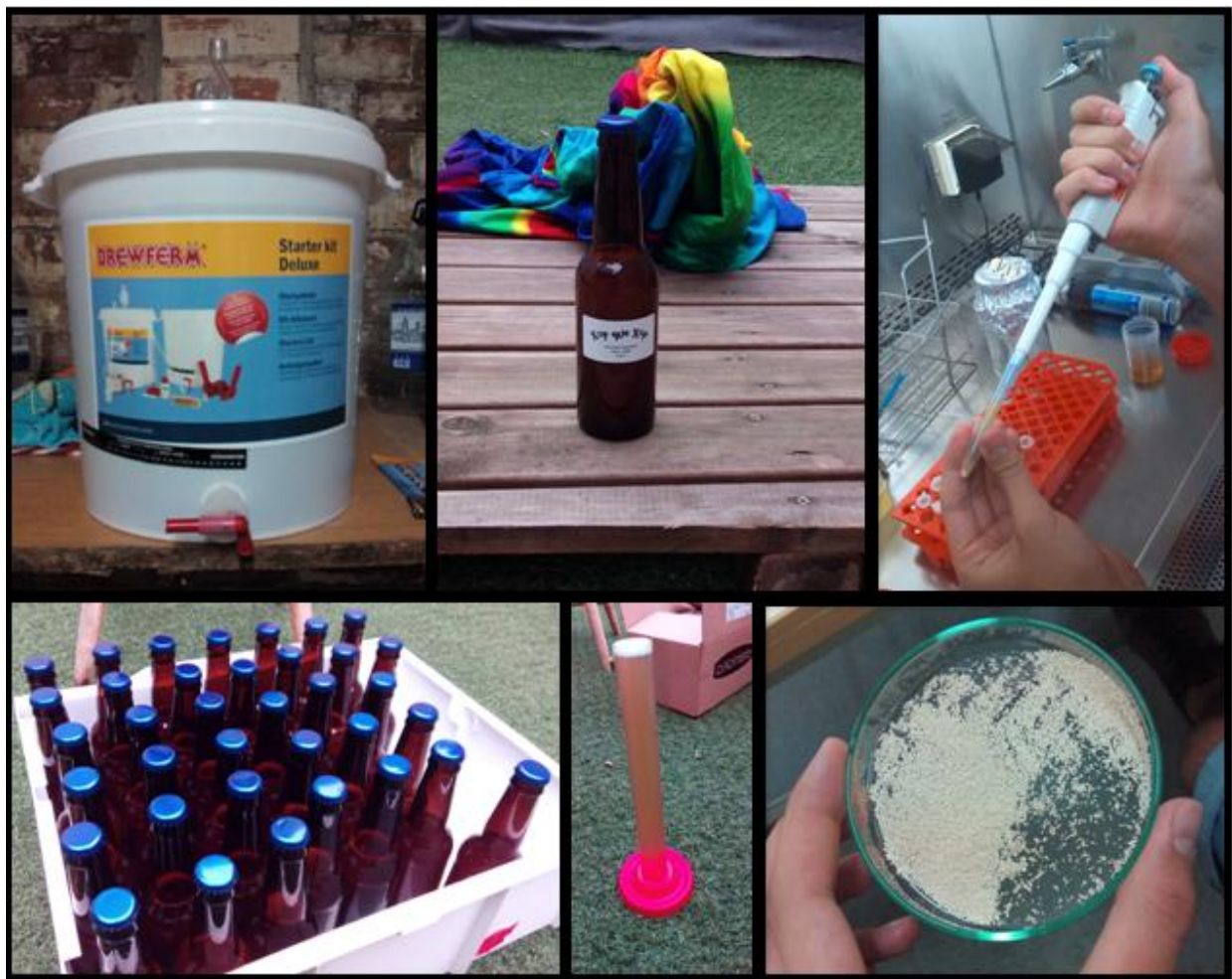


ELS LLEVATS, ELS ARTESANS DE LA CERVESA



Índex

1.Introducció	5
2.Justificació de l'elecció del tema	7
3.Objectius del treball	8
4.Preguntes d'investigació	9
5.Hipòtesi.....	10
6.Metodologia	11
7.Marc teòric.....	15
7.1.Un cop d'ull al passat de la cervesa	15
7.1.1.Edat Antiga	15
7.1.2.La cervesa a l'Europa Medieval	18
7.1.3.La Revolució Industrial	20
7.1.4.L'actualitat.....	21
7.2.Què necessitem per elaborar-la?	22
7.2.1.L'aigua	22
7.2.2.La malta	23
7.2.3.El llevat	26
7.2.4.Llúpul	28
7.2.5.Additius aromàtics	29
7.3.Tipus de cervesa	30
7.3.1.Fermentació espontània	30
7.3.2.Alta fermentació.....	31
7.3.3.Baixa Fermentació	34
7.4.El procés d'elaboració de la cervesa.....	36
7.4.1.Maltejat	36
7.4.2.Mòlta	38
7.4.3.Macerat.....	38
7.4.4.Filtratge.....	40

7.4.5.Ebullició	41
7.4.6.Clarificació	42
7.4.7.Refrigeració del most.....	43
7.4.8.Oxigenació.....	43
7.4.9.Fermentació.....	43
7.4.10.Filtratge final i embotellament.....	45
7.5.Saccharomyces Cerevisiae	47
7.5.1.Nutrició	47
7.5.3.Fermentació alcohòlica.....	48
7.6.Tècniques de determinació de concentracions	58
7.6.1.Tècniques experimentals.....	58
7.6.2.Espectrofotometria.....	58
7.6.3.Llei de Lambert-Beer	60
8.Part experimental.....	63
8.1.Protocol i disseny experimental.....	63
8.1.1.Introducció	63
8.1.2.Experiment 1.....	64
8.1.3.Experiment 2.....	80
8.2. Resultats i interpretació dels resultats.....	86
8.2.1.Resultats.....	86
8.2.2.L'equilibri a les reaccions químiques	95
8.2.3.Interpretació dels resultats.....	98
8.3.Elaboració de cervesa artesanal	105
9.Conclusions	112
10.Propostes per futurs treballs	118
11.Bibliografia	119
11.1 Informació de la xarxa	119

11.2.Fonts complementaries	120
11.3.Bibliografia d'imatges:	121
12.Agraïments	124

1.Introducció

Habitualment s'associa la cervesa amb un producte que elaboren algunes empreses per tal de satisfer les nostres necessitats lúdiques. Efectivament, és una beguda molt popular i l'acostumem a relacionar amb la diversió, però és erroni considerar-la només una beguda com qualsevol altra i ignorar tot el món que amaga al darrere.

El nostre treball de recerca pretén demostrar que, a diferència del que creu bona part de la societat, la cervesa no és un simple refresc sinó una beguda molt peculiar i d'una alta complexitat. Aquesta té un rerefons històric que es remunta als inicis de la civilització. Els antics sumeris, per exemple, la utilitzaven per conservar l'aigua en bones condicions higièniques. A més, a diferència dels beuratges que es troben al supermercat, al llarg de les darreres dècades, la cervesa ha esdevingut tota una cultura. Nombrosos països com ara Alemanya, Gran Bretanya o els Estats Units tenen costums i tradicions vinculats a aquesta beguda, com ara el famós Oktoberfest alemany o la gran indústria cervesera americana. I no tan sols trobem exemples en àmbits industrials, la seva cultura ha arribat també als petits productors que elaboren cerveses artesanalment. Aquestes pràctiques generen una diversitat que enriqueix enormement el producte.

Una altra idea que volem desenvolupar i difondre en aquest treball és el fet d'entendre i estudiar la cervesa des d'una perspectiva científica. Per això, hem decidit analitzar-la des d'un punt de vista bioquímic. A mesura que s'aprofundeix en la matèria es pot observar que les seves propietats són el resultat d'un seguit de petites reaccions bioquímiques. Els productors de cervesa experimenten amb aquestes reaccions per tal de proporcionar al seu producte característiques que el distingeixin de les altres marques. Ara bé, per poder manipular aquestes reaccions cal conèixer-les a fons, i això mai no hagués estat possible si no s'haguessin estudiat científicament. Per exemple, si no s'hagués analitzat la fase de fermentació amb un enfocament científic, mai no s'hauria entès el perquè del procés i mai no s'haurien trobat quins factors la poden controlar i optimitzar.

Per iniciar aquest projecte és necessari començar fent una ullada a la història de la cervesa per tal d'entrar en context i familiaritzar-se amb els aspectes relatius al bagatge cultural d'aquesta beguda; la qual cosa és molt important per introduir-se en el seu món. A continuació, s'ha realitzat un estudi dels ingredients necessaris per elaborar-la, dels diferents tipus que hi ha i també del conjunt de processos que succeeixen durant la seva elaboració, per tal d'entendre què és aquesta beguda i en què consisteixen les seves propietats. Un cop assolits tots aquests coneixements, es fa evident que la fermentació és un dels passos crucials a l'hora d'obtenir cervesa i que a més, és un dels processos més interessants científicament parlant, ja que és la fase on es produeixen l'alcohol i el CO_2 a partir dels sucres del most. És per això que s'ha aprofundit especialment en aquest procés. Primer de tot s'ha analitzat el *Saccharomyces Cerevisiae*, el microorganisme que protagonitza la fermentació, i posteriorment, s'ha procedit a l'estudi del conjunt de reaccions bioquímiques que fan possible l'obtenció dels productes esmentats anteriorment. D'aquesta manera, s'arriba a la part experimental d'aquest treball de recerca, en la qual es determinaran quines condicions afavoreixen que el *Saccharomyces Cerevisiae* metabolitzi la glucosa més ràpidament, per tal d'obtenir etanol i CO_2 en un període de temps més curt i així optimitzar el procés de fermentació.

2. Justificació de l'elecció del tema

La nostra fascinació per la cervesa va néixer arran d'un viatge a un dels països on la cultura cervesera està més desenvolupada, els Estats Units d'Amèrica. Durant la visita vam conèixer algunes de les cerveseries de més èxit de la costa Est, com ara *Harpoon* i *Samuel Adams*. Tanmateix, allò que ens va impactar més va ser l'oportunitat d'observar i eventualment experimentar en primera persona el procés d'elaboració artesanal de la beguda. A més, també vam quedar meravellats per la importància que té actualment en la indústria americana la innovació en els tipus de cervesa. Constantment s'estan creant noves cerveses amb una infinitat d'aromes i propietats diferents. Aquí a Catalunya, la cervesa segueix la línia més tradicional i és per això que en arribar allà vam quedar enlluernats per la manera com l'entenen i la viuen.

Però el viatge no va ser l'únic motiu que ens va portar a aquesta elecció. Un fet que considerem molt important és escollir un tema amb el qual ens sentim còmodes i ens agradi, ja que a un treball de recerca se li han de dedicar moltes hores i el resultat sempre és millor si tens un tema que et motiva i et fa treballar de gust. A més, tenim un conegut que treballa a l'empresa Moritz i mitjançant aquest contacte hem tingut un altre accés a tot aquest món.

Finalment, el nostre interès per la cervesa ens va portar a voler investigar-la i conèixer-ho tot sobre ella. Volíem anar més enllà i fer un estudi exhaustiu i científic sobre els processos relacionats amb aquesta beguda, i és per això que vam centrar-nos en el procés més important de tots, la fermentació.

