

Ana Carolina de Lima e Silva

**ESTUDIO DE LA APLICACIÓN DE TRATAMIENTO TÉRMICO
OPTIMIZADO Y DE LA ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA EN
CERVEZAS ARTESANAS: INCREMENTO DE *SHELF LIFE* Y
MANUTENCIÓN DE LA CALIDAD DEL PRODUCTO.**

**ANALYSIS OF AN OPTIMIZED PASTEURIZATION TREATMENT AND
THE MICROBIAL STABILITY IN CRAFT BEER: ENHANCING SHELF
LIFE OF THE PRODUCT.**

TRABAJO FINAL DE MÁSTER

dirigido por Roger Plata Cots

Máster en BEBIDAS FERMENTADAS

Facultat d'Enologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

Septiembre de 2018.

Índice

RESUMEN.....	4
Abstract.....	5
1. Introducción.....	6
2. Materiales y Métodos - Descripción General de los ensayos	9
2.1. Cerveza	9
2.1.1. Determinación de los tiempos de Pasteurización	11
2.2. Análisis	13
2.2.1. Análisis Físico-químicas y microbiológicas	13
2.2.2. Análisis Sensorial	14
3. Resultados	16
3.1. Pasteurización.....	16
3.2. Analíticas de la cerveza	17
3.2.1. Físico-Química	17
3.2.1. Microbiológica.....	19
3.3. Análisis Sensorial	20
4. Conclusiones.....	22
5. Agradecimientos	23
ANEXOS.....	24
Anexo 1: Laboratory Membrane Filtration Technique.....	24
Anexo 2: pH of Beer.....	26
Anexo 3: Colour of Beer: Spectrophotometric Method (IM)	27
Anexo 4: Bitterness of Beer (IM)	28
Anexo 5: Measurement of Dissolved Oxygen by Optical Sensors	30
Anexo 6: Sensory Analysis: Triangle Test.....	33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

Índice de Tablas

Tabla 1: Valores típicos de UP para diferentes tipos de cervezas	10
Tabla 2: Principales Causas de la inestabilidad Microbiológica en Cerveza	11
Tabla 3: Tiempos de Mantenimiento en Pasteurización	12
Tabla 4: Tiempo necesario para alcanzar la temperatura predeterminada en el centro de la botella	12
Tabla 5: Hoja de Puntuaciones presentada a los Panelistas	15
Tabla 6: Parámetros para determinación de la mejor temperatura de Pasteurización .	16

Tabla 7: Análisis comparativo de las características de las Cervezas analizadas	17
Tabla 8: Resultado del Análisis Microbiológico	19

Índice de Figuras

Figura 1: Sistema de pasteurización	43
Figura 2: Medidor de pH.....	43
Figura 3 : Espectofotometro.....	43
Figura 4: Oxímetro	43
Figura 5: Agitador Magnético.....	43
Figura 6: Filtración a Vacío	43
Figura 7: Ebulómetro.....	44
Figura 8: Análisis Microbiológica Rosita y Wipa - LEVADURAS	44
Figura 9: Análisis Microbiológica Rosita y Wipa - BACTERIAS.....	44

Índice de Gráficas

Gráfica 1: Datos Comparativos de Color en EBC	18
Gráfica 2: Datos Comparativos de IBU.....	19
Gráfica 3: Análisis de los resultados del Test Triangular	21

RESUMEN

TITULO:

Estudio de la aplicación de tratamiento térmico optimizado y de la estabilidad microbiológica en cervezas artesanas: incremento de *shelf life* y manutención de la calidad del producto.

ABSTRACT

TITLE:

Analysis of an optimized pasteurization treatment and the microbial stability in craft beer: enhancing shelf life of the product.

Ana Carolina de Lima e Silva

Máster en Bebidas Fermentadas, Especialidad Ciencia y Tecnología de la Cerveza, Facultad de Enología, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España.

Resumen

La pasteurización es el tratamiento térmico aplicable a la cerveza que permite aumentar su *shelf life* garantizando su estabilidad microbiológica. Tratamiento poco aplicable en el sector cervecero artesanal debido a la creencia de que el proceso térmico altera el sabor y la calidad del producto final. El objetivo de ese estudio fue identificar la mejor relación tiempo-temperatura de pasteurización que garantizara la estabilidad microbiológica de la cerveza y que no provocara alteraciones sensoriales significativas en el producto final. Para eso fue elegido dos estilos de cerveza, Pilsen y WIPA, que fueron sometidas a diferentes temperaturas y tiempos de pasteurización – 70°C a 2 minutos; 80°C a 1 minuto; 90°C a 0,5 minutos -, y después analizadas microbiológica y sensorialmente para garantizar que se mantuvieran las características primarias de la cerveza - color, pH y amargor -, para determinar la estabilidad microbiológica y, finalmente para asegurar la calidad sensorial del producto. Se pudo concluir que la relación tiempo-temperatura - 80°C a 1 minuto – era la más adecuada al proceso, pues en ella se pudo garantizar la estabilidad microbiológica y no se pudo identificar diferencias sensoriales entre el blanco no pasteurizado y la muestra pasteurizada.

Palabras clave: cerveza, pasteurización, estabilidad microbiológica, calidad sensorial, *shelf life*.

Abstract

Pasteurization can be defined as a heat/thermal applied to beer, enabling the extension of the *shelf life* and at the same time, ensuring its microbiological stability. This treatment is not often the chosen one for the craft beer sector due to the belief that it can change the final tasting of the final product. This project aimed at identifying which is the best time and temperature ratio for the pasteurisation process, that could guarantee the microbiological stability of the beer without adding or changing significantly the principal characteristics of the product. In order to do so, two different types of beer were chosen: Pilsen and WIPA. Different temperatures and pasteurization times - 70°C to 2 minutes; 80°C to 1 minute; 90°C to 0,5 minutes -, were applied to them, following a microbiological and sensorial analysis in order to assure that their specific characteristics - colour, pH and bitterness. The relation between time-temperature at 80°C for 1 minute was the most suitable to the process, since the microbiological stability was sustained during the process and no differences on the sensorial analysis were found between control and the pasteurized sample.

Keyword: beer, pasteurization, microbiological stability, shelf life, tasting/flavor.

1. Introducción

Producir cerveza es esencialmente una combinación de ingeniería con botánica, bioquímica, química y microbiología. La evidencia arqueológica indica que la cerveza viene siendo producida desde antes de 4000 aC, pero la naturaleza microbiológica del proceso solamente se ha entendido en los últimos 150 años. La aplicación de la microbiología para optimizar el proceso en los términos de eficiencia y calidad son aún más recientes. Hay dos aspectos principales de la microbiología cervecera: la calidad de la cultura de levadura en sí, y el control de varios posibles contaminantes microbianos (Priest, Fergus G.; Campbell, 2003).

La cerveza es una bebida alcohólica obtenida por la fermentación de los azúcares de los cereales malteados. Debido a las características inherentes al producto, como bajo pH, alta concentración de alcohol, acción antiséptica de los ácidos del lúpulo, bajo nivel de nutrientes, baja concentración de oxígeno y carbonatación, la cerveza mantiene su estabilidad microbiológica. La actividad de la levadura produce compuestos responsables por el sabor de la cerveza, ventajosos para su calidad, pero también pueden crear sabores desagradables e indeseables (Milani & Silva, 2017).

El crecimiento del mercado cervecero artesanal y la expansión de las *craft* nacionales al mercado externo conlleva a problemas de calidad que antes no eran planteados por las microcervecerías artesanales. Por ser un producto de baja filtración, la cantidad de microorganismos presentes en la cerveza, puede llevar a inestabilidad y deterioro del producto, si entre otros factores, la temperatura de almacenado o de transporte superara los 25°C.

Los problemas microbiológicos asociados a la cerveza son, casi que en su totalidad, aquellos relacionados con la presencia de malos olores y alteraciones visibles causadas por el crecimiento de microorganismos ajenos a los que participan en la fermentación, durante la elaboración de la cerveza o en la cerveza terminada (Varnam A. H.; Sutherland, Jane P.; Dalmau, 1996). Existen millones de microorganismos que deterioran los alimentos. Sin embargo, en

general, los responsables del deterioro de la cerveza consisten en un número limitado de bacterias y levaduras salvajes (Russell, Inge; Bamforth, Charles W.; Stewart, 2009). Las levaduras salvajes generalmente se definen como aquellas levaduras no usadas deliberadamente y que no están bajo control total, estas incluyen levaduras contaminantes en la inoculación y aquellas provenientes del aire u otras materias primas (Russell, Inge; Bamforth, Charles W.; Stewart, 2009).

La pasteurización es el proceso térmico que tiene como objetivo inactivar la levadura utilizada junto con microorganismos potencialmente deteriorantes tales como levaduras salvajes, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y otras bacterias que pueden contaminar la cerveza durante la fermentación. La pasteurización permite la estabilización de la bebida por un período más largo, aumentando la *shelf-life* de la cerveza (Milani, Gardner, & Silva, 2015).

El impulso para reducir la pasteurización y mejorar la calidad del producto está firmemente arraigado en las características negativas del sabor atribuidas al procesamiento térmico (Boulton, C. Quain, 2006). Como el sabor se deteriora luego de la pasteurización, particularmente cuando el contenido de oxígeno disuelto es mayor que 2ppm (Dennis E. Briggs, Chris A. Boulton, 2004), existen incentivos para que los cerveceros reduzcan el número de 'Unidades de Pasteurización' empleados, de lo contrario la estabilización microbiológica es a expensas de estabilidad coloidal y sabor. Esta reducción se logra a través de una menor temperatura y/o tiempo de pasteurización (Bamforth, 2006). En general, se acepta que los caracteres "cocinados" se puedan evitar, o al menos gestionar, reduciendo los regímenes de pasteurización (Boulton, C. Quain, 2006).

