163ppm de  $\text{SO}_4^{2-}$  y 22ppm de  $\text{Cl}^-$ . Es necesario incrementar la cantidad de ion cloruro en 90 ppm. Para ello se va a añadir 0,186g/l de  $\text{CaCl}_2$ , resultando una cantidad final de 112 ppm  $\text{Cl}^-$  y 162  $\text{Ca}^{2+}$ , con un balance final sulfato/cloro más aproximado de 1.5/1. Con esta adicción la Alcalinidad residual también varía pasando de 268 a 232 ppm  $\text{CaCO}_3$ , esta disminución de la alcalinidad residual no es un problema, ya que sigue siendo elevada.

Tabla 5. Ajuste de agua para Negra.

	$\text{Cl}^-$ (ppm)	$\text{Ca}^{2+}$ (ppm)	$\text{SO}_4^{2-}$ (ppm)	$\text{Mg}^{2+}$ (ppm)	Alc.Res. ( $\text{CaCO}_3$ ppm)	Cloruro/Sulfato
Recomendado	50-150	50-150	50-100	20	125	1/1 - 1/0,5
Diluida 1/2	22	111	163	18	268	7,4/1
Adicción 0.186g/l $\text{CaCl}_2$	+90	+51	0	0	-36	0
Agua Final	112	162	163	18	232	1,5/1

## 5.2 SEGUIMIENTO DURANTE REUTILIZACIÓN DE LEVADURA Y DOSIS DE INOCULACIÓN.

Los resultados de los diferentes análisis realizados, con el fin de conocer el estado de la levadura durante su reutilización son mostrados a continuación.

En la figura 6 se puede observar la viabilidad media, correspondiente a las diferentes generaciones de levadura. El porcentaje medio más alto, con un 96,71% de células viables, corresponden a la primera generación, mientras que el mínimo porcentaje de células vivas se encuentra en la sexta generación, con un 80,37%.

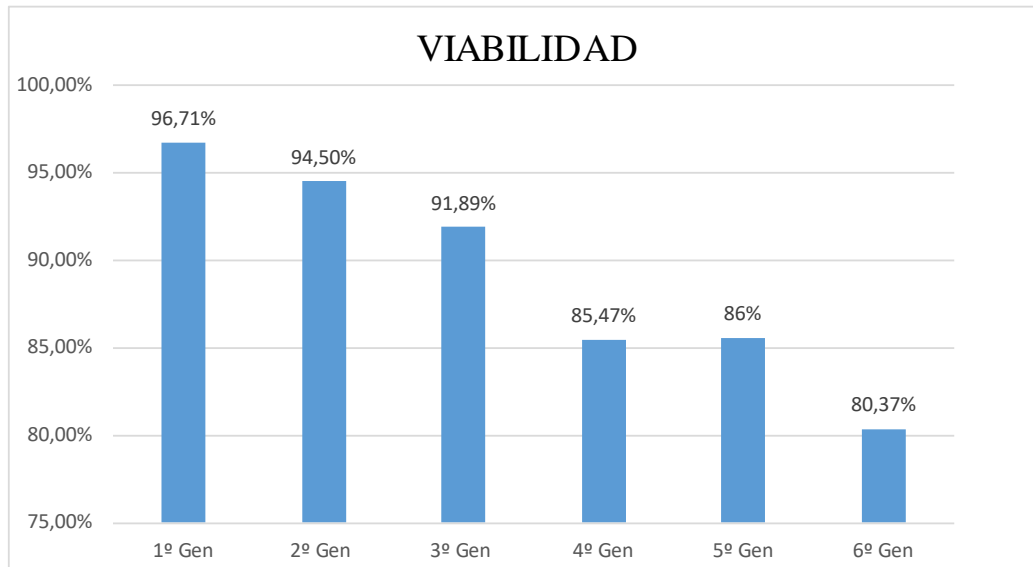


Figura 6. Evolución de viabilidad respecto a generaciones reutilizadas.