3.Objectius del treball

- Estudiar el rerefons històric i cultural de la cervesa.
- Conèixer els ingredients i els procediments necessaris per elaborar la cervesa, així com ser capaços d'establir les diferències entre l'elaboració industrial i artesanal d'aquesta beguda.
- Conèixer els diferents tipus de cervesa existents i les seves peculiaritats.
- Estudiar el *Saccharomyces cerevisiae*, el seu metabolisme i les reaccions bioquímiques implicades en la fermentació alcohòlica.
- Visitar la fàbrica de la famosa marca barcelonina Moritz per tal de comprendre com es viu l'elaboració de la cervesa en l'àmbit professional i per tal d'ampliar els nostres coneixements sobre aquest procés.
- Entendre el funcionament de la maquinària moderna de laboratori i les tècniques que usarem a la part experimental.
- Determinar la influència de la temperatura i el pH en la velocitat de fermentació.
- Estudiar com varia el creixement del *Saccharomyces cerevisiae* en funció de les condicions a les quals és sotmès.
- Elaborar cervesa utilitzant els coneixements adquirits.

4.Preguntes d'investigació

Una reacció química és un procés en el qual una o més substàncies o reactius canvien les seves propietats a causa de la recombinació dels àtoms que les formen donant lloc a uns productes. Factors com ara la velocitat o el rendiment d'aquestes reaccions poden ser influenciats per les condicions en què es troben els reactius.

L'objecte del nostre treball és el *Saccharomyces cerevisiae*, el llevat responsable de la fermentació alcohòlica de la cervesa que farem (tipus Ale). Com bé sabem, la fermentació és una reacció química, i per tant, podem alterar-ne el resultat modificant-ne les condicions. D'aquesta manera arribem a les nostres preguntes d'investigació.

- Sota quines condicions de pH i temperatura la velocitat de fermentació de la cervesa és més elevada?

- Com varia el creixement del llevat a mida que avança la fermentació en funció de les condicions esmentades anteriorment?

- Les condicions que afavoreixen una fermentació més veloç impliquen una fermentació òptima per a la fabricació de cervesa?

5.Hipòtesi

Basant-nos en les condicions més àmpliament utilitzades a l'hora d'elaborar cervesa i en el nostre propi criteri, creiem que la velocitat de fermentació serà òptima a una temperatura d'uns 20°C i a un pH al voltant de 9. Els 20°C és una bona temperatura per a gairebé tots els organismes vius, ja que no es prou baixa per impedir la seva activitat metabòlica i tampoc es prou alta per matar-los ni danyar les seves estructures. Per altra banda, començar amb un pH lleugerament bàsic com ara el 9 també podria ser adequat, ja que durant la fermentació el pH s'acidificarà.

Pel que fa a la segona pregunta, creiem que el llevat creixerà i es reproduirà més ràpid com més còmode es trobi en el medi al qual el sotmetem. Dit amb altres paraules, si al final del treball es troba que en les condicions esmentades anteriorment, el llevat ha fermentat els substrats molt més ràpidament que en les altres condicions que analitzarem, voldrà dir que són unes bones condicions per al llevat i que, per tant, també permetran que creixi més de pressa.

Fent referència a l'última pregunta, creiem que una fermentació més veloç sí que és una fermentació òptima, perquè al cap i a la fi, la fermentació és una reacció química i la velocitat en què es creen els productes no hauria d'afectar a la seva qualitat.

6. Metodologia

Abans de començar la realització del treball, la nostra idea era estudiar la cervesa des de moltes perspectives per tal de poder comprendre la seva importància en la història humana. Al mateix temps, també preteníem analitzar al detall el seu procés d'elaboració i totes les seves peculiaritats posant un especial èmfasi en la part bioquímica. Tanmateix, ràpidament ens adonàrem que un objectiu tan ambiciós seria totalment irrealitzable dins dels terminis establerts pel lliurament d'aquest document. Per aquesta raó, va ser necessari delimitar l'objecte d'estudi perquè els objectius fossin assolibles en el temps del qual disposàvem. Després de llargues estones de deliberació vam aconseguir aclarir la situació i el resultat a què vam arribar, encara que satisfactori, va ser inesperat; decidírem centrar-nos de manera específica en un apartat de l'elaboració: la fermentació. Tot i això, per a nosaltres era inconcebible estudiar quelcom amb una vessant social i històrica tan gran com la cervesa sense fer-ne menció, així que vam incloure dins del treball el context històric i social.

Durant la fase primerenca del projecte vam consultar un gran nombre de fonts d'informació, i no només això, sinó que també vam tenir l'oportunitat única de realitzar una visita guiada a la fàbrica Moritz que hi ha a Barcelona. Aquest fet ens va proporcionar unes sòlides bases que, en fases més avançades del projecte, ens van resultar molt útils per d'endinsar-nos en aspectes més tècnics.

El procés durant el qual vam adquirir el bagatge anteriorment esmentat, no va ser de cap de les maneres un camí de roses, ja que ens vam haver d'enfrontar a innumbrables problemes com ara el de les fonts d'informació. Vam trobar-nos que n'existien nombroses de respectables, però que entraven en contradicció les unes amb les altres. Aquest fet ens va portar de bòlit fins que, per fortuna, arribàrem a la solució: totes eren correctes. L'elaboració de la cervesa, com la de qualsevol altre aliment, és un art i, per tant, subjectiva. Efectivament, les maneres de *crear* cervesa són tantes com artesans existeixen i no es pot afirmar que una en concret sigui l'única vàlida. Aquesta realitat s'ha de tenir molt present quan s'estudien productes amb un marcat caire artesanal i la mencionem perquè podria ser d'utilitat per a futurs estudiants que durant la investigació es trobin en la mateixa situació. Igualment, també va ser una

dificultat – i potser la més significativa- el tipus de fonts a què vam tenir accés. Per una banda, molts dels llibres que trobàvem eren d'oci, de cultura general de la cervesa... i oferien un tipus d'informació de poca utilitat per a un treball de recerca. Per contra, altres llibres que consultàvem eren edicions i estudis científics d'una alta especialització i evidentment, d'un nivell de coneixement científic molt superior al nostre. Davant d'aquesta situació, no ens va quedar altre remei que informar-nos al màxim i demanar ajuda en cas que fos necessari per aconseguir entendre-ho tot i poder-ho explicar amb claredat.

Tot iniciant el treball i buscant informació general sobre el procés d'elaboració de la cervesa, ens va sobtar l'especial èmfasi posat en l'acurat control de la temperatura i el pH durant la fermentació. Aquesta curiositat va anar en augment quan vam descobrir que els organismes responsables de la fermentació, el llevats *Saccharomyces Cerevisiae*, eren capaços de viure en un marge molt ampli de pHs i temperatures. Per aquest motiu, aquesta vegada la decisió va ser unànime, vam decidir estudiar la influència de la temperatura i el pH en la fermentació.

En el moment en què vam consensuar les preguntes d'investigació, ens vam adonar que havíem de detallar més la nostra investigació, ja que el nombre de maneres en què els paràmetres esmentats poden influenciar la fermentació és desmesuradament gran. Aleshores, vam pensar que si la fermentació era una successió de reaccions dutes a terme per enzims, un factor altament influenciat pel pH i la temperatura era la velocitat de la reacció, i d'aquesta manera, vam decidir estudiar aquesta velocitat. El següent que vam considerar va ser si era factible realitzar els experiments amb cervesa de veritat en fase de fermentació. Després de realitzar uns càlculs de temps i de recursos, vam concloure que no disposàvem ni de l'equipament ni del temps necessaris per fer-ho. No obstant això, no ens vam aturar pas i, com molts altres cops s'ha realitzat a la ciència, vam decidir crear un model, és a dir, una representació més simple d'allò que volíem estudiar. Així doncs, per investigar la fermentació a la cervesa vam fer servir un medi de glucosa on hi era present el *Saccharomyces cerevisiae*, un dels llevats que més s'usen en la producció de cervesa.

A partir d'aquesta pregunta en vam elaborar dos més que n'estaven relacionades. La primera d'aquestes era com afecta les condicions de pH i temperatura al creixement del llevat i la segona, si les condicions en què la fermentació és més ràpida són les òptimes per l'elaboració de cervesa.

Recapitulant, el nostre primer objectiu era determinar com afecten la temperatura i la pressió a la velocitat de fermentació del *S. Cerevisiae*. Com ja bé sabem, la velocitat de fermentació es defineix com la variació en el temps de les substàncies finals i inicials involucrades en la reacció. En el cas que ens ocupa, la substància inicial és la glucosa i les finals, l'etanol i el CO₂. Per aquesta raó, quan plantejàvem els nostres experiments buscàvem mètodes per mesurar les concentracions d'alguna d'aquestes substàncies.

Eventualment i en base al material del que disposàvem, vam decidir mesurar la concentració de CO₂, però no pas directament,- no disposàvem de mitjans per fer-ho- sinó d'una manera molt enginyosa. Veieu, a les temperatures a què teníem pensat treballar, el diòxid de carboni es troba en fase gasosa. Aquest fet fou convenient per nosaltres, car la quantitat de gas present a un recipient es proporcional a la pressió del mateix i nosaltres, afortunadament, disposàvem d'equipament per mesurar-la. Per fi disposàvem nosaltres ja d'una manera de mesurar la velocitat de fermentació, el que significava que estàvem més a prop de ser capaços de donar resposta a les nostres qüestions inicials.

No obstant, això no era suficient, nosaltres volíem confirmar els nostres resultats amb altres experiments amb metodologies diferents. Per aquesta raó vam buscar un altre mètode per mesurar la concentració d'alguna de les substàncies mencionades en els cultius. Aquest cop, la molècula escollida fou la glucosa.

La determinació de la quantitat de glucosa present en les mostres la vam realitzar mitjançant un mètode extremadament complex basat en les propietats òptiques d'una substància obtinguda a partir de la glucosa. La magnitud d'aquest experiment fou tal que ens va ser necessari tenir accés a instrumental universitari.

Casualment, la mateixa tècnica òptica que ens va servir per mesurar la concentració de glucosa ens va possibilitar respondre la següent pregunta. Efectivament, la determinació del creixement de les colònies del llevat també es pot realitzar per mètodes òptics.

L'última qüestió no la vam contestar pas de manera experimental sinó amb l'ajuda d'un expert en l'àmbit de la cervesa. Això ens va ensenyar que no hi ha un sinó multitud de maneres diferents de realitzar recerca.

En conclusió, durant la realització del treball de recerca ens vam servir de diferents procediments per donar resposta a les preguntes inicialment plantejades amb el grau de rigor i precisió que requereixen.

7.Marc teòric

Abans d'endinsar-nos en la part més tècnica del treball, és important entrar en context i familiaritzar-se amb el món de la cervesa. I quina millor manera d'introduir-se en aquest món que fent una passada per la història d'aquesta beguda tant popular per tal de veure com ha evolucionat al llarg del temps.

7.1.Un cop d'ull al passat de la cervesa

Els microorganismes tenen un paper molt important en la nostra vida. No només són una part important dels nostres cossos a causa de les tasques immunològiques i digestives que desenvolupen, sinó que també estan molt presents en la nostra gastronomia. En efecte, alguns dels aliments més consumits, com per exemple el pa, la xocolata, la cervesa i el vi, no serien possibles si no fos pels canvis que produeixen aquests organismes en ells mitjançant un procés anomenat fermentació.

Tanmateix, no tots són innocus pels humans; una petita fracció d'aquests microorganismes, els anomenats patògens, són causants de malalties. Aquest fet ha condicionat la repulsa que els humans senten envers els aliments amb signes evidents d'activitat microbiana. El primer ús fet d'aquesta activitat per profit humà va ocórrer, bé per accident o bé en un període de grans privacions, fa uns 20.000 anys, i es creu que, a causa dels avantatges que comportaven els aliments modificats, aquest fet va provocar el desenvolupament de l'agricultura i l'abandonament definitiu de la vida nòmada.