El objetivo principal de este estudio es optimizar las condiciones de pasteurización e identificar la mejor relación tiempo-temperatura, que puedan ser empleadas como tratamiento térmico, garantizando además de la estabilidad microbiológica de la cerveza, la manutención de sus características sensoriales, incrementando así su *shelf-life*, sin provocar grandes alteraciones

en su sabor y asegurando la calidad del producto final mismo después de expuestas a condiciones inadecuadas de almacenamiento.

2. Materiales y Métodos - Descripción General de los ensayos

2.1. Cerveza

Dos estilos de cerveza artesanal, Pils – Rosita Original, e IPA – WIPA, producidas por la Cervecería Las Gardenias, localizada en la ciudad de Alcover, Tarragona, España, con Densidad Original entre 12,5 - 13°P y 11,5 - 12°P, pH 4,5, contenido alcohólico 5,5% y 4,7% v/v, amargor 8 IBU (International Bitterness Unit) y 24 IBU y color 4,5 SRM (Standard Reference Methods)/8,9 EBC (European Brewery Convention) y 3,3 SRM/6,5 EBC, pertenecientes a los lotes 12818 y 12718, fecha de caducidad 11/2019, respectivamente, han sido utilizadas en este estudio. Las botellas son de 330mL, de color ámbar y cerradas con corona. Las cervezas son embotelladas ya listas para la venta, sin necesidad de una segunda fermentación en botella. El contenido de alcohol se leyó en la etiqueta de la botella con base en alcohol por volumen (abreviado como ABV o alc/vol). Esto es una medida estándar de la cantidad de alcohol (etanol) que contiene un dado volumen de una bebida alcohólica. Se expresa como un volumen por ciento y se define como la cantidad de mililitros de etanol puro presente en 100 mL de cerveza a 20° C (% v/v de etanol) (Milani & Silva, 2017).

Estos dos estilos de cerveza han sido elegidos debido a ser los estilos más vendidos tanto en el mercado interno como en el exterior y por ser cervezas que presentan perfiles aromáticos distintos, la Rosita Original poco lupulada y más alcohólica y la WIPA más lupulada y aromática debido a las especies utilizadas en su formulación pero menos alcohólica.

2.2 Pasteurización

El calor es letal para los microorganismos, pero cada especie tiene su propia tolerancia a un calor particular. Durante un proceso de inactivación térmica, como la pasteurización, la tasa de destrucción es logarítmica, como su tasa de crecimiento. Por lo tanto, las bacterias sometidas al calor mueren a un ritmo que es proporcional a la cantidad de organismos presentes. El proceso depende tanto de la temperatura de exposición y el tiempo requerido a esta temperatura para lograr la tasa deseada de destrucción. Por lo tanto, los

cálculos térmicos implican la necesidad de conocer la concentración de microorganismos a destruir, la concentración aceptable de microorganismos que pueden quedarse atrás (organismos de descomposición, por ejemplo, pero no patógenos), la resistencia térmica de los microorganismos (los más tolerantes al calor) y la relación temperatura-tiempo requerido para la destrucción de los organismos objetivo. La extensión del tratamiento de pasteurización requerido está determinada por la resistencia al calor del microorganismo más resistente al calor en el alimento (Goff, 1968).

La estabilización microbiológica de la cerveza por tratamiento térmico sigue siendo el método más común. La medida de pasteurización para cerveza es la UP (Unidad de Pasteurización) y 1 UP equivale a la acción letal a 60°C durante 1 min. Matemáticamente las Unidades de Pasterización se calculan a través de la siguiente ecuación:

$$UP = t \cdot 1,393^{(T_b - 60)}$$

donde t es el tiempo de exposición de la cerveza en el proceso y T_b es la temperatura en °C del centro geométrico del envase del producto (Patiño & Velásquez, 2001).

Tabla 1: Valores típicos de UP para diferentes tipos de cervezas

Producto	UP Típico mínimo	UP Típico máximo
Pilsner y Lager	15	25
Ales y Stout	20	35
Cervezas bajas en Alcohol	40	60
Cervezas sin Alcohol	80	120

Fuente 1: (European Brewery Convention, 2017)

Típicamente, a temperaturas de más de 50°C, un aumento en la temperatura de 7°C (z-value) acelera la tasa de muerte celular en diez veces (Dennis E. Briggs, Chris A. Boulton, 2004). El efecto letal (UP) de la aplicación de calor a los microorganismos es un producto de la tasa letal de inactivación y el tiempo de aplicación. Según la European Brewery Covention (EBC), la Tasa Letal (L_t)

puede ser calculada por la siguiente ecuación:

$$L_t = 1,393^{(T-60)}$$

donde, T es la temperatura utilizada para la pasteurización.

Las poblaciones mixtas de organismos contaminantes más comunes en las cervecerías se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 2: Principales Causas de la inestabilidad Microbiológica en Cerveza

Fase	Contaminantes más comunes	Efectos
Cebada y Malta	<i>Fusarium</i>	Gushing, micotoxinas, nitrosaminas
Agua	Coliformes	Mosto inestable
Levadura	Levaduras Salvajes	<i>Off-flavor</i> /olores, super atenuación, alteración en la floculación, <i>Killer Activity</i>
	Enterobacterias, Bacterias Acéticas y Lácticas	Alto contenido de Diacetil y Dimetilsulfito (DMS)
Mosto	Enterobacteria	Ralentización de la fermentación, <i>Off-flavor</i> /olores, turbidez
Fermentación	Bacterias Acéticas y Lácticas	Sabor a vinagre/olor, exceso de carbonatación
Embotellado	Bacteria Láctica y Acética, <i>Megasphaera</i> y <i>Pectinatus</i>	<i>Off-flavor</i> /olor, turbidez
Almacenado	Bacterias Acéticas y Lácticas	Biofilm, turbidez
	Levaduras Salvajes	Biofilm, turbidez

Fuente 2: Russell, Inge; Bamforth, Charles W.; Stewart, 2009

Para ese estudio se llevó en consideración el análisis general de microorganismos – levadura y bacterias -, presentes en el producto final.

2.1.1. Determinación de los tiempos de Pasteurización

Fueron fijadas las temperaturas de 70°C, 80°C y 90°C, la UP pre establecida fue 25 - que es una UP intermedia que sirve de medida para los dos estilos de cerveza -, y el tiempo pre establecido para cada temperatura (Tabla 3) fue estipulado aplicándose la fórmula de la UP,

$$UP = t. 1,393^{(T_b-60)}$$

calculando el tiempo como,

$$t = \frac{UP}{1,393^{(T_b-60)}}$$

y llevándose en consideración el tiempo mínimo de exposición necesario para que los microorganismos presentes en la cerveza fueran inactivados.

Tabla 3: Tiempos de Mantenimiento en Pasteurización

Producto	Temperatura	Tiempo	Tasa Letal
ROSITA/WIPA	70°C	2min	27,51
	80°C	1min	156,87
	90°C	0,5min	20822,52

Fuente 3: El propio autor

Con eso, se buscó la eficiencia en el proceso, estabilidad microbiológica y minimización de los daños sensoriales, manteniendo así la calidad del producto final. Para eso se sometió las cervezas Rosita y WIPA a un baño térmico en agua a 95°C. Para ese experimento se utilizó una olla de acero inoxidable, un calentador de llama a gas y termómetros¹. Los termómetros fueron utilizados para medir la temperatura del baño y para medir la temperatura en el centro de la botella siendo para eso, introducidos y fijados en la olla de acero y en la botella respectivamente. Las botellas fueron llevadas al baño a 95°C sobre una rejilla para que no tocasen el fondo de la olla. Las botellas estuvieron sumergidas hasta el cuello. Se midió el tiempo necesario para alcanzar las temperaturas pre determinadas en el centro de la botella Tabla 4.

Tabla 4: Tiempo necesario para alcanzar la temperatura predeterminada en el centro de la botella

TEMPERATURA	TIEMPO EN MINUTOS	TIEMPO TOTAL EN EL PASTEURIZADOR EN MINUTOS
70°C	3min	5min
80°C	5min	6min
90°C	12min	12min30s

Fuente 4: El propio autor

¹ Ver Figura 1.

Para ese estudio, las botellas fueron sometidas al tratamiento térmico después de embotelladas y chapadas. Al alcanzar el tiempo de tratamiento las botellas fueron enfriadas en agua hasta alcanzaren los 20°C, fueron rotuladas y almacenadas para los análisis físico-químicos y microbiológicos posteriores para constatar la eficiencia del proceso según los patrones de análisis predeterminados y fijar la mejor relación tiempo-temperatura para el estudio.

2.2. Análisis

2.2.1. Análisis Físico-químicas y microbiológicas

Las analíticas físico-química y microbiológicas de las cervezas se realizaron en el laboratorio de la Universitat Rovira i Virgili de acuerdo con las técnicas determinadas pela EBC siendo, Análisis de Microorganismos Contaminantes EBC – Técnicas de Microbiología – 2.3.2.1 *Laboratory Membrane Filtration Technique*², pH – Cerveza EBC – 9.35 *pH of Beer*³, Color – Cerveza EBC – 9.6 *Colour of Beer: Spectrophotometric Method (IM)*⁴, IBU – Cerveza EBC – 9.8 *Bitterness of Beer (IM)*⁵ y Oxígeno – Cerveza EBC – 9.37.1 *Measurement of Dissolved Oxygen by Optical Sensors*⁶ (European Brewery Convention, 2017).

Las analíticas físico-químicas de la cerveza fueron contrastadas con los datos proveídos por la fábrica cuyas análisis son hechas en INCAVI - Instituto Catalán de la Viña y del Vino (Catalunya, 2018) y en el Laboratorio de Análisis AETCM (AETCM, 2018).

Todas las muestras fueron previamente descarbonatadas en un agitador magnético - menos para las analíticas de Oxígeno y Microfiltración donde las cervezas fueron sometidas al análisis inmediatamente después de su apertura - , y los equipos utilizados en las analíticas fueron: para medir el pH un pH-meter BASIC 20+ de CRISON⁷; las medidas de color e IBU fueron determinados en un espectrofotómetro Genesis 10UV – Thermo Electron Corporation⁸, utilizando

² Ver Anexo 1.