Se observa como desde la 1ª generación hasta la 3ª va disminuyendo progresivamente (~2.5%), mientras que de la 3ª a la 4ª hay una mayor variación (~6,5%). Este descenso puede ser justificado por una parada de fermentación correspondiente a levadura de 3ª generación, debido a un fallo en el sensor del sistema de frío, que mantuvo la fermentación a baja temperatura hasta paralizarla. Otro condicionante que pudo afectar, es el tiempo entre elaboraciones, que se elevó a 2 semanas en lugar de una como en el resto. En la figura 7 se observan las células muertas teñidas de azul.

Según autores como White et al, (2008) los resultados obtenidos en la 6ª generación no deberían ser tenidos en cuenta, ya que cuando el porcentaje de viabilidad es inferior a 85% el método utilizado de análisis utilizado podría sobrestimar la medida.<sup>18</sup>

Algunos autores recomiendan que para poder reutilizar la levadura en condiciones idóneas es necesario que tenga una viabilidad superior del 90%.<sup>9</sup> En este estudio observamos que este requisito solo es cumplido por las tres primeras generaciones. Pero por la experiencia del maestro cervecero se continuó inoculando esta levadura, con el resultado de atenuaciones, diferencias de pH y duración de fase lag correctos <12h.<sup>9</sup>

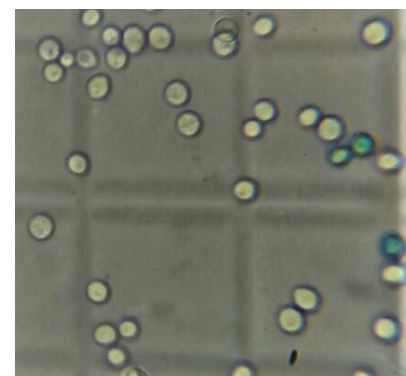


Figura 7. Tinción celular con azul de metileno



En la tabla 6 se muestran las atenuaciones y diferencias de pH correspondientes a cada generación reutilizada y a datos de otras elaboraciones.

Tabla 6. Comparación de atenuación aparente y cambio de pH.

GENERACIÓN	Atenuación Aparente	A.Aparente Otra elaboración	Cambio pH (inicial-final)	Cambio pH Otra elaboración
1 <sup>a</sup>	80,95%	-	5,52 - 4,56	-
2 <sup>a</sup>	75,44%	78,59%	5,26 - 4,32	5,1 - 4,3
3 <sup>a</sup>	83,08%	86,15%	5,27 - 4,65	5,3 - 4,5
4 <sup>a</sup>	84,78%	83,41%	5,24 - 4,28	5,3 - 4,2
5 <sup>a</sup>	86,96%	84,31%	5,30 - 4,28	5,3 - 4,3

La atenuación aparente y el cambio de pH de la primera generación no lo podemos comparar con ninguna otra elaboración debido a que corresponde a una elaboración nueva. Cada atenuación aparente corresponde a un tipo de receta, varía desde 75,44% hasta 86,96%. La bajada de pH en todos los casos fue alrededor de 1 punto, excepto en el caso de la generación 3<sup>a</sup> que fue de 0,62, siendo similar al valor registrado en fermentaciones de otras elaboraciones.

El siguiente paso en este estudio, fue analizar si existían contaminaciones en las diferentes generaciones reutilizadas para la inoculación del mosto. Los resultados obtenidos en los diferentes medios fueron los siguientes:

- Lisina: en ninguno de las siembras que se realizaron, pertenecientes a las diferentes generaciones se obtuvieron ninguna unidad formadora de colonia. Esto nos indica que la población de levaduras no-*Saccharomyces* es <1 log ufc/ml.
- Wallerstein Lab Nutrient: solo se distinguió un tipo de morfología, correspondiente a la levadura utilizada, en las diferentes generaciones de levadura. Podemos observar esta morfología en la figura 8.