7.1.1.Edat Antiga

Mesopotàmia: sumeris, babilonis, acadis i asiris

Les primeres mostres clares de la producció d'aquesta beguda, són unes taules on es detalla la seva elaboració, daten del 4000 aC a Sumèria¹. Del mateix període es conserven un vas amb restes d'aquesta beguda i una oda a la deessa sumèria de la cervesa on es detalla la seva recepta.

¹ <http://www.civinova.com/2011/02/24/los-primeros-productores-de-cerveza/>



Imatge. 1.

Tauleta sumèria que demostra que en aquella època ja es bevia el que és probablement la primera cervesa.

Per a aquesta civilització, la cervesa no era una beguda qualsevol, tenia una gran importància en la seva dieta i, sorprenentment, en la societat també. La seva composició la convertia en una font primària de nutrients i en una alternativa més segura a l'aigua, normalment contaminada. Els sumeris en coneixien diferents tipus i la consumien en grans gerres i a través de canyes buides, individualment o en grup, en tabernes, normalment acompanyats de música. La importància de la cervesa, però, no es limitava a l'àmbit recreatiu: no era inusual que els treballadors cobressin part del seu sou en cervesa i, en èpoques de guerra, els cervesers no havien d'agafar les armes. A més, quan algú moria, la família dipositava un tribut de cervesa als déus per acontentar-los.

La decadència de Sumèria no va comportar la desaparició de la cervesa a Mesopotàmia, al contrari, les civilitzacions hereves van desenvolupar-ne la cultura. Els babilonis, acadis i asiris en coneixien més de vint tipus, i van ser els acadis els primers en detallar acuradament les quantitats i les passes que s'havien de seguir durant la seva fabricació en uns textos anomenats *Receptes de Grisú*². En aquells temps, l'ingredient principal era la malta de civada, a la qual s'afegien herbes aromàtiques o suc de dàtils per tal d'aconseguir sabor. De fet, a la cervesa se la coneixia com a vi de dàtils amb sèsam, com queda

²<http://culturillacervecera.blogspot.com.es/2008/07/la-cerveza-en-la-antigua-mesopotamia-i.html>

reflectit al *Codi d'Hammurabi*³, on s'esmenten els càstigs per aquells que rebaixin la cervesa.



Imatge 2. Codi d'Hammurabi, on es posen de manifest unes normes concretes de la venda i del consum de la cervesa.

La cervesa a Egipte

Encara que la cervesa ja era important en altres civilitzacions antigues, són els egipcis els que la van portar al seu màxim exponent. Aquesta cultura considerava aquesta beguda i el pa com a dos nous ulls i creien que havia estat atorgada als humans per Osiris⁴, déu i jutge dels morts, motiu pel qual estava molt present a les cerimònies funeràries. A causa de l'alt preu de la malta, usualment la substituïen per espelta i la condimentaven amb un gran nombre de substàncies aromàtiques, sals i fruites. La seva elaboració, a diferència del que passava a Mesopotàmia, era industrial i estava controlada estrictament pels governadors, els qual comprovaven la seva qualitat i la certificaven. La cervesa egípcia contenia restes de cereals i d'altres plantes, motiu pel qual s'assemblava més al puré o al gaspatxo que a la cervesa actual. Per aquesta raó, el seu principal destí era ser menjada per la gent pobra i també es té constància que la feien servir com a medicina. De fet, la recepta més acurada que es coneix es troba en un document mèdic. Aquesta civilització també coneixia els efectes adversos que comporta el seu consum indiscriminat, com es veu reflectit en un text escrit per un visir on es demana un consum responsable per part de la població.

³ es.wikisource.org/wiki/C%C3%B3digo_de_Hammurabi:_Leyes_101_a_150

⁴ <http://www.beeradocate.com/articles/629/>



Imatge 3. Gravat egipci, on es veu un pobre consumint una cervesa.

La cervesa a l'Europa sota l'Imperi Romà

Durant l'Antiguitat clàssica, la cervesa era principalment consumida a les terres del nord d'Europa per les tribus bàrbares. Aquest fet va donar-li fama de beguda d'homes rudes i salvatges, per la qual cosa va ser rebutjada pels grecs i romans, més aficionats al vi. Amb el debilitament de l'Imperi, la influència dels bàrbars sobre les terres occidentals va créixer i l'acceptació a la beguda es va anar estenent.



Imatge 4. Representació d'un Víking bevent cervesa.

7.1.2. La cervesa a l'Europa Medieval

A l'època Medieval, la cervesa va estar estretament lligada als monestirs. Aquestes institucions es van convertir en els principals productors de cervesa a Europa a causa de les grans extensions de conreus que posseïen i a l'exempció de pagar impostos. A més, pel fet que la cervesa continuava essent una alternativa més saludable a l'aigua, que era un dels pocs aliments que es podien consumir en festes religioses i que la seva fabricació era més rendible que la dels altres derivats dels cereals, la beguda estava present a les

societats en uns nivells mai vistos. A causa de la seva popularitat, els monjos van experimentar amb ella i van introduir una modificació al gruyt, cosa que els va atorgar el monopoli de la beguda en detriment dels artesans. El gruyt era una barreja de murta, una herba aromàtica salvatge, fruits dels bosc i romaní salvatge que donava un gust picant i que dificultava l'oxidació de la beguda. Els detalls exactes de la seva elaboració eren guardats amb gelosia pels monjos i els artesans havien de pagar per aconseguir-la.



Imatge 5. Monjo fabricant cervesa.

El domini de l'Església sobre la beguda, com sobre tants altres aspectes, es va debilitar amb la revolució urbana, que va comportar l'augment del comerç i l'aparició del llúpul, una planta que actuava com a substituta del gruyt i, al mateix temps, com a conservant. La prohibició de l'ús d'aquest cereal, causada per la inexistència de control eclesiàstic sobre ell, va provocar un enfrontament entre l'Església i els artesans. L'apoderament dels gremis d'artesans va comportar la derogació de la prohibició, posant de manera definitiva el control de la cervesa en mans dels artesans. El llúpul es va fer un lloc entre els ingredients de la cervesa i va ser inclosa, juntament amb l'aigua i la malta de

civada, a la primera regulació de la fabricació de la beguda, la *Reinheitsgebot*⁵, el 1516.



Imatge 6. Document de Reinheitsgebot, primera regulació sobre la fabricació de la cervesa.

7.1.3. La Revolució Industrial

La Revolució industrial va marcar un abans i un després en la fabricació de la cervesa. L'arribada de la màquina de vapor va agilitar la producció de la beguda, i el ferrocarril i la producció de gel artificial van permetre que arribés a totes les llars. A més, la desaparició del vi dels mercats provocada per l'epidèmia de fil·loxera va estendre el consum de la beguda a indrets on fins a llavors havia predominat el vi. Tot i això, va ser l'aspecte científic de la cervesa el que va patir una veritable revolució. Científics com Pasteur i Cagniard-Latour van descobrir i identificar el veritable responsable de la fermentació alcohòlica, el llevat, fins aleshores considerat un mer catalitzador. Aquest fet va permetre als productors de cervesa incrementar el seu control sobre la fabricació de la beguda i també eliminar els organismes que li donaven un gust amargant, millorant-lo.



Imatge 7. Fàbriques de cervesa del s.XIX.

⁵ <https://en.wikipedia.org/wiki/Reinheitsgebot>

7.1.4.L'actualitat

Des d'aleshores, les tècniques de producció, emmagatzematge i distribució s'han optimitzat per tal de produir els màxims beneficis pels productors. Malauradament, la incessant recerca de la màxima eficiència en detriment de la qualitat, ha comportat la pèrdua del veritable sabor de la beguda. Això ha generat un moviment de retorn als orígens artesanals de la cervesa entre alguns sectors artesans. Al mateix temps, projectes com *Free Beer*⁶ lluiten contra l'excessiva mercantilització del producte mitjançant la creació de receptes a l'abast de tothom i lliures, construïdes amb les aportacions d'usuaris altruistes.



Imatge 8. Cerveses artesanals.

⁶ <http://freebeer.org/blog/>

7.2.Què necessitem per elaborar-la?

Ara que hem entrat en context i hem vist quines transformacions ha patit la cervesa al llarg de la seva història, arribem a l'actualitat. La cervesa, tal i com s'entén avui dia, s'elabora amb una sèrie de components que s'explicaran a continuació i que li donen unes característiques úniques.

La cervesa més simple es podria fer amb tres ingredients bàsics, tot i que a més d'aquests tres, se n'utilitzen molts més per donar personalitats diferents a la beguda. Són l'aigua, la malta i el llevat.

7.2.1.L'aigua

Comencem per l'aigua. És l'ingredient principal, ja que constitueix aproximadament el 90% del producte final. L'aigua que hem d'utilitzar per elaborar cervesa ha de ser bacteriològicament neta, cosa que vol dir que no ha de tenir bacteris perquè aquest fet podria modificar les seves característiques i afectar la salut del consumidor. Hi ha diferents paràmetres de l'aigua que fan que el gust, la textura i el color de la cervesa variïn. Es tracta de la seva duresa, del pH i dels ions dissolts a l'aigua⁷.

Pel que fa a la duresa, s'ha de tenir en compte la concentració de sals dissoltes, en particular les sals de magnesi i les de calci. Una cervesa feta amb aigua dura tindrà més concentració d'aquestes sals i serà ideal per fer cerveses d'alta fermentació, fosques... Per altra banda, una feta amb aigua tova tindrà menys concentració de sals i anirà bé per fer cerveses de baixa fermentació... És a dir, tenir controlat un factor com és la duresa de l'aigua és fonamental per al productor, ja que en funció del tipus d'aigua i de les sals que presenti anirà millor o pitjor per a elaborar un tipus o un altre de cervesa.

El segon factor a considerar és el pH. El pH és la mesura de l'acidesa o l'alcalinitat de l'aigua i es compta en una escala que va del 0 al 14. Un valor menor de 7 significa acidesa, i un de superior a aquesta xifra, alcalinitat. En un procés anomenat maceració, un pas previ a la fermentació de la cervesa, el pH del nostre most esdevé lleugerament àcid com a resultat de la reacció dels ions Ca^{2+} dissolts a l'aigua amb uns grups fosfat que hi ha al cereal maltejat. Hi ha

⁷ <http://www.cervezadeargentina.com.ar/articulos/agua.html>

diversos factors pels quals ens interessa assolir un pH àcid abans de començar el procés de fermentació. A mesura que avancem en el treball s'aniran fent evidents aquests factors, però per posar un parell d'exemples, un pH àcid afavoreix poder assolir les temperatures òptimes d'alguns enzims que seran crucials en l'obtenció d'alcohol i CO₂ durant la glicòlisis, un procés que més endavant estudiarem. També és important per un fet que vam descobrir un cop vam haver fet els experiments i que té a veure amb l'obtenció del gas CO₂.

Per acabar amb aquest ingredient, cal tenir en compte que els ions dissolts a l'aigua influencien de manera important les característiques de la cervesa. El **ió bicarbonat (HCO₃⁻)** ajuda a regular el pH de l'aigua, la qual serà més àcida o més bàsica en funció de la seva concentració. El **sodi (Na⁺)** es fa servir per donar més cos, caràcter i sensació en boca a la cervesa. El **ió clorur (Cl⁻)** potencia la dolçor de la malta i dóna complexitat a la beguda. És important considerar que si hi ha ions clorur i ions sodi en excés, es formaran altes concentracions de clorur de sodi (sal comuna) i farà que la cervesa quedi massa salada⁸. També és precís esmentar el **sulfat (SO₄²⁻)**, que afavoreix l'amargor de la cervesa, i el **calci (Ca²⁺)**, que és essencial per proporcionar duresa a l'aigua i per fer precipitar algunes proteïnes del cereal, ja que és un agent floculant. Recordem que la floculació és la formació d'agregats sòlids en un medi líquid i la posterior precipitació d'aquests. Finalment, a l'aigua també s'hi pot afegir **magnesi (Mg²⁺)**, que servirà com a nutrient per al llevat. No obstant això, amb les aportacions de magnesi per part del cereal ja n'hi ha prou perquè proporciona un gust desagradable a la cervesa quan es troba en excés.