³ Ver Anexo 2.

⁴ Ver Anexo 3.

⁵ Ver Anexo 4.

⁶ Ver Anexo 5.

⁷ Ver Figura 2.

⁸ Ver Figura 3.

las absorbancia 430nm y 275nm respectivamente. Para medición de oxígeno se utilizó el oxímetro HQ 10 de la HACH LDO⁹. Para el contenido de alcohol se utilizó un agitador con imán de la P Selecta® – AGIMATIC – N¹⁰ y ebulómetro de GAB System¹¹. Para el análisis de detección de contaminantes se utilizó el sistema de filtración en vacío Millipore®¹², con filtros de membrana de 0,45 y 0,22 µm, que fueron sembrados en placas selectivas - medio YPD con Cloranfenicol y medio YPD con Natamicina para levadura y bacteria respectivamente.

2.2.2. Análisis Sensorial

El análisis sensorial fue hecho mediante un test triangular, basado en la metodología de la EBC, 13.7 *Sensory Analysis: Triangle Test*¹³ (European Brewery Convention, 2017), donde se buscó analizar el aroma y el sabor para detectar posibles diferencias entre el blanco no pasteurizado y las muestras sometidas al tratamiento térmico. La Hoja de Puntuaciones presentada a los panelistas (Tabla 5) es basada en la hoja de puntuaciones de la EBC con pequeñas modificaciones para adecuarse al estudio. El test triangular consiste en un conjunto de tres muestras codificadas, dos de las cuales son idénticas. Al asesor se le pide que indique la muestra que es diferente de las otras dos. Las respuestas obtenidas se analizan mediante las tablas proveídas por la EBC. Los resultados son analizados y contextualizados de acuerdo con el test triangular a que se hizo referencia, test triangular de similitud o test triangular de diferencia. En ese estudio el test de referencia utilizado fue el Test Triangular de Diferencia, que busca identificar si hay diferencias significativas entre el blanco no pasteurizado y las muestras sometidas a tratamiento térmico.

La cata fue realizada en momentos distintos del experimento. En un primer momento, después de constatada la eficiencia físico-química y microbiológica en el proceso, se procedió a la primera cata, para determinar posibles

⁹ Ver Figura 4.

¹⁰ Ver Figura 5.

¹¹ Ver Figura 6.

¹² Ver Figura 7.

¹³ Ver Anexo 6.

alteraciones en el aroma y sabor y fijar la mejor temperatura para pasteurización. Esa cata fue hecha con un total de 12 panelistas trabajadores de la fábrica. En un segundo momento, después de ya haber fijado la mejor temperatura de pasteurización para seguir el estudio, se procedió a una cata con la cerveza pasteurizada a esa dada temperatura, donde la cantidad de panelistas fue determinada de acuerdo con el número fijado en la Tabla 1 de la normativa EBC 13.7 *Sensory Analysis: Triangle Test* (European Brewery Convention, 2017), basándose en la sensibilidad establecida para aplicación del análisis sensorial. Los panelistas en ese segundo momento fueron personas pertenecientes a grupos de visitantes de la fábrica y consumidores habituales de cerveza.

Tabla 5: Hoja de Puntuaciones presentada a los Panelistas

Hoja de Puntuaciones	
Nombre:	
e-mail:	Tel:
Fecha: / / 2018	Producto: (<input type="checkbox"/>) Rosita Original (<input type="checkbox"/>) WIPA
Instrucciones:	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Le presentamos tres muestras de cerveza. 2. Evalúe las muestras de izquierda a derecha. 3. Indique la muestra que le parezca diferente. 4. Si no hay diferencias entre las muestras no señale. 	
Conjunto de las tres muestras:	
_____ _____ _____	
Comentarios:	

Fuente 5: El próprio autor

3. Resultados

3.1. Pasteurización

La predicción del deterioro del sabor de la cerveza debido al estrés térmico no solo puede basarse en un único parámetro como el número de UP. En cambio, los factores que influyen son múltiples. Entre los más importantes, además de la composición de la cerveza, están el tiempo de retención, la temperatura de pasteurización y el contenido de oxígeno de la cerveza. Ensayos exhaustivos sobre el impacto de la pasteurización en la calidad de la cerveza mostraron que las temperaturas de pasteurización más altas y los tiempos de mantenimiento más cortos asociados son favorables tanto para la calidad de la cerveza como para la estabilidad del sabor (Zufall & Wackerbauer, 2000). Una combinación de un nivel de UP con una cierta temperatura de Pasteurización conduce a un tiempo de mantenimiento específico como demostrado en la Tabla 3.

Para evaluar la mejor relación tiempo-temperatura, se observó en las analíticas microbiológicas de los filtros sembrados en las placas YPD, la presencia de microorganismos en las muestras después de aplicado el tratamiento térmico¹⁴. Las temperaturas que presentaron mejor eficiencia al tratamiento térmico fueron 80 y 90°C (Tabla 6). En esas temperaturas no se pudo detectar presencia de microorganismos que puedan causar inestabilidad y pérdida de calidad del producto.

Para ese estudio se utilizó la temperatura de 80°C debido a que, a esa temperatura se podía garantizar además de la eficiencia del proceso la seguridad del procedimiento.

Tabla 6: Parámetros para determinación de la mejor temperatura de Pasteurización

Producto	Levadura				Bacteria			
	Sin Pasteurizar	70°C	80°C	90°C	Sin Pasteurizar	70°C	80°C	90°C
Rosita	Sí	No	No	No	Sí	Sí	No	No
WIPA	Sí	No	No	No	Sí	Sí	No	No

Fuente 6: El propio autor

¹⁴ Ver Figura 8 y 9.

3.2. Analíticas de la cerveza

Los resultados que se presentan en ese apartado se refieren a la temperatura de pasteurización de 80°C a 1 minuto, determinada por análisis – físico-químico, microbiológico y sensorial -, que fueron realizadas anteriormente y que definieron esa como la mejor relación tiempo-temperatura para el desarrollo de ese estudio, teniendo en cuenta la eficiencia del proceso, el mantenimiento de la calidad del producto y las condiciones de seguridad para realización del experimento.

3.2.1. Físico-Química

La Tabla 7 trae los análisis físico-químicos comparativos entre los datos obtenidos en los análisis hechos en el laboratorio de la Universidad Rovira i Virgili, los datos teórico proveídos por la empresa y los datos experimentales obtenidos después de aplicado el tratamiento térmico a las cervezas.

Tabla 7: Análisis comparativo de las características de las Cervezas analizadas

	Análítica Rosita	Rosita Teórico	Rosita PóS Tratamiento 80°C	Análítica WIPA	WIPA Teórico	WIPA PóS Tratamiento 80°C
pH	4,23	4,5	4,20	4,46	4,5	4,25
IBU	8,3	8	7,6	23,7	24	19,3
Color SRM^a	4,9	4,5	6,12	3,36	3,3	4,66
Color EBC^b	9,7	8,9	12,10	6,63	6,5	9,17
Alcohol	5,1%	5,5%	5,1%	4,6%	4,7%	4,6%
Oxígeno	0,21mg/L a 1001mbar a 24,5°C	Sin Información	0,21mg/L a 1001mbar a 24,5°C	0,18mg/L a 1001mbar a 24,5°C	Sin Información	0,18mg/L a 1001mbar a 24,5°C

Fuente 7: Propio Autor

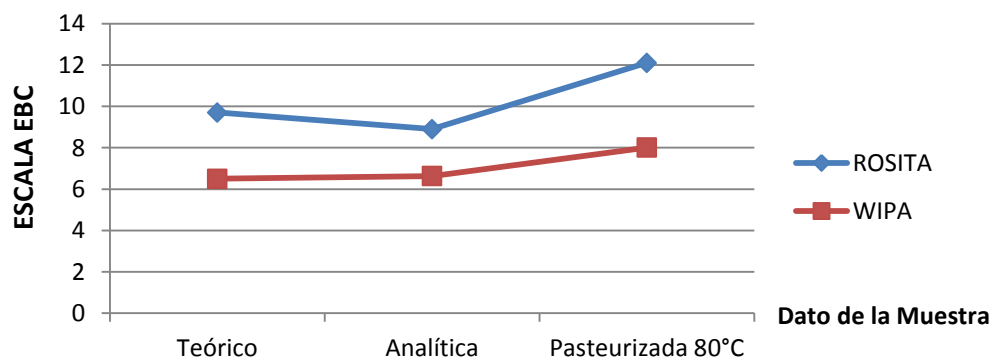
SRM^a1: Standard Reference Method

EBC^b 1: European Brewery Convention

No hubo cambios significativos en el pH así como se pudo ver en el color en las dos cervezas (Gráfica 1) y en los IBU (Gráfica 2). Al comparar IBU y color de las dos muestras de cerveza, es posible ver una misma tendencia - disminución

de IBU – mismo que poco expresivo en la Rosita -, y aumento del color -, después de realizarse la pasteurización. Eso ocurre porque, además de las melanoidinas, la malta también aporta polifenoles al mosto junto con la enzima peroxidasa que puede modificar el color del material fenólico durante el proceso. La extracción adicional de polifenoles derivados del lúpulo puede ocurrir durante la ebullición si el cervecero utiliza lúpulos en flor o pelletizados. La oxidación de estos polifenoles es un factor secundario en el color de la cerveza, lo que resulta en matices de color rojo-ámbar que se manifiestan en las cervezas de color más claro, particularmente durante el almacenamiento. (Russell, Inge; Bamforth, Charles W.; Stewart, 2009). Las altas temperaturas de pasteurización, mismo que aplicadas por tiempo reducido favorecen a la oxidación de polifenoles aumentando así el color y reduciendo los IBUs de las cervezas.