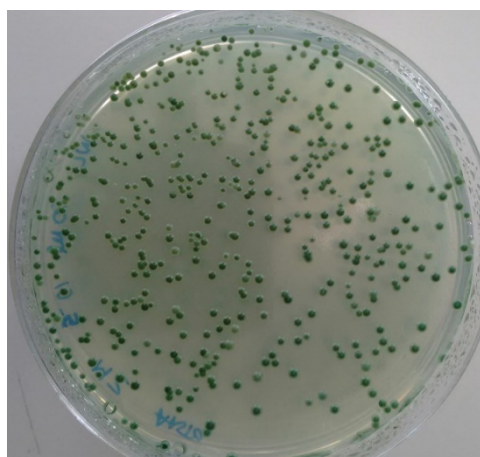


Figura 8. Morfología levadura (WLN)



Figura 9. Aparición de Bacterias (YEPD)

- YEPD: Entre la generación 1<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> no se observó ningún crecimiento de bacterias, únicamente de levaduras. En las placas de la 5<sup>a</sup> y 6<sup>a</sup> generación aparecieron ufc que no correspondían a levaduras, se pueden observar en la figura 9. Estas fueron observadas al microscopio, siendo identificadas como bacterias, los resultados obtenidos son mostrados en la tabla 7.

Tabla 7. Contaminación de bacterias.

Generación	Log Ufc/ml bacterias	Placas contaminadas/ placas totales
1 <sup>a</sup> , 2 <sup>a</sup> , 3 <sup>a</sup> , 4 <sup>a</sup>	<5	0/24
5 <sup>a</sup>	6,8	2/6
6 <sup>a</sup>	6,3	4/6

Esta contaminación pudo originarse durante la fermentación con la levadura de 3<sup>a</sup> generación. Debido a que, a causa de los problemas anteriormente descritos de parada de fermentación, fue necesario transvasar el mosto a otro tanque, mediante una bomba, para que de esta manera aumentara su temperatura. Resulta difícil identificar otra fuente de contaminación, por las medidas higiénicas llevadas a cabo en la cervecería.

En la tabla 8 se observan los resultados medios de las poblaciones de levaduras reutilizadas e inoculadas en las diferentes elaboraciones, mediante conteo con microscopio en cámara de Neubauer.

Tabla 8. Recuentos de levaduras correspondientes a las generaciones inoculadas.

GENERACIÓN	Población (log células/ml)
1°	9,18
2°	9,13
3°	9,02
4°	9,14
5°	9,09
6°	9,03
<b>Media</b>	<b>9,10</b>
<b>D. Estándar</b>	<b>0,06</b>
<b>D.E. Relativa</b>	<b>0,68%</b>

Se puede observar que las desviaciones son muy pequeñas, con una desviación típica relativa de 0,68%. Por lo que los valores de las poblaciones de las diferentes generaciones son muy similares. Analizando los resultados podemos afirmar que no existe ningún tipo de relación entre la densidad de población y el número de generación extraída, ya que disminuye y aumenta de forma aleatoria.

El cálculo de la población media en este estudio también ha sido utilizado para calcular la dosis de inoculación de levadura. Para ello se ha tomado como densidad poblacional la media de todas las generaciones reutilizadas, la cual es 9,10 log cel/ml que corresponde a  $1,26 \times 10^9$  cel/ml. Chris White y Jamil Zainasheff (2010) recomiendan para cervezas de tipo ale, inocular  $7,5 \times 10^5$  células por mililitro de mosto y por grados plato de densidad.

Es necesario inocular 0,59 ml de levadura reutilizada por cada litro de mosto y por grado plato, por lo tanto, para datos usuales en la cervecería como son 800 litros de mosto con una densidad de 11°Plato, serían necesarios inocular 5,19 litros de levadura. Para facilitar el trabajo se calculó la densidad de la levadura dando un resultado de 0,36 kg/l. Para el ejemplo propuesto se necesitarían 1,88 kg de levadura reutilizada para la inoculación.

### 5.3 ANÁLISIS DE FRACCIONES DE MOLTURADO

Los resultados medios obtenidos de las diferentes fracciones retenidas de molturado, correspondientes a 100g, son expuestos en la tabla 9. Se observa que la desviación típica relativa más alta se alcanza en las 2 últimas fracciones, esto es debido a que al ser cantidades retenidas más pequeñas los errores son más altos.

Tabla 9. Distribución de molturado en distintas fracciones.