7.2.2.La malta

Pel que fa a la **malta**, és l'ingredient que dóna color, gust, aroma i cos a la cervesa. A més, és imprescindible, ja que aporta els sucres que seran fermentats en fases avançades del procés d'elaboració de la cervesa.

La malta és el resultat del maltejat, un procés que s'aplica als grans de cereal. Consisteix en fer-los germinar en aigua, i un cop retirats del líquid, assecar-los amb aire calent. Aquesta operació fa activar els enzims diastàtics (encarregats del trencament de polisacàrids en sucres simples), que

⁸ <http://www.cervezadeargentina.com.ar/articulos/agua.html>

convertiran el midó, una molècula molt gran de sucre, en sucres més simples que podran ser assimilats pel llevat. Per fer aquest procés, el cereal més utilitzat és l'ordi, ja que conté molts enzims. Tot i així, se'n poden utilitzar d'altres com el blat, el sègol, la civada...

El procés de maltejat, que més endavant estudiarem a nivell molecular, consta de tres parts: la germinació, l'assecat i l'enfornat.

El primer pas consisteix en posar el cereal en remull per tal d'iniciar la seva germinació en unes cambres on hi estaran uns quants dies a temperatura i humitat constants. El procés de germinació serveix per activar els enzims presents en el gra, els quals, com bé s'ha dit abans, convertiran els llargs polímers de midó en sucres simples. A continuació es passa a l'assecat. Els grans de cereal es posen en un forn per assecar-los i per aturar la germinació. Tot i que hi ha processos de maltejat que acaben aquí, l'últim pas en la majoria dels casos és l'enfornat. El gra es torra en forns a altes temperatures i durant diferents períodes de temps. Aquest procés determinarà el color i el gust de la cervesa.

Podem distingir tres categories diferents de maltes que depenen de la durada, la temperatura i el grau de torrat de l'enfornat.

En primer lloc hi ha les **maltes base**, aquelles que s'han enfornat durant poc temps i a baixes temperatures, motiu pel qual presenten una alta concentració en sucres, no agafen un gust molt fort i intens, i no perden el poder diastàtic dels enzims del gra o capacitat per trencar molècules en altres de més simples. Normalment aquestes maltes provenen dels cereals ordi i blat i s'usen en l'elaboració de la majoria de les cerveses.

En segon lloc trobem les **maltes caramel**, les quals, després del maltejat, són sotmeses a un procés especial de cristal·lització o caramel·lització dels sucres. Així doncs, aquestes maltes s'usen per a obtenir cerveses amb una dolçor de caramel i un gust més delicat.

En tercer lloc parlem de **maltes torrades**. Són les que s'aconsegueixen en assecar totalment el gra del cereal, i després, torrant-lo a temperatures majors de 170°C. Durant aquest torrat o enforat, la malta adquireix unes propietats organolèptiques molt característiques que condicionen les de la beguda final. Els canvis que ocorren durant aquest procés es coneixen com a reaccions de Maillard i són també les responsables del canvi de color, olor i sabor i que experimenten multitud d'aliments, com per exemple les carns, quan són escalfades o cuinades. Així doncs, en aquesta classe de maltes hi ha un gran nombre de varietats que es diferencien pel grau de torrat. Com més torrada sigui la malta, més fosca serà la cervesa i el seu gust serà molt més fort.



Imatge 9. Diferents tipus de malta.

Els cereals que es maltegen més habitualment són quatre: l'ordi, el blat, el sègol i la civada. L'ordi és el que més s'usa per fer cervesa perquè té un temps de germinació curt i un alt contingut de midó, a més de posseir moltes proteïnes. El blat té més proteïnes que l'ordi, dóna una sensació a la boca més rica i una espuma més cremosa. També té un major poder diastàtic per convertir el midó en sucres fermentables. El sègol s'utilitza per donar un gust

especial i únic a la beguda. La civada té molta concentració de greixos, proteïnes i olis, per tant no és tan recomanable per fer cervesa. Aquest cereal es fa servir per donar-li un gust de galeta.

Tant el sègol com la civada tenen baix poder diastàtic, així sempre s'han de mesclar amb ordi perquè tingui lloc l'adequada conversió del midó en sucres senzills. Aquest fet no és gens estrany, ja que pràcticament cap cervesa s'elabora amb un sol tipus de cereal. El més normal és utilitzar combinacions de diferents cereals per donar-li un caràcter personalitzat.

Els cereals adjunts són els que com bé acabem de dir, serveixen per donar varietat i caràcter a la cervesa. A continuació trobem alguns exemples: L'arròs li dóna un toc peculiar i és el cereal amb més contingut en midó de tots, la qual cosa es tradueix en una alta aportació de sucres. Encara que soni estrany que s'utilitzi arròs per a fer cervesa, moltes marques mundialment conegudes ho fan, com ara la famosa Budweiser. El blat sense maltejar, de la mateixa manera que l'arròs, ens permet obtenir cerveses més lleugeres i clares. L'ordi sense maltejar té més proteïnes i beta glucans (llargues cadenes de sucres), i això millora el cos i l'estabilitat de l'espuma de la cervesa. Amb tot, si se n'abusa, aquesta en pot sortir perjudicada. El sègol sense maltejar li proporciona un gust fort i peculiar, especial i ataronjat. Finalment, la civada sense maltejar té un alt contingut en greixos, proteïnes i beta glucans i per tant, el seu ús afavoreix enormement el cos i la sensació en boca del producte final.

7.2.3.El llevat

El tercer ingredient és el **llevat**, un fong unicel·lular i microscòpic capaç de descompondre substàncies orgàniques per fermentació. En el cas de la cervesa, ens interessa la capacitat que tenen aquests microorganismes per convertir els sucres simples que hi ha dissolts al most, en alcohol i CO₂. Els llevats utilitzen els aminoàcids de les proteïnes, els sucres i altres substàncies per alimentar-se, per créixer i per multiplicar-se. Cal esmentar que un cop s'acaba la fase de fermentació, sempre hi ha una petita part de llevats que queda a la cervesa, però no s'ha de patir perquè són molt nutritius i li aporten sabor.



Imatge 14. Llevats.

Hi ha dues classes de llevats que determinen els dos grans tipus de cervesa: els d'alta fermentació i els de baixa fermentació.

Els d'alta fermentació es troben a la natura, allà on hi ha substrats rics en sucres o als exsudats (substàncies secretades a través dels porus dels teixits malalts o danyats de les plantes) i sabs dolces d'algunes plantes. Funcionen bé a temperatures d'entre 12 i 24 °C, es col·loquen a la superfície del most, i determinen les cerveses de tipus Ale. Aquest tipus de llevat és el més conegut i rep el nom de *Saccharomyces cerevisiae*. Té la facultat de créixer de forma anaeròbica durant la fermentació alcohòlica. El terme anaeròbic significa que l'organisme en qüestió té la capacitat de sobreviure i continuar les seves funcions metabòliques en absència d'oxigen.

Els llevats de baixa fermentació van ser descoberts accidentalment pels alemanys, que sotmetien les seves cerveses a baixes temperatures a coves dels Alps. Estan actius a temperatures de 7-13°C i se situen al fons del most. Aquests determinen la cervesa Lager i s'anomenen *Saccharomyces uvarum*. Es creu que aquest tipus de llevat és un híbrid entre el *Saccharomyces cerevisiae* i un altre tipus menys conegut anomenat *Saccharomyces monacensis*.

També hi ha cerveses que aprofiten cèl·lules de llevat que es troben a l'aire generalment en forma d'espores per fer la fermentació. Reben el nom de cerveses de fermentació espontània.

Com ja hem dit al començament, amb aquests tres ingredients que acaben de ser explicats, ja es podria fer cervesa. Però en realitat, sempre s'hi afegeix un quart component, el **llúpul**. De fet, aquest és essencial en l'elaboració de cervesa, perquè li dóna l'amargor i el gust característic.

7.2.4.Llúpul

Es tracta d'una planta enfiladissa amb unes propietats aromàtiques excepcionals, i s'usa per donar a la cervesa l'amargor que la caracteritza. Només se n'utilitza la flor femella sense fecundar, perquè en el seu interior té unes glàndules grogues plenes d'una resina anomenada lupulina, la qual proporciona tot un seguit de propietats:

Per una banda, la lupulina aporta el gust amarg. Aquest sabor es deu principalment a uns compostos químics anomenats àcids-alfa, que durant el procés de cocció de la cervesa es transformen en àcids iso-alfa (una variant dels anteriorment esmentats). També aporten unes propietats antibacterianes que ajuden a conservar la cervesa en bon estat i lliure d'organismes invasors. Per altra banda, la lupulina conté tot un conjunt d'olis essencials que proveeixen d'uns aromes frescos i afruitats inconfusibles. Finalment, resulta interessant comentar que la lupulina, a més, conté unes curioses, complexes i variades substàncies anomenades tanins, que serveixen, entre d'altres coses, per fer coagular i precipitar determinades proteïnes que es puguin trobar suspeses al most i que puguin ser indesitjables. Cal esmentar que existeixen molts tipus diferents de llúpols provinents de diferents localitats del món i que aporten una gran diversitat, proporcionant diferents tipus d'amargor, acidesa, etc.



Imatge 15. Llúpul Txec exposat de diverses formes.

7.2.5. Additius aromàtics

La cervesa pot admetre altres ingredients que li donen singularitat. Entre aquests destaquen les fruites que li aporten aromes. Les més utilitzades són les cireres, els gerds, les fruites del bosc, els plàtans, els albercocs, les pomes i els préssecs. També s'utilitza la mel que li dóna dolçor, i algunes herbes com el romaní, l'anís, la farigola, el coriandre o el cardamom. Tot i així, aquest apartat serà més desenvolupat en l'explicació de l'elaboració de la cervesa.

7.3. Tipus de cervesa

Com qualsevol altre tipus de producte, la cervesa presenta infinitat de varietats fruit de petites modificacions en el procés d'elaboració i en els ingredients. Són usualment característiques de diferents regions i contribueixen a la complexitat cultural de la beguda.

Els diferents estils de cervesa es poden classificar de moltes maneres: per la seva procedència, pels seus ingredients, pel seu procés d'elaboració,... No obstant això, com que aquest treball de recerca està centrat en la fermentació de la cervesa, nosaltres hem decidit diferenciar-los segons la seva forma de fermentar. Així doncs, podem distingir-ne tres tipus, de fermentació espontània, d'alta i de baixa fermentació. A més, hem considerat interessant classificar-les cronològicament. Per aquest motiu, començarem explicant les primeres cerveses que varen aparèixer en les civilitzacions humanes.

7.3.1. Fermentació espontània

En aquest tipus de cervesa, la fermentació utilitza els agents fermentadors que es troben a l'aire i que, com que són microscòpics, no els podem veure a simple vista. Dintre d'aquest grup hi trobem diferents cerveses.