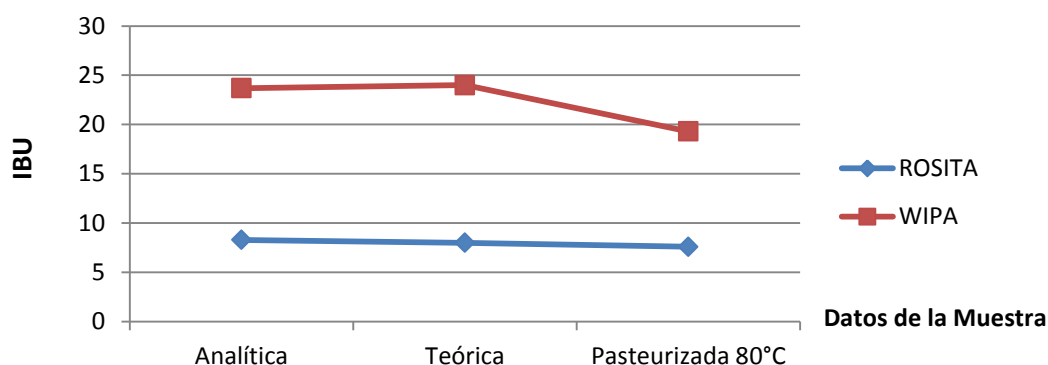
Gráfica 1: Datos Comparativos de Color en EBC



Fuente 6: El propio autor

La disminución poco expresiva de los IBU de la cerveza Rosita se explica por el hecho de ser una cerveza Pilsen, con bajo contenido de lúpulo, lo que conlleva a una menor cantidad de polifenoles presentes en el producto y consecuentemente menos oxidación de esos compuestos fenólicos.

Gráfica 2: Datos Comparativos de IBU



Fuente 7: El propio autor

A pesar de que el aumento de color pudo ser identificado visualmente en ambas cervezas, para ese estudio eso no fue uno de los parámetros considerados como factor limitante al tratamiento térmico.

3.2.1. Microbiológica

En la Tabla 8 se presentan los análisis microbiológico por filtración a vacío de la cerveza y los resultados obtenidos después de sometida al tratamiento térmico a la temperatura de 80°C a 1 minuto.

Tabla 8: Resultado del Análisis Microbiológico

Producto	Levadura cell/100mL		Bacteria cell/100MI	
	Sin Pasteurizar	80°C	Sin Pasteurizar	80°C
Rosita	63	0	108	0
WIPA	43	0	296	0

Fuente 8: El propio autor

Se puede ver por los datos, que la cerveza WIPA presenta una mayor cantidad de cell/mL de bacteria y una menor cantidad de cell/mL de levaduras que la cerveza Rosita Original. Sabiéndose que todas las cervezas pasan por el mismo proceso de elaboración y por los mismos equipos en la fábrica, se puede decir que las especies puedan justificar el aumento en el número de cell/mL de bacterias en el producto, eso porque las especies son muy

susceptibles a contaminación por microorganismos tanto deterioradores como algunos dañinos a la salud. Según algunos estudios, se ha reportado la presencia de géneros de microorganismos formadores de espora tales como *Clostridium* y *Bacillus*, además de no formadores de esporas como coliformes, los cuales son encontrados frecuentemente algunas especies (Iracheta, 1998). El trigo conlleva a un mayor periodo de maduración de la cerveza, para que sea menos turbia y más fácil de filtrar. Eso hace con que haya una mayor deposición de compuestos proteicos y de levaduras en el fondo del tanque lo que explicaría un menor número de cell/mL de levadura que en la cerveza Rosita Original.

Los resultados presentados demuestran que la pasteurización a 80°C/1 minuto es un tratamiento efectivo desde el punto de vista microbiológico una vez que inactivó los microorganismos presentes en la cerveza, garantizando la estabilidad microbiológica y consecuentemente un aumento del *shelf life* del producto.

3.3. Análisis Sensorial

Para el análisis sensorial se procedió a un Test Triangular de acuerdo con la metodología EBC 13.7 *Sensory Analysis: Triangle Test* (Anexo 6), para determinar si había diferencia entre las muestras. Según los niveles determinados de sensibilidad para la prueba, riesgo α ¹⁵ 10% y riesgo β ¹⁶ 10% y P_d ¹⁷ 40% (Ver Anexo 6), se determinaron un total de 25 panelistas (European Brewery Convention, 2017).

En el test el resultado que se obtuvo fueron, dos respuestas correctas para la WIPA y una respuesta correcta para la Rosita Original de un total de 25 tests realizados para cada cerveza (Gráfica 4). De acuerdo con la metodología EBC utilizada, eso indica que no se puede considerar que haya diferencia entre el blanco no pasteurizado y la muestra pasteurizada. Eso comprueba que el

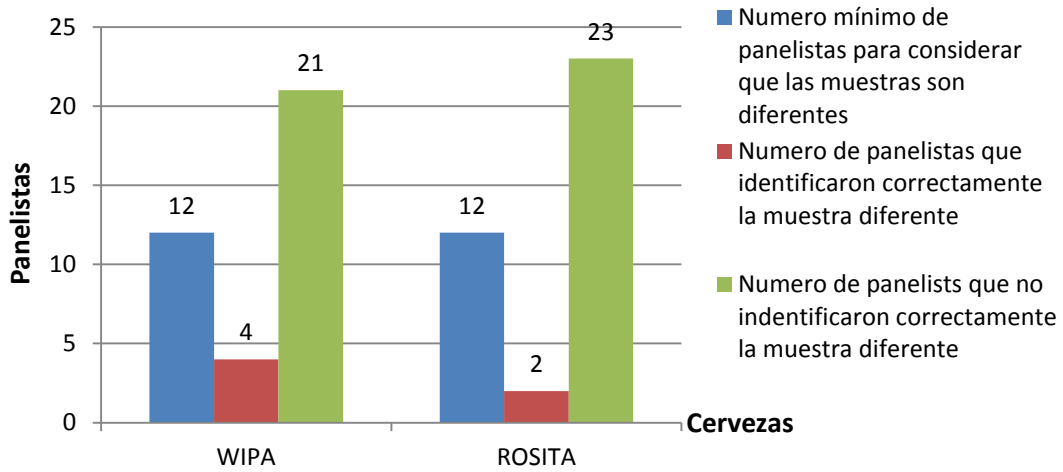
¹⁵ Riesgo α (alfa): el riesgo de concluir que existe una diferencia significativa cuando, en realidad, no existe. (También conocido como riesgo de "falso positivo" o error tipo I).

¹⁶ Riesgo β (beta): el riesgo de concluir que no existe una diferencia significativa cuando, en realidad, existe uno. (También conocido como riesgo de "falso negativo" o error de tipo II).

¹⁷ P_d : proporción permisible de discriminadores en la población, que pueden detectar la diferencia entre productos.

tratamiento térmico optimizado aplicado a la cerveza, 80°C/1 minuto, no provoca alteraciones significativas en el aroma y en el sabor de la cerveza.

Gráfica 3: Análisis de los resultados del Test Triangular



Fuente 9: El propio autor

4. Conclusiones

En el presente estudio, se buscó optimizar el tratamiento térmico aplicado a la cerveza para garantizar su estabilidad microbiológica, aumentando así su *shelf life* y manteniendo la calidad sensorial del producto y las conclusiones obtenidas son las siguientes.

La relación tiempo-temperatura de pasteurización elegida para el estudio – 80°C/1 minuto -, presentó resultados eficaces tanto para la estabilidad microbiológica como para la manutención de la calidad sensorial del producto. A través de análisis microbiológicos se comprobó la inactivación de los microorganismos después de la aplicación del tratamiento térmico y por medio del test triangular se demostró que no existe diferencia entre el blanco no sometido a tratamiento térmico y la muestra pasteurizada.

Por eso se recomienda la aplicación del tratamiento térmico para aumentar el *shelf life* y garantizar la calidad del producto final. La pasteurización se mostró eficaz en la estabilización de la cerveza lo que permitiría almacenar y transportar con seguridad el producto a otros países por vía marítima sin mayores problemas en relación a deterioro por exposición a temperaturas y a luz dentro del periodo establecido para su caducidad.

Se recomienda ampliar la investigación en todas las temperaturas indicadas en ese estudio, variando los tiempos del proceso y haciendo analíticas microbiológicas más detalladas para identificar las bacterias presentes en la cerveza pudiendo así, aplicar un tratamiento térmico más adecuado.

Basándose en los resultados obtenidos en ese estudio se puede definir el aumento real de *shelf life* haciendo análisis en el transcurso del tiempo de almacenaje para verificar la estabilidad y calidad del producto.

También se recomienda hacer un análisis microbiológico de las principales especias utilizadas para dar aroma y sabor a cervezas especiales y crear un método de esterilización de esas especias antes de añadirlas a la cerveza disminuyendo así la posibilidad de contaminación del producto.

5. Agradecimientos

El autor desea agradecer a Cervezas La Gardenia (Alcover, España) por proveer los equipos y la cerveza necesarios para el estudio. Al equipo de la microcervecera por la paciencia y ayuda en los experimentos.

A Laia y Santiago del Laboratorio de Microbiología por toda la ayuda en la realización de los experimentos.

ANEXOS

Anexo 1: Laboratory Membrane Filtration Technique

Abstract: A laboratory filtration technique for liquid samples which contain too few microorganisms for the detection by plating methods, i.e. less than 1 colony forming unit per ml.

Descriptors: for water, filtered beer, soft drinks, mambrane filtration, membrane filter, pore size

Scope: A laboratory filtration technique for liquid samples which contain too few microorganisms for the detection by plating methods, i.e. less than 1 colony forming unit per ml.

Application: The method is applicable to water, filtered beer and some soft drinks. The liquid must not contain particles that block the pores of the membrane.

Principle: The liquid is filtered under aseptic conditions through a membrane of defined pore size. The pore size is so small that the microorganisms are retained on the surface of the membrane. After filtration the membrane is ready for further manipulation, either direct microscopy or transfer to a culture medium for growth of colonies.