Tamaño poro	Descripción	Media	Máximo	Mínimo	<sup>1</sup> DE	<sup>2</sup> DER
>1,25mm	Cáscaras	50,62	53,33	47,94	2,52	4,98%
1,25 - 1mm	Grano grueso	13,84	14,69	13,38	0,50	3,64%
1 - 0,5mm	Sémola fina I	18,53	19,99	17,00	1,33	7,16%
0,5 - 0,25mm	Sémola fina II	9,19	10,58	8,52	0,81	8,85%
0,25 - 0,125mm	Harina	5,24	4,26	6,02	0,72	13,84%
<0,125	Polvo	2,58	1,97	3,06	0,53	20,50%

<sup>1</sup>DE: Desviación estándar.

<sup>2</sup>DER: Desviación estándar relativa

Con el fin de analizar los resultados, vamos a comparar los datos obtenidos con los valores típicos recomendados por Zane C Barnes (2006)<sup>6</sup>.

Para el porcentaje de cáscaras se recomienda una retención del 18% en este tamiz, en nuestro caso nos encontramos con más del doble de este porcentaje con 50,62%. Basařová (2010)<sup>19</sup> recomienda un máximo para esta fracción de molturado del 30% quedándose igualmente distanciado del valor obtenido. Durante el análisis, fue examinada esta fracción sin encontrar granos enteros, pero si se encontraban partes de grano retenido entre las cáscaras como se puede observar en la figura 10. En la fracción correspondiente a grano grueso se retuvo una media de 13,84%, mientras que la cantidad recomendada es alrededor de la mitad 7%. Las fracciones sémola fina I con un valor medio de 18,53% y sémola fina II con 9,19% se encuentran por debajo de los límites recomendados, siendo estos de 35% y 20%, respectivamente. En el tamiz de harina se obtuvo una media de 5,24%, es la fracción de tamizado que más se aproxima al valor recomendado de 8%. De hecho, en los estudios de Basařová (2010)<sup>19</sup> este valor se encuentra entre los valores aconsejados (4-8%) Por último, en el fondo de los tamices correspondiente al polvo se recogió un valor medio de 2,58%, siendo este inferior a 12% el indicado por el autor.

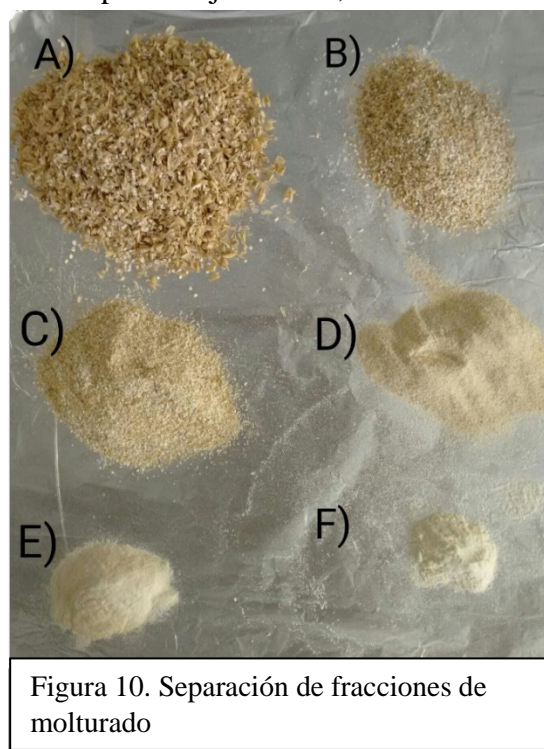


Figura 10. Separación de fracciones de molturado

Durante varias elaboraciones fueron realizadas la prueba del Iodo al final de la maceración, comprobando que todo el almidón había sido transformado en azúcares simples.

#### 5.4 INCREMENTO DE OXÍGENO DISUELTO EN CERVEZA DURANTE EL EMBOTELLADO.

Los resultados medios de la valoración de oxígeno disuelto, antes y después del embotellado, son mostrados en la tabla 10.