La més antiga és la **Lambic**, però actualment no es fabrica molt, només a Bèlgica. La seva elaboració és tan simple que únicament consisteix en fer el most i deixar-lo reposar. S'elabora amb pocs cereals maltats i amb un llúpol que ha perdut una mica d'amargor, per tant, la lambic és una cervesa una mica àcida.

El tipus **Gueuze** és tan simple com el Lambic. S'elabora mesclant cervesa Lambic jove i vella. Es considera que una cervesa jove és la que té un procés d'elaboració que dura un any com a màxim, mentre que la cervesa vella s'elabora en tres anys aproximadament.

A continuació, les **Kriek & Frambozen** són el resultat d'aromatitzar amb fruites les Lambic o les Gueuze. Normalment les fruites més utilitzades són: cirera, gerd, préssec i plàtan.

L'última cervesa de fermentació espontània que es coneix és la **Faro**. És una cervesa Lambic que s'enriqueix amb sucre, un cop ja havia fermentat. Va tenir molt èxit al segle XIX però actualment està en desús.



Imatge 16. Diferents tipus de cervesa de fermentació espontània.

7.3.2. Alta fermentació

Un cop es va descobrir com fer i dominar la fermentació es van començar a fabricar cerveses d'alta fermentació o Ale. Són cerveses que es fermenten a altes temperatures (entre 15-24 °C), i en aquestes, el llevat *Saccharomyces Cerevisiae* fa la seva tasca a la part superior del recipient o tanc fermentador. Aquestes cerveses tenen un color més aviat fosc en comparació amb les altres. Dins d'aquest grup podem diferenciar les cerveses segons la seva procedència.

Primer de tot parlarem de les cerveses produïdes a Gran Bretanya. Les **Bitter** tendeixen a un gust més amarg, a causa de les propietats del llúpul. Es venen en bidons. És l'estil més popular del Regne Unit.

En segon lloc trobem les **Mild Ale** o **mild**, més suaus i dolces que la Bitter. Són la base de totes les cerveses angleses actuals.

A continuació, tenim les **Pale Ale**, que al cap i a la fi són cerveses Bitter que es venen envasades, però que han perdut una mica d'amargura i són un mica més denses. Abans de la revolució industrial, les cerveses eren molt fosques i aquesta en particular destacava per ser més clara que la resta. D'aquí li ve el nom de pale, pàl·lida.

En quart lloc, les **Strong Ale & IPA**, són unes variants de les Pale Ale i consisteixen bàsicament en una graduació alcohòlica més alta i un gust més potent. Van ser creades en el seu moment per satisfer aquells consumidors que volien una beguda més forta i també per poder ser exportades a les colònies angleses, especialment a l'Índia.

El cinquè grup de cervesa és el **Brown Ale**. Són fortes, amb un gust potent de malta, tenen un color que va des de l'ambre fins al marró i una aroma seca i afruitada.

Les cerveses **Old Ale**, són aquelles cerveses Ale que mantenen la recepta més tradicional. Tenen un color fosc, molt cos i de vegades un gust certament dolç.

En èpoques de fam i misèria els pobres buscaven alimentar-se amb begudes i els cervesers van començar a fer productes més forts. D'aquestes la més importat va ser la **Barley Wine**, que vol dir vi d'ordi i que pot arribar a una graduació alcohòlica del 12% en volum. Són cerveses molt fosques i amb molt cos. Cal esmentar que l'alcohol fa passar la sensació de gana, i entre això i que la cervesa en l'antiguitat era vista en certa manera com un aliment, és lògic que fos popular entre les classes més desfavorides.

Seguint la línia de les Barley wine trobem les **Porter** i les **Stout**. Les Porter, durant la revolució industrial, van tenir una gran acceptació entre les classes populars. Tenen l'aroma del maltejat i l'amargor del llúpul. S'elaboren amb aigües toves. Les Stout van ser unes de les últimes en aparèixer i es van fabricar per donar un toc més robust a la beguda. Es fabriquen de moltes maneres diferents i se li afegeixen productes de tota mena, com per exemple llet. Aquestes cerveses agradaven molt als països escandinaus i russos.

A continuació tenim l'**Scotch Ale**, que és la cervesa més forta del Regne Unit. S'elabora amb maltes escoceses força torrades, la qual cosa li dona un color marró fosc. Per fer-la s'utilitzen llúpols menys amargs. També cal esmentar que té un alt contingut en aigua. A la primera guerra mundial va ser molt popular a Bèlgica.

A Irlanda el tipus més popular és l'**Irish Ale** o **Irish red**. És amarga, de color rosat i de vegades amb un lleuger gust de mantega i amb un toc afruitat. Sol portar força llúpol.

A Alemanya es feia molta cervesa Ale, però quan es van descobrir les de baixa fermentació o Lager, es va reduir molt la seva producció. Tot i així, actualment se n'està recuperant el consum.

Una d'aquestes Ale és la **Altbier**, que prové de la regió de Niederrhein a Alemanya. Es fabrica seguint la recepta tradicional de l'Ale, encara que es deixa madurar a baixes temperatures com les Lager. Té un fort gust de malta i una amargor lleugera i subtil.

L'altre tipus d'Ale que també va aconseguir sobreviure a les Lager alemanyes és la **Kölsch**. És clara com una Lager Pilsen però manté les aromes i els gustos d'una Ale.

Un altre país que produeix la cervesa d'alta fermentació és Bèlgica.

Entre aquestes cerveses destaquem l'**Ale torrada**. És un estil de Flandes i en aquesta regió s'anomena Oud Bruin. Té un color castany i marró.

També s'elabora a Flandes, exactament a l'oest d'aquesta regió, l'**Ale Roja**. Com és evident, té un color rosat que es dona pel tipus de malta utilitzada. És lleugera i àcida.

La cervesa **Ale Daurada Forta**, es va produir perquè un cerveser que elaborava Ale fosca va decidir fer-la més clara, més daurada.

La cervesa **Sasion** es fabrica al sud de Bèlgica. És molt peculiar perquè té un color ataronjat i una espuma molt densa. És fresca, afruitada i amb moltes bombolles.

Per acabar, cal esmentar les **Trapense** i les **d'Abadia**, que són úniques de Bèlgica i antigament es feien als monestirs i a les abadies.

Altres països que produeixen cerveses Ale són França, EEUU, l'Ale Americana i Austràlia, l'Sparkling Ale.



Imatge 17. Diferents cerveses Ale.

7.3.3. Baixa Fermentació

Per accident es va descobrir una nova manera de fermentar el most de la cervesa, la baixa fermentació, que consisteix en dur a terme aquest procés a temperatures al voltant dels 10°C i amb un altre tipus de llevat (*Saccharomyces uvarum*). Aquest grup també s'anomena cerveses d'estil Lager. Són cerveses que es consumeixen fresques. El llevat actua a la part inferior del fermentador. Són les més consumides a la zona de l'Europa occidental i les més contemporànies. La més popular és la **Pilsen**, que es caracteritza per tenir un color pàl·lid, amb un grau d'alcohol moderat. És la més imitada per les microcerveseries. Unes de molt semblants a les Pilsen són les **Lager Pàl·lides de Baviera**, que es caracteritzen per ser més fosques, més llupolitzades, menys seques i amb més cos que el grup anterior.

Per altra banda, existeixen les **Lager Fosques, Estil Munich o Dunkel**, amb un color que va des del vermell-marró fins al negre i amb més graduació alcohòlica que les pàl·lides.

La cervesa d'**Estil de Viena** és originària d'aquesta ciutat, però actualment s'elabora a Munich. Té un color de bronze o coure així com molt de cos.

En arribar aquest estil de fer la cervesa, hi va haver productors que feien les receptes de les Ale tot canviant el llevat i la manera de fermentar-lo. Un d'aquests exemples és la **Bock**. Actualment és una cervesa forta i pot ser clara o fosca. Normalment es fabrica amb ordi, encara que de vegades s'hi afegeix blat.

Finalment, a les Lager hi ha l'**Export**, originària de Dormunt i que és pàl·lida. Està feta amb menys llúpul i té més cos que la Pilsen. Quan es va iniciar la seva producció, bona part es va dedicar a l'exportació. Per això rep el nom d'Export. Als anys 50 va quedar gairebé oblidada, però posteriorment, els americans i els japonesos la van recuperar.



Imatge 18. Cerveses lager.

7.4.El procés d'elaboració de la cervesa

Els ingredients, però, han de ser sotmesos a una sèrie de processos per tal d'ésser transformats en aquesta beguda tan característica, la cervesa.

A continuació explicarem els diferents passos que se segueixen per elaborar la cervesa. Es tracta d'un procés compartit, en gran part, per la cervesa artesanal i la industrial, tot i que presenta petites diferències que ja comentarem una mica més endavant. Així, al final d'aquest apartat establirem les diferències entre l'elaboració artesanal i la industrial.

Per elaborar cervesa podem usar diferents tipus de cereals segons el caràcter i els gustos que li vulguem donar, com ara l'ordi (el més comú, perquè és dolç i fàcil de trencar), el blat, la civada, el sègol... Però tot just començar ens trobem amb un problema, i és que alguns d'aquests cereals, com l'ordi, el blat o la melca, inicialment presenten uns sucres que no poden ser assimilats pels llevats. Aquests sucres són principalment midó, que és un polisacàrid que forma cadenes molt llargues de glucosa unides amb enllaços O-glicosídics que fan que la molècula no sigui fermentable. D'aquesta manera, per poder elaborar la cervesa, necessitem trencar les cadenes en sucres simples fermentables per tal que el llevat hi pugui actuar. I així és com arribem al primer pas: el maltejat.

7.4.1.Maltejat

El maltejat és un pas fonamental en el procés i consisteix bàsicament en mullar el gra de cereal, iniciar la seva germinació, assecat-lo en el moment precís i enfornar-lo per tal d'obtenir un producte fermentable. El primer pas, com bé hem comentat, consisteix en posar el gra en remull amb aigua durant un parell de dies. A continuació es retira i es diposita en cambres de germinació que mantenen unes condicions de temperatura i humitat fixes per afavorir la seva germinació. Aquest procés activa uns enzims naturals del gra anomenats diastases, que s'encarregaran de trencar les cadenes de midó. Concretament, les diastases que s'activen són l'alfa-amilasa i la beta-amilasa.

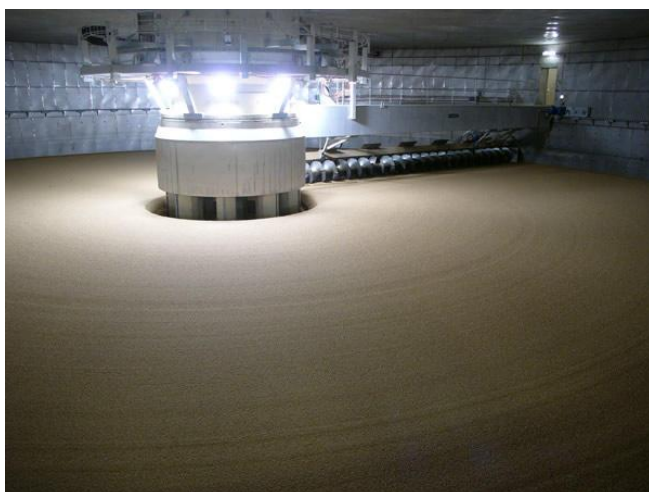
L'alfa-amilasa trenca les cadenes de midó en unes cadenes d'entre 6 i 8 glucoses anomenades dextrines. Les dextrines seran el substrat del següent

enzim, i tot i que tampoc són fermentables, aporten cos a la cervesa i altres sensacions de textura que es perceben en tastar-la.