Equipment: Filter holder with funnel. The funnel may be made of stainless steel, glass, or plastic. In the case of plastic do not use flaming for sterilisation. The capacity should be 200 ml or more to make room for foam. The standard diameter of the filter holder is either 47 mm or 50 mm. Vacuum source. Vacuum may be produced by a water jet pump and the filtrate sucked directly to drain. If water pumps are not available an electric pump is used and the filtrate is collected in a vacuum flask. Sterile membrane filters. The standard diameter of membranes is either 47 mm or 50 mm corresponding to the filter holders. However, both sizes of membranes are applicable in both sizes of the holder. Unless another pore size is specified, 0.45 μm is used. A grid marked black or blue membrane surface is best for counting of colonies from beer. White is applicable for colonies from water.

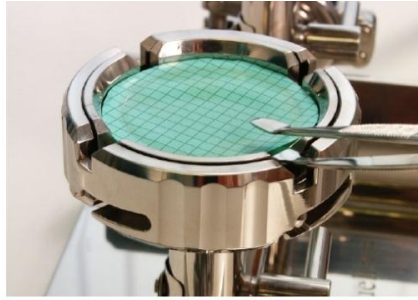
- Bunsen burner

- Ethanol (or methanol) 70 % v/v
- Forceps
- Sterile spatula

Procedure: Rinse the funnel and the support screen with ethanol. Switch on vacuum and suck dry. Then ignite. (Alternatively boil for 10 min. in water). Allow to cool then switch off vacuum and remove the funnel. Place a membrane filter with the grid side up on the support screen by use of a flamed forceps and replace the funnel (Figura 1). Aseptically pour 100 ml of sample into the funnel. In the case of beer pour gently to avoid too much foam. Do not use antifoaming agents as these have a tendency to concentrate on the membrane filter. Unless the filtration is carried out in a laminar flow cabinet, cover the funnel with a lid or a sterile Petri dish. Switch on vacuum and filter the entire sample. After filtration, with vacuum still applied, remove the funnel with a straight upward motion so that beer foam remains in the funnel. Switch off vacuum. Transfer the membrane with the flamed forceps to a growth medium (Figura 2). Rinse the funnel with tap water to remove foam. With vacuum switched on rinse the funnel and support screen with ethanol. The equipment is now ready to repeat the procedure starting with ignition, or it may be left unused.



Membrane Filtration Equipment, courtesy Schleicher & Schuell



Transfer of Membrane, courtesy Schleicher & Schuell

Note: Membrane filter analysis should not be confused with membrane filter sterilisation by vacuum. The technique is the same but in the analysis mentioned, the filtrate is discarded, whereas the membrane is discarded in the sterilisation procedure

Anexo 2: pH of Beer

Abstract: The determination of pH at 20 °C of decarbonated beer using a pH meter.

Refer to Section 0 (Safety) for relevant warning and safety precautions.

Scope: The determination of pH at 20 °C of decarbonated beer using a pH meter.

Field of Application: The method can be applied to all beers. Complete degassing of samples must be achieved.

Principle: The pH of beer is estimated using a pH meter and a suitable electrode system.

Reagents: Use the reagents as specified in EBC Method 1.5.

Apparatus:

Filter funnels.

Medium fast qualitative folded filter paper e.g. Schleicher and Schuell 597 1/2 or equivalent.

Conical flasks.

Water bath, attemperated to 20 ± 1 °C.

Further refer to EBC Method 1.5.

Procedure: Sample preparation: Remove excess carbon dioxide by shaking about 200 ml of beer in a 500 ml flask at a temperature of $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Shake gently at first and then vigorously, until gases no longer escape from the beer. During shaking the flask is kept closed by hand. Filter the beer through a dry folded filter paper in a funnel into a second conical flask. Repeat this shaking and filtering step to be sure that the beer is completely degassed.

Note: a single shaking and filtering is sometimes not sufficient to obtain a stable pH end-value. Furthermore, inadequate degassing will result in residual CO₂ contributing to an unstable pH reading. Double shaking and filtering is the best degassing procedure for measuring pH of degassed beer.

Analysis: Proceed according to the instructions given in EBC Method 1.5, clause 7.

Expression of Results:

Report the pH result to two decimal places at 20°C . pH has no units of measurement but is expressed at 20°C .

Precision values determined by IOB Analysis Committee in 1997 when 42 laboratories analysed 2 beers are given below as a guideline (a variety of different degassing techniques were used by the participants).

Range	r95	R95
3,94 to 4,42	0,025	0,133

Anexo 3: Colour of Beer: Spectrophotometric Method (IM)

Abstract: The determination of the colour of beer by spectrophotometry. Refer to Section 0 (Safety) for relevant warning and safety precautions.

Scope: The determination of the colour of beer by spectrophotometry.

Field of Application: The instrumental method is the official reference method and can be applied to all types of beers.

Principle: The absorbance of the beer is measured at a wavelength of exactly 430 nm in a 10 mm cell.

Procedure: Proceed according to the instructions given in EBC Method 8.5.

Precision: The precision values given below (EBC units) were obtained from the data of a collaborative trial carried out by the EBC Analysis Committee in 1998. Fourteen laboratories participated and analyzed beer samples at five levels.

Range	r95	R95
8to120	0,022m	0,085m

where m is the mean value.

Anexo 4: Bitterness of Beer (IM)

Abstract: The determination of the bitter substances in beer, which are mainly iso- α -acids.

Refer to Section 0 (Safety) of EBC Methods for relevant warning and safety precautions.

Scope: The determination of the bitter substances in beer, which are mainly iso- α -acids.

Field of Application: The method can be applied to all types of filtered beers. Turbid beers must be clarified by centrifugation. The results are only valid if the beer does not contain the following compounds: n heptyl-4-hydroxybenzoate, saccharin, salicylic acid, sorbic acid. These compounds are extracted by iso-octane and absorbed at 275 nm, but their presence can be detected because they change the shape of the absorption curve.

Principle: The bitter substances are extracted from acidified beer with iso-octane. After centrifugation, the absorbance of the iso-octane layer is measured at 275 nm, against a reference of pure iso-octane.

Reagents: Unless otherwise stated, use only reagents of recognised analytical grade and only water of at least grade 3 as defined in ISO 3696:1987 (E). Iso-octane (2,2,4-trimethyl pentane) for UV spectroscopy. The absorbance of this solvent must be below 0,010 when measured at 275 nm in a 10 mm cuvette against a reference of distilled water. Hydrochloric acid, c(HCl) \approx 6 M.

Apparatus:

UV spectrophotometer, with a slit width of less than 2 mm.

Silica cuvettes, 10 mm optical path length.

Centrifuge, operating speed 3000 rpm.

Rotary shaker, amplitude 2-3 cm.

Shaker, wrist action or platform type.

Glass balls.

Centrifuge tubes, 35 ml with screw thread necks and plastic caps for the tubes with polypropylene inserts to render them solvent tight.

Glass conical flasks, 50 ml and stoppers.

Pipettes, 0,5 ml, 10 ml and 20 ml or, alternatively, 0,5 ml and 20 ml volumetric dispensers.

Preparation of Samples: Degas all beer samples without loss of foam and temperate to approximately 20 °C before analysis. Gentle stirring with a magnetic stirrer on a low speed to avoid fobbing is recommended. The addition of degassing agents or degassing by filtration may result in a decrease in bitterness and is therefore not recommended. Plastic containers must not be used. Iso- α -acids adsorb onto glass. For every clean glass surface (new glass flasks and/or thoroughly cleaned glass flasks) in which iso- α -acids are exposed, there will be a drop in the measured bitterness. Therefore it is recommended to rinse thoroughly cleaned and/or new glassware first with an iso-octane beer extract before use.

Procedure: Pipette exactly 10 ml of degassed beer into a 35 ml centrifuge tube or a 50 ml conical flask. Add 0,5 ml of hydrochloric acid followed by 20 ml of isooctane. Place 2 to 3 glass balls in the centrifuge tube. Screw a cap with a polythene insert onto the centrifuge tube or stopper the flask and ensure a solvent tight seal. Shake the centrifuge tubes for 15 min at 20 ± 1 °C using the rotary shaker set at 130 ± 5 rpm or place the flasks on either a wrist action or platform shaker and shake at 20 ± 1 °C until maximum extraction has been achieved. The vigorousness and time of shaking must be established, initially, for each shaker by measuring the absorbance of the iso-octane layer at 275 nm at intervals during shaking until no further increase in absorbance is observed. Allow any emulsion to settle. To speed up the settling centrifuge the tubes for 3 min at 3000 rpm. Regular checks should be made to ensure that the shaking procedure achieves complete extraction of the bittering material. Measure the absorbance of the iso-octane layer in a 10 mm cuvette at 275 nm, using pure iso-octane in the reference cuvette, washed previously with part of the iso

octane layer. Record the sample absorbance within a few s. Temperature and speed of shaking (see 8.3) and wavelength (see 8.6) must be carefully observed because they have a significant effect on results according to the ruggedness testing. Absorbance measurements should be made within 20 min after centrifugation because further delay will affect the results.

Expression of Results

Calculation

Bitterness (BU) = 50 x A₂₇₅ where A₂₇₅ = the absorbance at 275 nm measured against a reference of pure iso-octane.

Report the results as BU values to the nearest whole number.

Anexo 5: Measurement of Dissolved Oxygen by Optical Sensors

Abstract: The determination of dissolved oxygen in liquor, wort and beer by optical oxygen sensors.

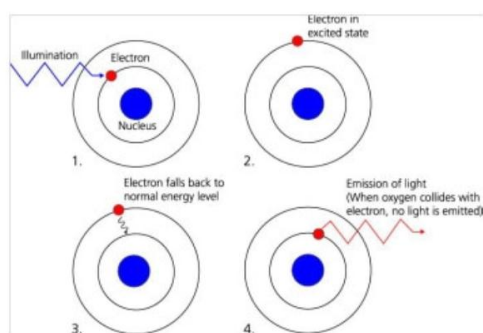
Descriptors: solubility of oxygen in water in equilibrium with air at 1,01325 bar and vapour pressure of water in equilibrium with air, solubility of oxygen Refer to Section 0 (Safety) for relevant warning and safety precautions.