Tabla 10. Incremento de oxígeno durante el embotellado

	Antes (ppm)	Después (ppm)	Diferencia (ppm)
Prueba 1	0,28	0,72	0,44
Prueba 2	0,25	0,76	0,51
Media	0,27	0,74	0,48

Comenzaremos analizando el oxígeno disuelto en la cerveza antes de su envasado. El valor medio obtenido de 0,28ppm O<sub>2</sub>, queda muy por encima de los esperados tras la fermentación <0,03 ppm O<sub>2</sub><sup>20</sup>. La micro cervecería en estudio, utiliza sistema isobárico. Este sistema no permite entrada ni salida de aire en etapas finales de fermentación ni en su posterior maduración, estando en todo momento protegido por una capa superior de CO<sub>2</sub> generado por la propia levadura, razón que dificulta la entrada y contacto con oxígeno. El motivo de estas medidas elevadas se puede atribuir al error de lectura del oxímetro disponible en este estudio. Este oxímetro está destinado para lecturas de partes por millón de oxígeno disuelto, mientras que en cerveza terminada estas medidas deben realizarse con aproximaciones de partes por billón.

La cantidad de oxígeno aumenta un 177%, en concreto 0,48 ppm O<sub>2</sub>. El valor normalizado esperado de aumento de oxígeno en el envasado sería un máximo normalizado de 0,250 ppm O<sub>2</sub><sup>20</sup>, por lo que en nuestro caso se estaría prácticamente duplicando esta cantidad.

Al finalizar el envasado la mayoría de oxígeno del espacio de cabeza es expulsado mediante el empuje que ejerce la espuma de la cerveza, esta se forma al golpear de forma seca el culo de la botella.

El instituto cervecero VLB Berlín, en base a su experiencia marca como valor crítico 1 ppm de oxígeno en la botella<sup>21</sup>. En el caso de nuestro ensayo el valor medio se encuentra por debajo de este límite con 0,74 ppm O<sub>2</sub>.

## 6. CONCLUSIONES

El agua de red utilizada como “liquor” en la cervecería “Les Clandestinas de Montferri”, es caracterizada por ser un agua con alta carga iónica para la elaboración de cerveza, excepto en el caso de cloruros. Es un agua muy dura y con alta alcalinidad, siendo idónea para cervezas oscuras, ya que las maltas oscuras funcionan bien con los carbonatos y disminuyen el pH de macerado. Debido a los altos valores registrados en la composición del agua, para ajustar el agua a las diferentes recetas, es necesario disminuir el contenido mineral diluyéndola en agua des-ionizada en mayor o menor proporción, dependiendo del estilo de cerveza.

Es necesario realizar análisis de agua y ajustar las recetas con periodicidad, como hemos podido observar, esta cambia su composición de forma irregular, pudiendo interferir en la repetitividad sensorial del producto final.

La reutilización de levadura, mediante el sistema “cono a cono”, según los parámetros de viabilidad obtenidos podría ser utilizada hasta la 5ª generación (incluida), ya que no se observaron problemas de atenuación ni pH. En cambio, teniendo en cuenta la contaminación por bacterias se recomendaría reutilizar hasta la 4ª generación (incluida), dado que en las posteriores generaciones aparecen ufc de bacterias en cantidades elevadas. Por el contrario, no aparecen signos de contaminaciones por levaduras salvajes en ninguna de las generaciones. Este número de generaciones reutilizadas es reducido, algunos cerveceros reutilizan la levadura de tipo ale de 8 a 10 generaciones<sup>9</sup>. Con la mejora de los protocolos de limpieza y desinfección, o de elementos del equipo quizás podría aumentarse el número de generaciones reutilizadas. De igual forma, es recomendable repetir este estudio, puesto que el trascurso de la fermentación utilizando la 3ª generación de levadura no se dio con normalidad, sufriendo una parada. Esta parada pudo ser el vector de entrada para la contaminación y la disminución de viabilidad.

La dosis de inoculación recomendada para el tipo de cerveza fabricada en esta micro cervecería es de  $7,5 \times 10^5$  levaduras por ml de mosto y por grados plato. En este ensayo se ha determinado, que la densidad poblacional media de la levadura reutilizada es de  $1,26 \times 10^9$  cel/ml de levadura, por lo que dependiendo del volumen de producción y la densidad del mosto se puede calcular la dosis de inoculación necesaria. Aun así, se recomienda al maestro cervecerero que realice un conteo en cámara de Neubauer al microscopio, ya que la consistencia de esta población puede variar en cada fermentación.