Seguidament, la beta-amilasa actua sobre les dextrines obtenint glucosa (monosacàrid), maltosa (disacàrid) i maltotriosa (oligosacàrid de tres glucoses). Després d'això, ja haurem obtingut els sucres simples que efectivament seran fermentables (aquest procés s'acostuma a realitzar entre 60 i 70° C, que és el marge en el qual es troben les temperatures òptimes d'actuació dels enzims).

Al cap d'uns quatre dies aproximadament (quan la radícula o arrel té una mida de 3/4 parts la mida del gra), es col·loca el gra en uns forns que aturaran la germinació i assecaran el gra amb unes temperatures d'entre 50 i 70° C i a una humitat relativament baixa durant un dia i mig (aprox.) tot obtenint un tipus de gra que anomenarem malta base. Un cop sec, el gra es fa passar per unes plataformes vibratòries que afavoreixen el despreniment de les radícules que s'han començat a formar durant la germinació.

Per acabar el procés de maltejat, s'introdueix la malta base en uns forns especialitzats que torren el gra amb aire calent i sec. Depenent del temps que deixem el gra al forn obtindrem diferents graus de torrat, els quals proporcionaran gustos, colors i caràcters molt diferents a la cervesa. Per exemple, una malta poc torrada donarà lloc a una cervesa més aviat rossa, mentre que una malta molt torrada (gairebé cremada) donarà lloc a la famosa cervesa negra. Molts productors de cervesa utilitzen mesclades de diferents maltes (algunes més fermentables i algunes menys) per obtenir gustos, textures i aromes més complexos.



Imatge 13. Procés de malta industrial.

7.4.2.Mòlta

Un cop obtingudes les maltes és hora de començar el següent pas: la mòlta. La mòlta consisteix en triturar la malta, però no es pot triturar d'una manera qualsevol, perquè, com sempre, el resultat de cada pas afecta a la qualitat del producte final. A més, les condicions de la malta mòlta tindran una gran influència en un pas que veurem més endavant, el filtratge del most. Aquí trobem una de les principals diferències entre els processos d'elaboració artesanals i els industrials.



Imatge 14. Malta mòlta.

Per una banda, els productors artesanals disposen de filtres més aviat convencionals (filtre cuba, semblants a un garbell o filtre tradicional), de manera que per poder fer un filtrat correctament, cal que la closca de la malta estigui el més intacta possible. Per tant, en aquest cas s'ha de moldre la malta intentant que el contingut del gra s'esmicoli i la closca no. Això s'aconsegueix de diverses maneres. Una tècnica que ho facilita és humitejar una mica la malta per aconseguir que la closca sigui més flexible i no es trenqui durant la mòlta. Es fa amb uns sistemes d'aigua calenta a una temperatura (40° C aprox.) que no afecta als enzims del gra, i l'objectiu és que la closca assoleixi un 20 o 30 % d'humitat sense alterar l'interior del gra. A continuació es fa passar el gra per una maquinària (molins de rodets) que s'encarrega de la mòlta.

Per altra banda, els productors industrials disposen de grans premses per fer la filtració, de manera que no és necessari conservar intacta la closca i la mòlta és fa amb una maquinària (molins de martell) que simplement esmicola tot el gra en partícules diminutes. En la indústria també es pot moldre la malta mantenint la closca intacta, ja que cada empresa escull la seva metodologia. Amb tot, el resultat ha de ser més o menys el mateix, una malta ben esmicolada que pugui ser aprofitada i separada de la closca en el moment del filtratge.

7.4.3.Macerat

Acte seguit, el resultat de la mòlta es barreja amb aigua calenta en unes calderes específiques i es comença a remoure la barreja fins a obtenir una pasta consistent. Les proporcions de l'aigua són aproximadament d'uns 2,5-3,5

kg d'aigua per cada kg de malta. L'objectiu d'aquesta fase anomenada macerat és que els sucres de la malta es dissolguin en l'aigua i s'obtingui el most que serà la base de la cervesa. A més, en aquesta fase, alguns sucres acabaran de trencar-se en sucres simples. El temps, la temperatura... del macerat poden variar en funció del tipus de cervesa que vulguem elaborar (Ale, Lager, Guinness...). Cal tenir en compte que en aquesta fase es determina quina serà la graduació alcohòlica de la cervesa. Com més concentració de malta hi hagi, més sucres hi haurà al most, i aquests, després de la fase de fermentació donaran lloc a una major concentració d'etanol. Les tres tècniques de macerat més conegudes són:

La infusió simple: s'usa per a les cerveses de tipus Ale. La temperatura de la barreja es troba al voltant dels 65° C i el macerat dura entre una hora i mitja i dues hores. És important que no hi hagi canvis bruscos de temperatura perquè els enzims del gra no quedin afectats (s'evita la seva desnaturalització).

La infusió complexa: s'usa per a les cerveses de tipus Lager. El macerat pot durar fins a 6 hores i es caracteritza pel fet que la temperatura va augmentant a poc a poc amb períodes de repòs entremig fins arribar als 70° C aproximadament. D'aquesta manera, es van activant gradualment diferents classes d'enzims (alfa i beta amilases) per acabar de trencar alguns sucres. Cada enzim té una temperatura d'actuació òptima, és per això que l'augment de temperatura és progressiu. En arribar a la temperatura màxima, els enzims s'hauran començat a desnaturalitzar i es dona el macerat per finalitzat.

Decocció: és una tècnica tradicional de macerat. Actualment ja no s'utilitza tant, però alguns artesans encara la defensen. Consisteix en separar aproximadament un terç del most i posar-lo a punt d'ebullició. A continuació, el terç del most es torna a barrejar amb la resta fent augmentar la temperatura de la totalitat. Aquest procés es feia servir per trencar les estructures químiques de la malta i així fer-la més vulnerable a l'acció dels enzims naturals del gra. Actualment, hi ha cervesers que consideren aquesta tècnica una despesa innecessària de temps i energia. Tot i així, els seus defensors creuen que en bullir el most es generen uns sucres anomenats melanoïdines, que donen unes propietats organolèptiques úniques a la cervesa.



Imatge 15. Exterior caldera de la cerveseria Moritz..



Imatge 16. Interior d'una caldera Moritz.



Imatge 17.

7.4.4.Filtratge

Acabada la maceració es procedeix a fer el filtratge del most per extreure i eliminar les partícules en suspensió, com ara les closques del cereal, que dificultarien efectuar les fases següents. Com hem comentat anteriorment, el filtratge serà més efectiu com més intacta hagi quedat la closca del gra de malta després de la mòlta. El primer que es fa és deixar la barreja en repòs

durant uns minuts per afavorir la precipitació de les partícules que es volen filtrar. I a continuació es filtra mitjançant un dels dos tipus de filtratge que s'han explicat abans (cuba o premsa).

Després del filtratge hem obtingut un most més o menys clar en funció dels nostres interessos i en funció de les nostres capacitats. Tot i així, ja comencem a tenir un líquid que ens resulta familiar. Efectivament comença a tenir un aspecte similar al de la cervesa.

7.4.5.Ebullició

És hora de començar a donar caràcter a la beguda. Es fa mitjançant la fase d'ebullició. Aquest pas es duu a terme bullint el most en unes calderes durant una hora - hora i mitja aproximadament. Òbviament, la temperatura d'ebullició del most es troba als 100°C considerant que el component majoritari del most és l'aigua.

L'ebullició té tot un conjunt d'objectius. El primer és aturar l'acció dels enzims diastases mitjançant un xoc tèrmic, ja que es desnaturalitzen al voltant dels 75-80 °C. En segon lloc, en bullir el most s'està esterilitzant, és a dir, s'està destruint qualsevol tipus de bacteri que hagi pogut aparèixer durant les fases anteriors. I en darrer terme, es dona amargor i aromes a la cervesa mitjançant l'addició del llúpul i altres aromatitzants. Com ja se sap, la flor femenina del llúpul conté lupulina, que és un oli o resina natural de la planta i que inclou un tipus d'àcids anomenats àcids alfa, els quals proporcionen el gust amarg. A més, es poden usar diferents tipus de llúpul en funció dels nivells d'amargor i els tipus d'aromes que ens interessin. Durant l'ebullició, no s'afegeix tot el llúpul d'una sola tirada, sinó que es fa en dos o tres temps. Les dues primeres tongades aportaran únicament el gust amarg, ja que les aromes que puguin aportar s'evaporaran com a conseqüència del contacte amb el most bullent. En canvi, la tercera tongada de llúpul, que s'afegeix quan l'ebullició s'ha aturat, incorporarà les aromes a la cervesa. Normalment, s'aprofita aquesta fase en què el most ja no bull per afegir altres additius que proporcionin diferents aromes i personalitats a la beguda.



Imatge 18. Calderes.

Addició d'additius

Particularment, els èsters, són uns compostos que d'entre altres coses poden presentar unes propietats organolèptiques molt particulars. Alguns d'ells tenen unes aromes que recorden a aliments i per tant s'usen per a crear additius i aromes artificials gràcies als quals podem obtenir cerveses molt diverses. Però el més interessant és que aquests compostos es poden obtenir mitjançant l'esterificació, una reacció bioquímica en què es forma un èster a partir d'un àcid carboxílic i un alcohol. De manera que en el procés de fermentació de la cervesa, a mida que anem obtenint alcohol, es poden formar èsters de manera natural i aquests aportaran aromes a la cervesa.

7.4.6. Clarificació

Quan el most ha estat bullit i aromatitzat és precís realitzar un pas per tal de separar del most les partícules no desitjades, com ara algunes proteïnes que hagin pogut coagular amb la temperatura o els components insolubles del llúpul. Aquest pas s'anomena clarificació. Generalment es duu a terme mitjançant unes màquines que fan girar la barreja per crear un remolí que arrossega les partícules que abans hem esmentat cap al centre i cap a baix del tanc. D'aquesta manera, serà molt fàcil poder-les separar de la resta. A la fàbrica de la Moritz, que vam tenir el luxe de visitar, utilitzaven unes màquines anomenades Whirlpool per a aquest procés. Eren una mena de centrífugues.

7.4.7.Refrigeració del most

Ens aproximem a una de les fases sense la qual la nostra beguda mai arribaria a ser cervesa, la fermentació. Però per poder començar-la en unes bones condicions, s'han de fer tota una sèrie de preparacions. El primer que s'ha de fer és refredar el most fins a una temperatura que depèn de la soca i la varietat del llevat que s'usarà després. Recordem que s'acaba de realitzar l'ebullició i el most es troba a una temperatura que podria ser desfavorable per als llevats que faran la fermentació. Aquest refredament es fa mitjançant un mecanisme en el qual entren en contacte el most i l'aigua glicolada. Cal tenir en compte que aquests dos líquids mai entraran en contacte directe, ja que espatllaríem la cervesa. Simplement estan separats per una mena de membrana a través de la qual té lloc l'intercanvi tèrmic. Una pregunta que us deu estar fent és: Perquè aigua glicolada en comptes d'aigua normal? La resposta és fàcil. L'aigua glicolada no és més que aigua barrejada amb glicol, un compost orgànic molt usat en la indústria com a anticongelant i refrigerador. La qüestió és que el glicol fa descendir un parell de graus el punt de fusió de l'aigua. Això permet tenir aigua líquida a -2 o -3 °C i per tant, el most es refreda més ràpid.

7.4.8.Oxigenació

A continuació, es fa un control del volum i la densitat del most, ja que s'ha perdut aigua durant l'ebullició i és necessari tenir aquests paràmetres controlats. Després es procedeix a fer l'oxigenació del most. Aquesta etapa és molt important i consisteix en introduir oxigen a la barreja, ja sigui mitjançant maquinària industrial o agitant la barreja (més artesanal). Potser a simple vista sembla una fase absurda, ja que en teoria la fermentació alcohòlica és un procés anaeròbic, però just abans de la fermentació per anaerobiosi, té lloc una fase en la qual el llevat necessita O_2 (oxigen) per poder créixer i propagar-se. Si no fos així, el rendiment de la fermentació seria ínfim.