Scope: The determination of dissolved oxygen in liquor, wort and beer by optical oxygen sensors.

Field of Application: This method can be used for the measurement of high levels of dissolved oxygen in wort (10 to 50 mg/litre) or for the detection of low levels of oxygen (10 to 1000 µg/litre) in beer or dilution liquor. Interference can be caused by compounds such as sulphur dioxide, hydrogen sulphide, chlorine and formaldehyde. The effects of these compounds vary with different sensors and no general rule can be given, except to be aware that interference can occur.

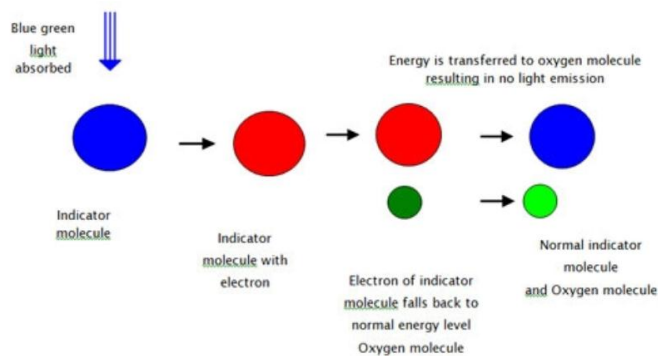
Principle: Optical sensors measurement principle: The basic technology, fluorescence, is the emission of light by a substance that has absorbed light or other electromagnetic radiation. It is a form of luminescence. In most cases, the

emitted light has a longer wavelength, and therefore lower energy, than the absorbed radiation. So, in contrast to the polarographic Clark method (electrochemical reaction), which detects a redox reaction of oxygen at the electrode, the optical method is based on an energy transfer between chromophore and oxygen. This technology does not consume oxygen at the sensor-sample interface; therefore, no stirring is required in slow or stagnant liquid. There are no consumables such as membranes or filling solutions with this method, unlike the amperometric method. Optical oxygen sensors measure the oxygen content based on the luminescence measurement principle, where an oxygen-sensitive luminescent layer is exposed to light with a suitable wavelength (green/blue light) and, as a result, molecules in the oxygen-sensitive layer are excited. When returning to the ground state, and in absence of oxygen, the luminescent layer emits light of a different, less energetic wavelength (red light). The emitted light is called luminescence.



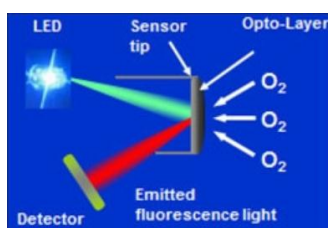
Luminescence in the absence of oxygen

If oxygen is present, oxygen (which is acting as a quencher) collides with the indicator molecule (luminophore) in its excited state (luminescent). Then energy is transferred from the excited indicator molecule to the oxygen molecule, which changes from its ground state to an excited state. As a result, the indicator molecule does not emit light anymore and the measurable light (luminescence) decreases. The collision between the indicator molecule (luminophore) in its excited state and the quencher (oxygen) results in what is called dynamic quenching.



Energy is transferred to oxygen molecule resulting in no light emission

Oxygen measurement: An oxygen sensor (sensor spot) is in contact with the medium of which the oxygen content is to be measured. Most sensors can measure in liquids and gases. The sensor spot is intensely illuminated by a light source for a short time. The frequency of this light flash may be changed to suit the conditions. Depending on the oxygen content in the medium the sensor spot will give a light signal. A photo detector measures this light signal and from it the oxygen content is calculated.



Set-up of an oxygen meter

Reagents: See instrument manual of optical oxygen sensor.

Apparatus: Dissolved oxygen meter with optical sensor. Dissolved oxygen measuring instruments (meters and sensors) are available from a number of commercial vendors. The instrument should fit for purpose (see Note 9.1).

Calibration: See instrument manual of optical oxygen sensor.

Procedure: Keep a log book to record zero and calibration checks, sensor performance and details of maintenance. These records will indicate the required frequency of such checks. In-line oxygen meters. In-line meters should not be situated in pipework where a change in diameter may cause a pressure reduction. As this can cause gas breakout, a consequence of this will be

unreliable readings. If the sensor can be observed through a sight glass, ensure that when readings are taken no gas bubbles are visible on the membrane. Ensure that all gas is dissolved in the line at the point where the inline meter will be installed. Portable oxygen meters: Throughout measurement, use equipment that avoids aeration, and operate equipment to mitigate losses or gains of dissolved gases. Use high-density plastic or other sample tubing that is relatively gas impermeable. Use transparent materials for the tubing and chamber to allow checking for bubbles. Air bubbles that adhere to the sides of the tubing and flow through chamber will add significant error to low-level dissolved oxygen measurements. See the instrument manual for further instructions how to measure dissolved oxygen. For further instructions; see instrument manual of optical oxygen sensor

Expression of Results: Reporting: The terms ppm and ppb are ambiguous and should not be used.

Wort: Report the oxygen concentration in mg/L to two decimal places or two significant figures as appropriate (e.g. 9.4; 0.21; 0.02 mg/L).
Beer: Report the Dissolved Oxygen in $\mu\text{g/L}$ to zero decimal places.

Precision: This has not yet been established. Errors in dissolved oxygen determinations will depend upon the characteristics of the sensor, how well it has been maintained, the time interval since calibration and whether correct sampling methodology has been used. At high oxygen levels an error in the calibration will have a greater effect than the zero error, whilst at low levels a zero error will have a greater affect than a calibration error.

Notes: It is important that the measuring range, accuracy and detection limit are in line with the product specifications. Some suppliers have range specific sensors, in that case mostly for the low range (e.g. beer) and for the high range (e.g. wort).

Anexo 6: Sensory Analysis: Triangle Test

Abstract: Use this test to determine either

- whether the samples are significantly different

- whether the samples are significantly similar

The method is the same for testing for difference and similarity, but the statistical parameters selected for the evaluation of results and the minimum number of assessors required are different. Typically you need more assessors to test for similarity than to test for difference.

Descriptors: score sheet, number of assessors needed for a triangle test, sample plan for a triangle test, number of assessments, risk of concluding that a significant difference exists when there is none, Maximum number of correct responses, number of panellists, significant difference Refer to Section 0 (Safety) for relevant warning and safety precautions.

Scope: Use this test to determine either whether the samples are significantly different whether the samples are significantly similar. The method is the same for testing for difference and similarity, but the statistical parameters selected for the evaluation of results and the minimum number of assessors required are different. Typically you need more assessors to test for similarity than to test for difference.

Field of Application: The method applies to any two samples of beer, wort, in-process samples, water or other brewery samples. The method is recommended when the nature of the difference between samples is unknown. It does not determine the size or direction of the difference. The attribute(s) responsible for the differences are not identified (3.2). The method also applies whether a difference may exist in a single attribute or in several. The method is applicable only when the products do not cause excessive sensory fatigue, carryover or adaptation. In these cases, use another test, for example the duo-trio test (3.4), taking into account that this test has a lower statistical power. The method can also be used to select, train and monitor assessors (3.3).

References: EBC Method 13.2 (Sensory Analysis: Test Room, Equipment, Conduct of Test (IM)). EBC Method 13.3 (Sensory Analysis: Sensory Analysis: Choice of Method (IM)). EBC Method 13.4 (Sensory Analysis: Selection and Training of Assessors (IM)). EBC Method 13.8 (Sensory Analysis: Duo Trio Test (IM)).

Principle: The assessors are presented with a set of 3 coded samples, 2 of which are identical. The assessor is asked to identify the sample that is different from the other 2. This is a forced choice method. If assessors cannot identify a

difference, they must make a guess. The number of correct responses are added up and compared to statistical tables of significance. For general test requirements such as test room, sample presentation, coding and assessors, refer to EBC Method 13.2.

Terminology Specific to this Method

α (alpha) risk – the risk of concluding that a significant difference exists when, in reality, there is not one. (Also known as risk of ‘false positive’ or type I error.)

β (beta) risk – the risk of concluding that no significant difference exists when, in reality, there is one. (Also known as risk of ‘false negative’ or type II error.)

p_c – the probability of a correct response.

P_d – allowable proportion of discriminators in the population, who can detect the difference between the products.

Sensitivity – a general term used to summarize the performance characteristics of the test. The sensitivity of the test is rigorously defined, in statistical terms, by the values selected for α , β and P_d . The following can be considered as general guidelines.

For α risk: a statistically significant result at:

10 to 5 % (0,10 to 0,05) indicates ‘slight’ evidence that a difference was Apparent.

5 to 1 % (0,05 to 0,01) indicates ‘moderate’ evidence that a difference was apparent.

1 to 0,1 % (0,01 to 0,001) indicates ‘strong’ evidence that a difference was apparent

Below 0,1 % (< 0,001) indicates ‘very strong’ evidence that a difference was apparent.

For β risk: the strength of the evidence that a difference was not apparent is assessed using the same criteria as above (substituting ‘was not apparent’ for ‘was apparent’).

For P_d (the maximum allowable proportion of discriminators) falls into three ranges P_d should be set based on the business situation with smaller values for more conservative situations.

$P_d < 25$ % represent small values

25 % < $P_d < 35$ % represent medium sized values

$P_d > 35\%$ represent large values.

Procedure: Clearly define the test objective: difference testing or similarity testing. (e.g. new process without changing flavour: similarity testing; nem formula, improve quality: difference testing). Determine the required level of sensitivity of the test. Acceptable values of α , β and P_d vary depending on the test objective and should be determined before the test is conducted (see examples in clause 8).

Use table 1 to determine the minimum number of assessors required, for the agreed level of sensitivity (parameters α , β and P_d)

All assessors must be familiar with the test.

All assessors should have the same level of training.