Respecto al molturado, la cantidad de fracción denominada cáscaras y grano grueso es excesivamente más elevada que los calificados como valores idóneos, por el contrario, las fracciones de molturado más fino son más reducidas. Podemos asegurar que no va a existir problemas en la formación del lecho filtrante durante el macerado, ni aportación de polifenoles por rotura de cáscaras, ni problemas con el polvo producido. Sin embargo, pueden existir problemas de rendimiento por no tener suficiente superficie de ataque las enzimas. Los molinos de dos rodillos están muy limitados, ya que una excesiva reducción entre la distancia de los rodillos podría causar daño a la cáscara sin dar una distribución de tamaño de molturado adecuada. Este tipo de rodillos son útiles para maltas bien modificadas y para uso en pequeñas cervecerías, como es el caso de la micro cervecería en estudio.<sup>6</sup> Sería interesante para completar este análisis, realizar un estudio disminuyendo el espacio entre los rodillos del molturador y analizar si aumenta el rendimiento en la maceración, sin perder calidad del mosto ni el tiempo de filtrado.

La cantidad de oxígeno disuelta en la cerveza aumentó durante el envasado, encontrándose este incremento por encima de los niveles “esperados” determinados por otros autores. En cambio, la cantidad total de oxígeno disuelto en el envase no supera el valor considerado como crítico, por lo que la vida del producto no se va a ver afectada por esta introducción de oxígeno. Debido a la falta de precisión del instrumento de medición disponible, no ha sido posible profundizar más en este análisis.

**7. BIBLIOGRAFÍA**

1. Garcia, M., Quintero R., Lopez-Munguía, A. (1993) *Biotecnología alimentaria*, Editorial Limusa.
2. Hampson, T. (2013) –*World Beer- Outstanding classic and craft beers from the greatest breweries* (1<sup>st</sup> ed). New York
3. Brewers Association: <https://www.brewersassociation.org> (acceso 24/07/2017)
4. Pellettieri, M. (2015) *Quality management : essential planning for breweries*. United states of America
5. Huxley, S. (2006). *La cerveza poesía líquida. Un manual para cervesiófilos*. Universidad Politecnica de Valencia, España.
6. Fergus, P., Graham, S. (2006). *Handbook of brewing* (2<sup>nd</sup>ed)
7. Palmer, J., Kaminski, C. (2013). *Water : a comprehensive guide for brewers*. Boulder, Colorado.
8. Bamforth, C., *Handbook of alcoholic beverages series. Beer a quality perpespective*.
9. White, C., Zainasheff, J. (2010) *Yeast The Practical Guide to Beer Fermentation*. Boulder, Colorado.
10. Oliver, G., Colicchio, T. (2012) *The oxford companion to beer*. Oxford, New York.
11. Kunze, W. (2006). *Tecnología para Cerveceros y Malteros*. Berlín, Alemania.
12. Mallet, J. (2014). *Malt. A practical guide from field to brewhouse*. Boulder, Colorado.
13. Bamforth, C. (2016). *Brewing materials and processes. A practical approach to beer excellence*. University of California Davis, USA.
14. Boulton, C., Quain, D. (2001) *Brewing yeast and fermentation*.
15. Bamforth, C. (1999) *The science and understanding of the flavour stability of beer: a critical assessment*. Brauwelt Int.
16. Boyd, C. (2015) *Water quality an introduction*. Auburn university, AL, USA.
17. Warner, E. (1992) *Classic beer style series. 7 German wheat beer*. Boulder, Colorado
18. White, L.R., Richardson, K.E., Schiewe, A.J., White, C.E., (2008). *Comparison of yeast viability/vitality methods and their relationship to fermentation performance*. In: Smart,