7.4.9.Fermentació

Per fi arribem al moment esperat. Tot rutlla i ens disposem a iniciar la fermentació. Com bé sabem, en aquesta fase, el llevat *Saccharomyces cerevisiae* consumeix els sucres de l'ordi que estan dissolts al most (glucosa principalment) i produeix etanol i CO_2 com a productes d'un procés anomenat

fermentació alcohòlica. En el següent apartat del treball entendrem de manera precisa com succeeix aquesta fermentació estudiant la bioquímica dels processos, però ara per ara prosseguirem amb l'elaboració de la cervesa.

S'introdueix el most a l'interior del tanc de fermentació i s'afegeixen uns 5 g de llevat per cada 25 L de most, tot i que a l'hora de la veritat, cada cervesa requereix unes proporcions determinades en les quals s'ha de tenir en compte la densitat del most, el tipus de llevat... Com s'ha comentat anteriorment, en primer lloc, els llevats consumeixen l'oxigen que hem transmès a la barreja i l'utilitzen per realitzar les seves funcions metabòliques habituals, per créixer, per propagar-se i per sintetitzar les estructures que necessiten per fer-ho. Fins aquí el procés és aeròbic. Tot seguit, quan ja s'ha consumit l'oxigen, comença el procés anaeròbic i la fermentació pròpiament dita. En aquest punt es troben diferències entre les cerveses de tipus Ale i les de tipus Lager. Les cerveses Ale o d'alta fermentació realitzen la fermentació dins d'un marge de temperatures elevades que oscil·len al voltant dels 20°C. Un senyal que indicarà que el procés s'està duent a terme és que es forma una capa d'escuma a dalt de tot al cap d'unes hores. A les Ale, els llevats es col·loquen a dalt del most (just a sota de l'escuma) i actuen durant uns 6 dies consumint els sucres i produint etanol i diòxid de carboni. Quan ha transcorregut aquest temps i els llevats aturen la seva activitat, precipiten al fons del tanc. Aquestes cerveses són més afruitades perquè el llevat no consumeix la totalitat dels sucres del most.

En canvi, les cerveses Lager o de baixa fermentació, com el seu nom indica, realitzen la fermentació a unes temperatures relativament baixes, uns deu graus per sota de les Ale. A més, els llevats es col·loquen de bon principi al fons del tanc i actuen durant un període de temps més llarg (10 dies o més). Això fa que es consumeixin pràcticament tots els sucres i, per tant, que la cervesa obtinguda sigui una mica més seca. Després de la fermentació, aquest tipus de cerveses requereixen una fase de guarda o repòs en què es deixa madurar la cervesa a unes temperatures que poden acostar-se als 0°C i en la qual es pot dur a terme una segona fermentació afegint una mica de most. Aquesta fase pot durar mesos i és força important perquè les condicions de maduració afectaran notablement al producte final. Com podem comprovar, la

cervesa de tipus Lager requereix un control molt exhaustiu de factors com ara la temperatura o la pressió.

En aquest procés que acabem de veure, hi ha una diferència molt gran entre la indústria cervesera i l'artesana. El primer que cal tenir en compte, és que durant la fermentació es produeix molt més CO_2 del que es necessita, per tant, la diferència anirà per aquí. Les grans indústries disposen de màquines i infraestructures per controlar les concentracions de CO_2 de la cervesa. De manera que poden mantenir el CO_2 que desitgin a l'interior del tanc o poden decidir deixar-lo escapar tot i afegir-lo després. En canvi, els artesans de la cervesa, en no tenir aquestes màquines a la seva disposició, usen uns mecanismes en els quals es perd tot el CO_2 que s'ha produït. I és per això, que quan embotellen les cerveses, afegeixen una quantitat molt petita de sucre a cada ampolla. Aquest es dissoldrà al most i els llevats que hagin quedat en suspensió s'encarregaran de fer l'anomenada fermentació secundària. Aquesta fermentació a petita escala produirà el CO_2 desitjat i romandrà a l'interior de l'ampolla. En la producció artesanal, la segona fermentació és fonamental, ja que la cervesa sense CO_2 perd propietats i resulta força dolenta.



Imatge 19. Procés de fermentació de la cervesa.

7.4.10. Filtratge final i embotellament

Arribats en aquest punt la cervesa està feta. Tot i així, no podem donar el procés per acabat fins que no s'hagi embotellat i envasat. Però ara arriba un dels grans debats del món cerveser. Just abans d'embotellar, la cervesa torna a tenir determinades partícules que han quedat en suspensió durant la fermentació. Són unes molècules que donen cos i sabors a la cervesa i per

això, la majoria d'artesans decideixen conservar-les. Però per altra banda, la indústria cervesera aposta per una cervesa d'aspecte més clar i amb un cos més lleuger i per tant realitzen una clarificació o filtratge final.

Finalment, només fa falta esterilitzar els envasos que s'utilitzaran i fer l'embotellament tenint en compte si interessa realitzar la fermentació secundària en ampolla o no.

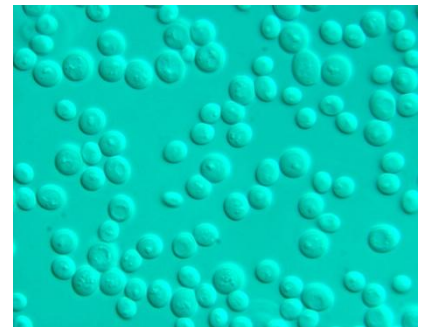


Imatge 20. Embotelladora.

7.5.Saccharomyces Cerevisiae

L'objectiu d'aquest treball és estudiar la fermentació alcohòlica en aquest llevat a causa de les implicacions que té en la cultura humana. Tanmateix, aquest procés no és quelcom aïllat i que ocorre simplement pel benefici humà, sinó que pertany a un conjunt de reaccions químiques de gran importància pels éssers vius. Per aquesta raó, considerem que no es pot entendre sense abans haver comprès el paper que juga en els éssers vius i els passos previs que porten a ell.

Per tant, abans d'arribar a la fermentació parlarem de les reaccions químiques que ocorren als éssers vius i les seves relacions; la qual cosa ens portarà de manera natural a la glicòlisi, el pas previ a la fermentació. Finalment, ens centrarem sobre el tema del document i mencionarem les seves particularitats en el llevat treballat.



Imatge 21. Saccharomyces cerevisiae

7.5.1.Nutrició

El *S. cerevisiae* és un organisme heteròtrof, és a dir, que no obté la seva matèria i energia a partir de matèria inorgànica sinó que necessita ingerir matèria orgànica per tal de fabricar les molècules que el formen i produir l'energia que el permet realitzar les seves funcions vitals.

Aquest organisme utilitza com a fonts de carboni, els monosacàrids, els disacàrids amb l'excepció de la lactosa, alguns aminoàcids i, fins i tot, l'etanol. La capacitat d'aprofitar l'etanol li proporciona uns avantatges importants respecte a altres organismes competidors que seran explicats més endavant.

El llevat no té la capacitat de fixar el nitrogen present a l'atmosfera, sinó que l'obté a partir d'altres compostos. Les fonts de nitrogen principals d'aquest organisme són la urea, l'amoni i els aminoàcids. A banda dels elements anteriors, aquest fong també necessita fòsfor, vitamines i oligoelements.

7.5.3.Fermentació alcohòlica

Quan parlem de la fermentació de la cervesa en general, diem que la glucosa present al most és convertida en etanol i CO₂ mitjançant l'acció dels llevats. Aquesta afirmació és totalment correcta, però cal tenir en compte que la transformació de la glucosa en els productes finals no és directa sinó que es va transformant en diferents productes seguint una cadena de reaccions que culminarà en l'obtenció dels productes esmentats. En primer lloc, la glucosa serà convertida en un àcid anomenat piruvat com a conseqüència d'un conjunt de 10 reaccions que s'anomena glicòlisi. Posteriorment, el piruvat serà sotmès també a un seguit de reaccions a partir de les quals obtindrem l'etanol i el CO₂.

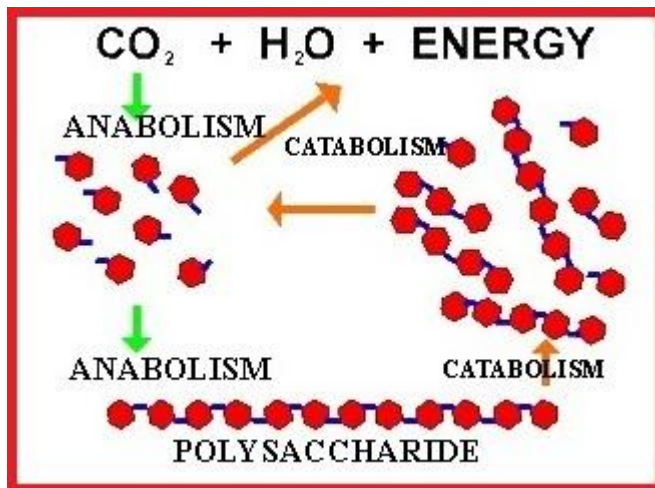
Metabolisme

Per desenvolupar totes i cadascuna de la immensa quantitat de tasques que són rutinàriament dutes a terme pels éssers vius, un seguit de reaccions químiques han de tenir lloc en el seu interior. A més, aquestes no poden ocórrer sense cap mena d'ordre, sinó que han de seguir estrictament una estructura que aconsegueixi realitzar satisfactòriament el seu propòsit. Al conjunt de totes les reaccions químiques controlades i regulades que succeeixen dintre dels organismes animats se'l coneix com a metabolisme i a cadascun dels seguits de reaccions químiques que a compleixen un objectiu concret, com a rutes metabòliques.

Segons la funció que desenvolupa cada ruta en l'ésser, la podem classificar dintre del metabolisme catabòlic o anabòlic. Al primer hi pertanyen aquelles que transformen molècules grans en altres de més petites i al segon, les que fan el camí contrari. Des d'un punt de vista termodinàmic, les reaccions catabòliques alliberen energia, els productes són menys energètics que els reactius; en canvi les anabòliques en requereixen i els reactius tenen menys energia que els productes.

En un organisme, els dos tipus de reaccions s'han de produir: la cèl·lula necessita una gran varietat d'elements per desenvolupar les tasques que li permeten viure. Energèticament, les reaccions catabòliques no presenten cap problema; tanmateix, les anabòliques sí. En aquest tipus de reaccions, els productes són més complexos que els reactius, així que és necessari un

aportament energètic. Per aquest motiu, les reaccions anabòliques estan aparellades amb altres de catabòliques que els proporcionen l'energia que necessiten. Per realitzar aquest transvasament o transport d'energia entre reaccions, les cèl·lules utilitzen certes molècules fosfatades, la hidròlisi de les quals es relaciona amb reaccions anabòliques i la formació, amb catabòliques.