Choose assessors in accordance with test objectives. Trained tasters cannot be considered as representative of a consumer population.

Repeated evaluations by the same assessor are not recommended, especially for similarity testing, because results are less representative of the population and the risk of incorrect conclusion is greater. If a larger number of panellists is used, it is more likely that the whole spectrum of sensory sensitivity will be covered. Therefore, the risk of false positive or false negative results is smaller. However, in the case of a limited number of assessors it may be necessary to repeat the evaluation once to increase the power and reliability of the test. In this instance the evaluation should be repeated on a separate occasion, in order to enhance the independency of the evaluations.

In practice, the number of assessors is determined by the availability of assessors and by material conditions (e.g. amount of sample). The test can still be conducted, but the risk associated with a limited number of assessors should be considered.

Often 18 to 36 assessors are used when testing for a difference. For comparable sensitivity when testing for similarity, 42 to 78 assessors are needed.

Prepare equal numbers of the six possible combinations, ABB, BAA, AAB, BBA, ABA, BAB. Assign 2 random 3-digit codes per product and prepare a balanced and randomized sample plan as in the example (table 2). To avoid bias by assessors detecting patterns in the order of presentation use a different sample plan for different sessions or for different tests conducted in the same session.

Sample presentation. It is critical to the validity of the test that assessors cannot identify the samples from the way in which they are presented. Differences in temperature or way of pouring should be avoided. Prepare samples out of sight and in an identical manner. If the test should focus on flavour differences only, it is recommended to use dark or coloured glasses. Instruct assessors to examine sets in a specific order, e.g. always from left to right and indicate the "sample that is different", even if it is only a guess. Assessors are allowed to re-evaluate samples during the assessment of one set.

An example of a score sheet is shown in figure 1. It is not recommended to ask questions about preference, acceptance or degree of difference, because results on these questions could be biased. A comments section may be added to allow assessors to explain their choice.

Name _____ Date _____
 day/month/year

Product submitted to test _____

Instructions
 You are presented with 3 samples, 2 of which are the same, one is different.
 Evaluate the samples from left to right and indicate the sample that is different.
 You may re-taste the samples.
 If no difference is apparent, you must make a best guess.

Set of 3 samples

Comments

Example score sheet for the triangle test

Expression of Results (Analysis and Interpretation of Results)

When testing for a difference: Count the number of correct responses. Use table 2 to analyse the data. If the number of correct responses is greater than or equal to the number given in table 3 corresponding to the number of assessments (n) conclude that a significant difference exists between the samples, at a specified α risk.

When testing for similarity Count the number of correct responses. Use table 3 to analyse the data. If the number of correct responses is less than or equal to the number given in table 4 corresponding to the number of assessments (n),

the β risk level and the value of P_d chosen for the test, conclude that NO significant difference exists between the samples at a specified β risk.

Examples

Example of a difference test

Introduction

A brewery developed a new process to improve the flavour balance of a beer. Before an expensive and large scale consumer test is planned, to find out whether the new beer is preferred over the current beer, it should be proven that the new beer is different from the current beer. Marketing need a low risk in concluding that a difference exists when there is none (low α risk) to prevent spending money in a consumer test. At the same time Marketing want to minimise the risk of not finding an existing difference (low β risk). They would like to have at least 50 % of the population to detect a difference ($P_d = 50\%$).

Objective

The objective is to prove a difference in flavour between the current beer and the new beer in order to justify testing with consumers.

Number of assessors

The sensory analyst fixed both the α risk and β risk at 5 %, $P_d = 50\%$ (proportion of distinguishers). Table 1 now tells us to use at least 23 assessors. To completely balance the order of presentation of the samples 24 assessors will be invited to participate in this test.

Analysis and interpretation of results A total of 14 panellists out of 24 correctly identified the odd sample. Table 3 indicates that a minimum of 13 correct responses is needed to conclude that at a level of confidence of 95 % (α risk = 5 %) a significant difference in flavour exists. So, in this case, it was concluded that a significant difference was proven at a level of confidence of 95 % and a market test was justified.

Example of a similarity test

Introduction

A brewer wants to confirm that the substitution of a new malt variety does not affect the flavour of a beer. The brewer realises that it is impossible to prove that 2 products are identical, but he wants to be very sure that only a reasonably small proportion of the population will be able to detect a difference, if one exists. On the other hand, the brewer is not greatly concerned if he

incorrectly concludes that products are different when they are not because the current malt produces beer which is acceptable and the new malt is only being considered because it is easier for the maltster to process.

Objective

To determine if beer with the new malt has the same flavour as the current beer.

Number of assessors

The sensory analyst fixed the β risk at 5 % and Pd at 30 % (proportion of discriminators). An α risk of 10 % is judged acceptable. Table 1 tells us to use at least 54 assessors.

Analysis and interpretation of results

A total of 20 panellists out of 54 correctly identified the odd sample. Table 4 indicates that a maximum of 22 correct responses is required to conclude that samples can be considered similar at a level of confidence of 95 % (β risk = 5 %). So, in this case, it was concluded that the new malt could be used as an alternative for the current malt.

Table 1: Number of assessors needed for a triangle test.

Note: Entries are the minimum number of assessors required to execute a triangle test with a pre-specified level of sensitivity determined by the values of Pd, α and β . Enter the table in the section corresponding to the chosen value of Pd and the column corresponding to the chosen value of β . Read the number of assessors from the row corresponding to the chosen value of α .

		0,2	0,1	0,05	0,01	0,001
0,2	$P_d = 50\%$	7	12	16	25	36
0,1		12	15	20	30	43
0,05		16	20	23	35	48
0,01		25	30	35	47	62
0,001		36	43	48	62	81
0,2	$P_d = 40\%$	12	17	25	36	55
0,1		17	25	30	46	67
0,05		23	30	40	57	79
0,01		35	47	56	76	102
0,001		55	68	76	102	130
0,2	$P_d = 30\%$	20	28	39	64	97
0,1		30	43	54	81	119
0,05		40	53	66	98	136
0,01		62	82	97	131	181
0,001		93	120	138	181	233
0,2	$P_d = 20\%$	39	64	86	140	212
0,1		62	89	119	178	260
0,05		87	117	147	213	305
0,01		136	176	211	292	397
0,001		207	257	302	396	513
0,2	$P_d = 10\%$	149	238	325	539	819
0,1		240	348	457	683	1011
0,05		325	447	572	828	1181
0,01		525	680	824	1132	1539
0,001		803	996	1165	1530	1992

Number of assessor need for a triangle test

Table 2: Example of a sample plan for a triangle test.

Sample	Code
A	365
	981
B	141
	239

Sample plan:

AAB	365	981	141
BAA	239	365	981
ABA	365	141	981
BAB	239	981	141
BBA	141	239	365
ABB	981	141	239

Table 3: Minimum number of correct responses required for samples to be considered significantly different at the stated α -level (adapted from: Meilgaard, M., Civille, G.V. and Carr, B.T., Sensory Evaluation Techniques, 4th edition, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 2007, p. 433). n: number of assessments (panellists or replicates*panellists); α risk: risk of concluding that a significant difference exists when there is none.

assessments n	significance level of α				
	0,20	0,10	0,05	0,01	0,001
18	9	10	10	12	13
19	9	10	11	12	14
20	9	10	11	13	14
21	10	11	12	13	15
22	10	11	12	14	15
23	11	12	12	14	16
24	11	12	13	15	16
25	11	12	13	15	17
26	12	13	14	15	17
27	12	13	14	16	18
28	12	14	15	16	18
29	13	14	15	17	19
30	13	14	15	17	19
31	14	15	16	18	20
32	14	15	16	18	20
33	14	15	17	18	21
34	15	16	17	19	21
35	15	16	17	19	22
36	15	17	18	20	22
48	20	21	22	25	27
54	22	23	25	27	30
60	24	26	27	30	33
66	26	28	29	32	35
72	28	30	32	34	38
78	30	32	34	37	40
84	33	35	36	39	43
90	35	37	38	42	45
96	37	39	41	44	48
102	39	41	43	46	50

For values not in table 3, calculate approximate values according to the formula below or refer to more complete tables as in bibliography 9.2 or 9.4. Minimum number of correct responses (x): $x = (n/3) + z \sqrt{(2n/9)}$, where $z = 0,84$ for $\alpha = 0,20$; $1,28$ for $\alpha = 0,10$; $1,64$ for $\alpha = 0,05$; $2,33$ for $\alpha = 0,01$; $3,09$ for $\alpha = 0,001$.

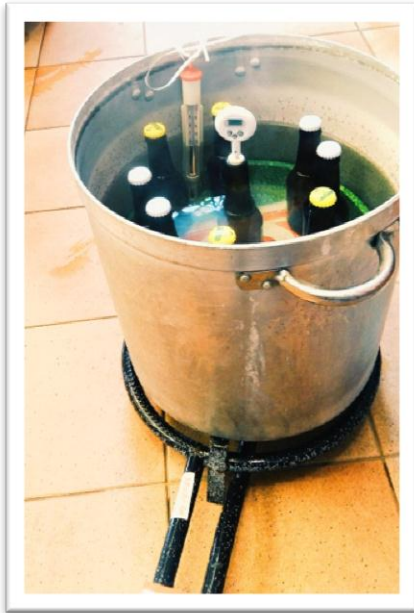
Table 4: Maximum number of correct responses not to be exceeded for samples to be considered similar (adapted from: Sensory analysis – Specific methods – Triangle test, AS 2542.2.2-2005). n: number of panellists; β : probability of in concluding that no significant difference exists when there is one; P_d : allowable proportion of discriminators in the population, who can detected the difference between the products. For values of n not in table table 4, calculate the $100(1-\beta)$ confidence limit for P_d * according to the formula below (or refer to more complete tables as in 9.5): $[1,5(x/n) - 0,5] + 1,5 z\beta \sqrt{[(nx - x^2)/n^3]}$, where x = number of correct responses n = number of panelists $z\beta = 0,84$ for $\beta = 0,20$; $1,28$ for $\beta = 0,10$; $1,65$ for $\beta = 0,05$; $2,33$ for $\beta = 0,01$; $3,09$ for $\beta = 0,001$. If the calculated value is less than the selected limit for P_d , then declare the samples similar at the β level of significance.