- K. (Ed.), *Brewing Yeast Fermentation Performance*, second ed. Blackwell Science, UK, pp. 38e147.
19. Basařová, G., Šavel J., Basař P., Lejsek T. (2010): *Pivovarství. Teorie a praxe výroby piva*. University of Chemistry and Technology Prague, Prague.
20. Reducing total to package oxygen [http://www.heateflex.com/wp-content/uploads/2016/05/bbii\\_2-16\\_s\\_32-35.pdf](http://www.heateflex.com/wp-content/uploads/2016/05/bbii_2-16_s_32-35.pdf) (acceso 28/08/2017)
21. Palmer, J. (2017) *How to brew. Everything you need to know to great beer every time*. (4<sup>th</sup>ed). Boulder, Colorado.
22. American Society of brewing Chemist, ASBC. ((2006) *Laboratory methods for craft brewers*. CD-ROM
23. Palmer, J. (2014) *Palmer's water adjustment calculator app instructions*. <https://www.lamotte.com/images/palmerswatercalc.xls> (acceso 31/08/2017)





## ANEXO 1: FICHA DE LEVADURA UTILIZADA EN EL ESTUDIO

## White Labs Certificate of Quality Assurance

For Lot #1035938

QC Release Date: 3/12/2017

Commercial PurePitch® Best Before: 7/10/2017

Manufacturing Location: San Diego, CA

Strain Number	Tests Performed	Results	Tester
WLP001	HLP	0	Staff
WLP001	LCSM	0	Staff
WLP001	WLD	0	Staff
WLP001	pH Test	3.92	sarredondo
WLP001	Cell Counting	2.85e9	sarredondo

### White Labs Professional Grade Yeast

#### Confidentiality

White Labs is an independent laboratory, and confidentiality is maintained with all customers, including yeast selection, laboratory analysis, and consulting.

#### Yeast Guarantee

White Labs goal is to become the best yeast production company in the world. We guarantee that each White Labs Liquid Yeast culture supplied meets our strict quality control standards. These QC standards are outlined on the Certificate of Quality Assurance supplied with the yeast and can also be found on our website. The QC standards define our requirements for purity and viability. We want you to have the best fermentation every time. If not, please contact us and we will work with you to make it right. White Labs is not responsible for other ingredient costs, beer costs, labor, etc, but we stand behind our product and our promise to you is that each batch is rigorously tested before it is released to you.

#### Explanation of Quality Control Tests

Yeast is held for one week following production in order to clear the QC process. We plate the yeast on different media to assure culture purity. We also examine cell shape, test viability, and cell count. Additional samples are taken after packaging, and are stored at White Labs to facilitate fermentation troubleshooting. All of our tests adhere to American Society of Brewing Chemists' guidelines, where applicable.

#### Viability

We ensure that viability is over 95% before we ship yeast.

#### pH

A measure of the acidity of the yeast solution. The range will usually be between 3.5-4.5.

#### Viable Cell Count

Cell counts are reported for every lot based on a spin down method (percent solids). The spin downs are validated to cell counts by regular manual cell counts. Our target cell count range is between  $1.5 \times 10^9$  to  $3.0 \times 10^9$  cells /ml.

Our cell counts can vary by strain because of cell size and some strains will naturally have more cells per volume than others, so we provide the range as a reference. We have found this to be an accurate method of predicting consistency of yeast performance during fermentation.

#### Lin's Cupric Sulfate Medium (LCSM)

This medium utilizes cupric sulfate to inhibit the growth of brewers yeast and ensures no contamination of non-Saccharomyces wild yeast. If any growth is detected on these plates at White Labs, the yeast is not shipped.

#### Hsu's Lactobacillus and Pediococcus Medium (HLP)

This medium is used to look for the presence of Lactobacillus and Pediococcus. These bacteria are anaerobic, heat sensitive bacteria, and are called 'beer spoilers' because they are most often associated with post wort production contamination. If any growth is detected in the test tubes at White Labs, the yeast is not shipped.

#### Wallerstein Differential (WLD)

This medium is used to check for bacteria and Saccharomyces-type wild yeast. Most aerobic bacteria will grow on these plates, and some anaerobic bacteria also display growth. Bacterial contamination seen on these plates is termed 'wort bacteria' because they are most often associated with wort contamination, usually doing most of their damage before the onset of fermentation. If any growth is detected on these plates at White Labs, the yeast is not shipped.