*Note: from a statistical point of view this formula calculates the upper confidence limit for the calculated proportion of discriminators in the test, not the upper limit for Pd as stated.

n	β	P _d					n	β	P _d				
		10%	20%	30%	40%	50%			10%	20%	30%	40%	50%
48	0,001	8	11	14	17	21	84	0,001	19	24	30	35	41
	0,01	11	13	17	20	23		0,01	22	28	33	39	45
	0,05	13	16	19	22	26		0,05	25	31	36	42	48
	0,10	14	17	20	23	27		0,10	27	32	38	44	49
	0,20	15	18	22	25	28		0,20	29	34	40	46	51
54	0,001	10	13	17	20	24	90	0,001	21	27	32	38	45
	0,01	12	16	19	23	27		0,01	24	30	36	42	48
	0,05	15	18	22	25	29		0,05	27	33	39	45	52
	0,10	16	20	23	27	31		0,10	29	35	41	47	53
	0,20	18	21	25	28	32		0,20	31	37	43	49	55
60	0,001	12	15	19	23	27	96	0,001	23	29	35	42	48
	0,01	14	18	22	26	30		0,01	26	33	39	45	52
	0,05	17	21	25	29	33		0,05	30	36	42	49	55
	0,10	18	22	26	30	34		0,10	31	38	44	50	57
	0,20	20	24	28	32	36		0,20	33	40	46	53	59
66	0,001	14	18	22	26	31	102	0,001	25	31	38	45	52
	0,01	16	20	25	29	34		0,01	28	35	42	49	56
	0,05	19	23	28	32	37		0,05	32	38	45	52	59
	0,10	20	25	29	33	38		0,10	33	40	47	54	61
	0,20	22	26	31	35	40		0,20	36	42	49	56	63
72	0,001	15	20	24	29	34	108	0,001	27	34	41	48	55
	0,01	18	23	28	32	38		0,01	31	37	45	52	59
	0,05	21	26	30	35	40		0,05	34	41	48	55	63
	0,10	22	27	32	37	42		0,10	36	43	50	57	65
	0,20	24	29	34	39	44		0,20	38	45	52	60	67
78	0,001	17	22	27	32	38							
	0,01	20	25	30	36	41							
	0,05	23	28	33	39	44							
	0,10	25	30	35	40	46							
	0,20	27	32	37	42	48							

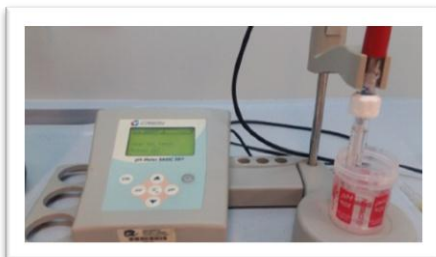
FIGURAS

Figura 1: Sistema de pasteurización



Fuente 10: Propio Autor

Figura 2: Medidor de pH



Fuente 11: Propio Autor

Figura 3 : Espectrofotometro



Fuente 12: Propio Autor

Figura 4: Oxímetro



Fuente 13: Propio Autor

Figura 5: Agitador Magnético



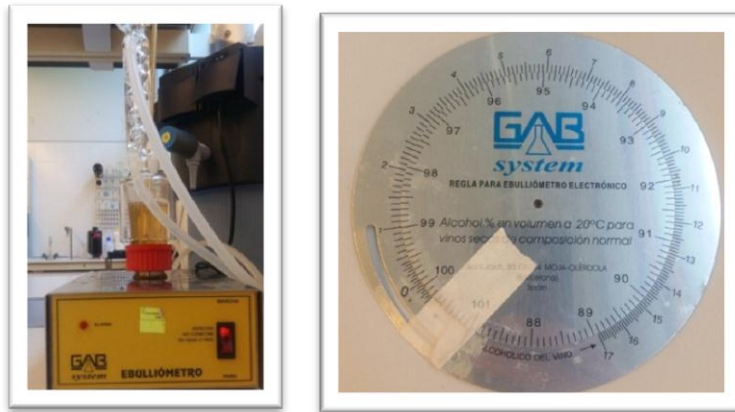
Fuente 14: Propio Autor

Figura 6: Filtración a Vacío



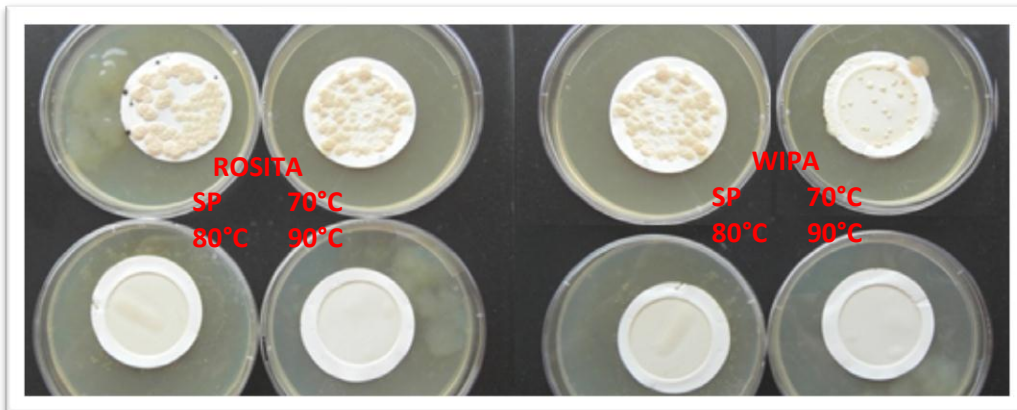
Fuente 15: Propio autor

Figura 7: Ebulómetro



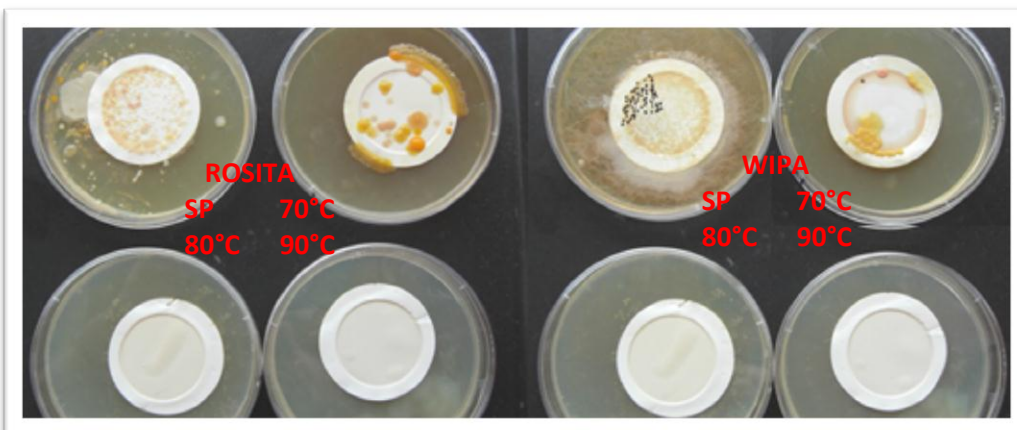
Fuente 16: Propio autor

Figura 8: Análisis Microbiológica Rosita y Wipa - LEVADURAS



Fuente 17: Propio autor

Figura 9: Análisis Microbiológica Rosita y Wipa - BACTERIAS



Fuente 18: Propio autor

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AETCM. (n.d.). Asociación Española de Técnicos de Cerveza y Malta. Retrieved July 17, 2018, from <https://aetcm.es/laboratorio-de-analisis/>
- Bamforth, C. W. (Ed.). (2006). *Brewing: New Technologies*. Woodhead Publishing Limited.
- Boulton, C. Quain, D. (2006). *Brewing Yeast and Fermentation*. <https://doi.org/10.1002/0471684228.egp13486>
- Catalunya, G. de. (2018). Institut Català de la Vinya i el Vi.
- Dennis E. Briggs, Chris A. Boulton, P. A. B. and R. S. (2004). *Brewing Science and Practice*.
- European Brewery Convention. (2017). Analytica European Brewery Convention. In *Analytica European Brewery Convention* (p. <http://www.analytica-com/>). European Brewery Convention. Retrieved from <http://www.analytica-ebc.com/>
- Goff, D. (1968). Thermal destruction of microorganisms. *Desinfection, Sterilization and Preservation*, 63–105.
- Iracheta, F. (1998). Calidad microbiológica de 5 especies que se expenden en el area metropolitana de Monterrey, N.L., 60.
- Milani, E. A., Gardner, R. C., & Silva, F. V. M. (2015). Thermal resistance of *Saccharomyces* yeast ascospores in beers. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 75–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.002>
- Milani, E. A., & Silva, F. V. M. (2017). Ultrasound assisted thermal pasteurization of beers with different alcohol levels: Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* ascospores. *Journal of Food Engineering*, 198, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.11.015>
- Patiño, L. A., & Velásquez, H. E. O. (2001). Estudio numérico de la transferencia de calor en la cerveza en el proceso de pasteurización. *Revista Ciencia e Ingeniería*2, 22(3).
- Priest, Fergus G.; Campbell, I. (2003). *Brewing Microbiology*. (I. Priest, F. G.; Campbell, Ed.) (3rd ed.). New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9250-5>
- Russell, Inge; Bamforth, Charles W.; Stewart, G. G. (2009). *Beer: A Quality Perspective*. (C. Bamforth, Ed.). Burlington, MA: Academic.
- Varnam A. H.; Sutherland, Jane P.; Dalmau, J. M. (1996). *Bebidas: Tecnología, química y microbiología*. Acribia. Zufall, C., & Wackerbauer, K. (2000). The biological impact of flash pasteurization over a wide temperature interval. *Journal of the Institute of Brewing*, 106(3), 163–168.