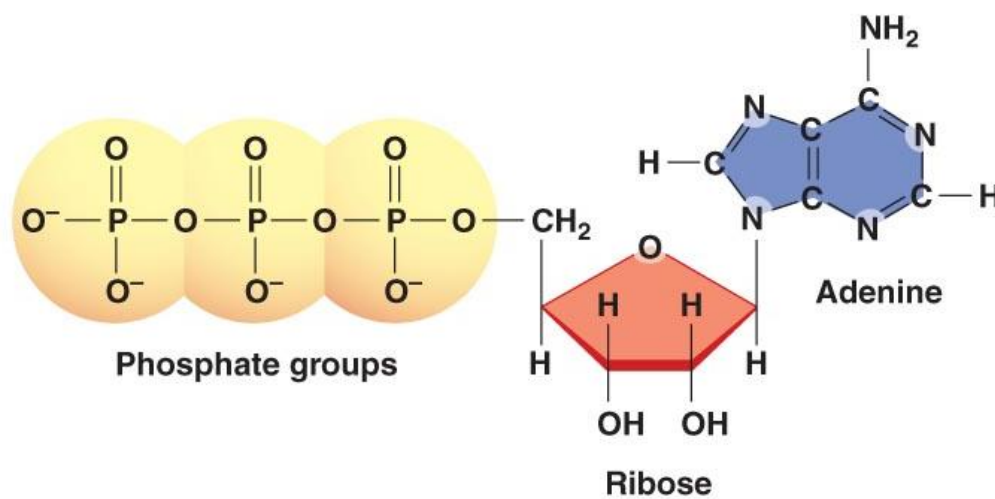
ATP: la moneda energètica comú de la cèl·lula

En la immensa majoria de les cèl·lules, la molècula responsable de transportar energia entre reaccions és l'adenosina trifosfat (ATP). En menor quantitat també desenvolupen aquesta funció altres molècules com la GTP i la fosfocreatina (CP), encara que la seva presència en les reaccions no és ni de bon tros tan important com la de la molècula anterior.

L'ATP és adient per aquest paper a causa de la presència en la molècula de dos enllaços fosfoanhidre, és a dir, entre fosfats. Aquest tipus d'enllaç allibera una gran quantitat d'energia quan és trencat, de fet, per cada mol d'ATP hidrolitzat la cèl·lula aconsegueix 7.3kcal. Els motius de l'alta energia implicada en el trencament de l'enllaç són tres. Primer, els fosfats són grups amb una elevada càrrega elèctrica; per aquest motiu existeix una repulsió important entre ells. Segon, els productes de la hidròlisi són més solubles i tenen més possibles estats que els reactius; en altres paraules, l'entropia és més alta, motiu pel qual la reacció és termodinàmicament afavorida. Per últim, el parell d'electrons formalment representat com a doble enllaç entre el fòsfor i l'oxigen està en realitat deslocalitzat entre els quatre oxígens del fosfat, és a dir, els oxígens comparteixen un parell d'electrons formant una estructura

anomenada híbrid de ressonància, cosa que contribueix a estabilitzar l'ió. Tanmateix, aquest parell d'electrons només són compartits pels oxígens que no estan enllaçats amb cap altre àtom. Aquest efecte rep el nom d'estabilització per ressonància i juga un paper important en l'estabilització dels ions.

A la cèl·lula, les molècules d'ATP estan normalment unides a un ió magnesi, Mg^{2+} , formant un complex anomenat Mg-ATP. El catió atreu els electrons dels oxígens, augmentant l'afinitat del fòsfor per electrons i així permetent-lo interactuar amb àtoms amb càrrega negativa, com per exemple l'oxigen, presents al substrat.



Imatge 25. Molècula d'ATP.

Glicòlisi

Com ja ha estat explicat prèviament, l'acoblament de reaccions exotèrmiques amb aquelles que requereixen aportament energètic és vital per a la producció de part dels elements necessaris per a la vida cel·lular. Aquest aparellament requereix de la participació de molècules com l'ATP, GTP i altres; la síntesi de les quals es realitza aprofitant l'energia alliberada en algunes reaccions catabòliques i la hidròlisi de les quals es lliga a les reaccions endotèrmiques (la hidròlisi de l'ATP aporta l'energia que requereix la reacció).

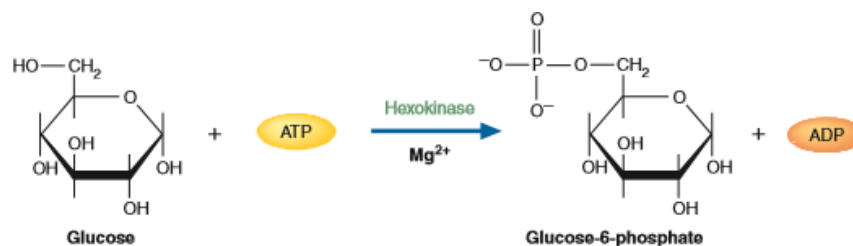
D'entre totes les reaccions que s'utilitzen per a la producció d'ATP, la ruta metabòlica més comuna és la glicòlisi. Efectivament, la glicòlisi, també anomenada ruta d'Embden-Meyerhof-Parnas en honor als seus descobridors,

és present en tots els organismes de la Terra. A més, el conjunt d'enzims i reaccions involucrats en el procés ha estat conservat entre els diferents éssers vius, és a dir, els passos i les molècules implicades en aquesta via són compartits per tots els éssers; procariotes i eucariotes, grans o petits, marins o terrestres, que algun cop han format part de l'ecosistema Terra. Per aquest motiu es creu que va ser una de les primeres vies metabòliques en aparèixer als éssers vius.

El terme glicòlisi, del grec *glyco*, sucre, i *lysi*, trencament, és el nom que rep el procés pel qual les molècules de sucre són trencades en altres de més petites. És, per tant, una ruta metabòlica catabòlica. Més concretament, la glicòlisi és un seguit de 10 reaccions mitjançant les quals un monosacàrid, normalment glucosa o fructosa, és convertit en dues molècules de piruvat. Durant el procés, la cèl·lula guanya dues molècules d'ATP i dues de NADH.

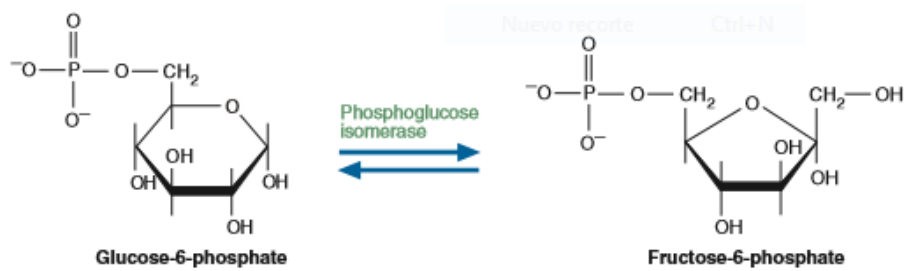
Les reaccions que ocorren estan descrites a continuació:

1. Quan la glucosa entra al citoplasma cel·lular és fosforitzada per un enzim del grup de les hexoquinases, de manera que obtenim una glucosa-6-fosfat. La reacció ocorre immediatament perquè aquests enzims presenten una alta afinitat a la glucosa. La fosforització impedeix que la molècula sigui retornada al medi extracel·lular a través de les proteïnes de transport de glucosa de la membrana. A més, l'addició del fosfat incrementa la reactivitat de la molècula.

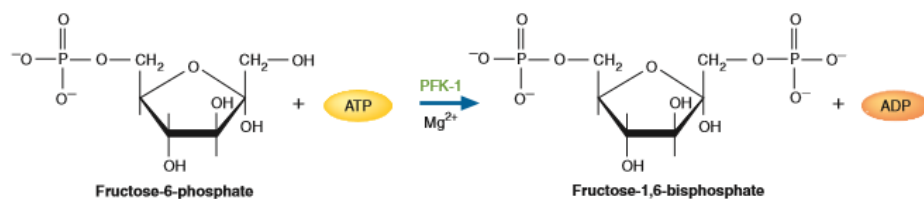


2. A continuació, la glucosa-6-fosfat és transformada en fructosa-6-fosfat per l'enzim PGI (fosfo-glucosa isomerasa). Aquesta reacció facilita la fosforització del carboni-1 de la nova molècula, ja que els hemiacetals, forma

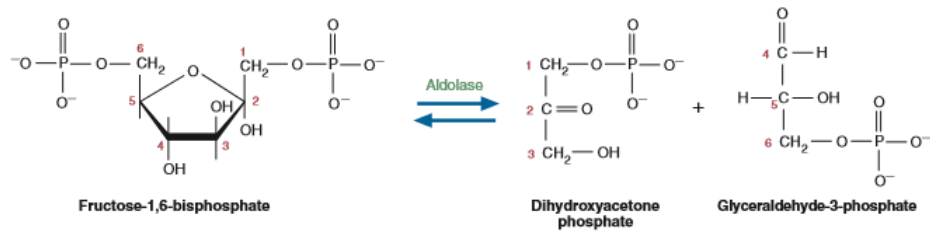
en què es trobava anteriorment, són més difícils de fosforitzar.



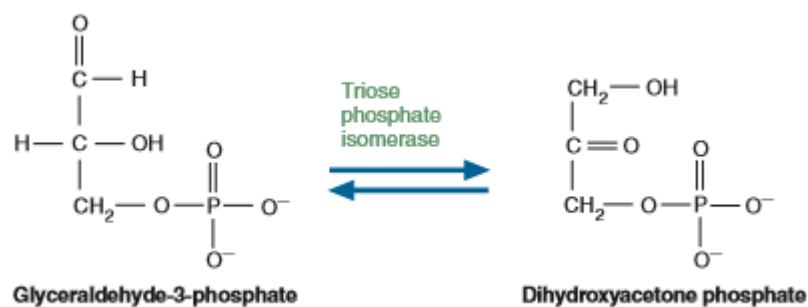
3. Consisteix en la fosforització de la glucosa per l'enzim PFK-1 (fosfofructo-kinasa-1). S'obté fructosa-1,6-bifosfatada (el nom de la molècula és degut a que la fructosa presenta dos fosfats, un lligat al carboni 1 i l'altre al carboni 6). Com que aquesta reacció és irreversible i el producte no es pot dirigir cap a cap altra ruta metabòlica, aquest pas es considera el primer de la glicòlisi i s'utilitza com a punt de control: altes concentracions d'ATP o de NADH inhibeixen l'acció de l'enzim, disminuint la velocitat de reacció; l'efecte contrari és produït per l'elevada presència d'AMP o d'ADP, els productes de la hidròlisi de l'ATP. L'addició d'un altre grup fosfat al sucre i, per tant, el consum d'una segona molècula d'ATP, té també la funció d'impedir la sortida de la cèl·lula de les dues trioses en què es partirà a continuació la fructosa al dotar-les de càrrega. Això és degut a que les molècules carregades tenen dificultats per travessar la membrana cel·lular.



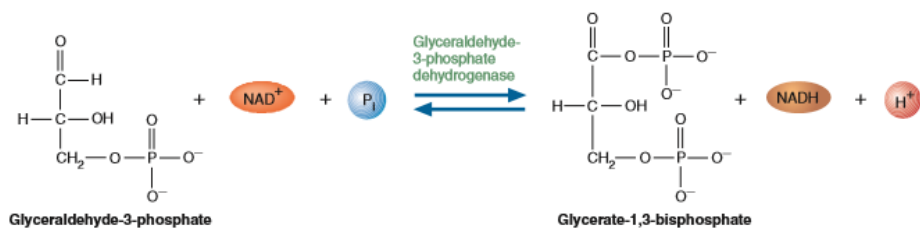
4. La totalitat de reaccions que formen la glicòlisi s'agrupen en dues grans fases. La primera fase finalitza aquí, amb l'escissió de la fructosa en dues trioses (sucre de tres carbonis) catalitzada per un enzim de tipus Aldolasa. Aquest tipus de reacció s'anomena en anglès "**aldol cleavage**", que implica una separació de carbonis. D'aquesta manera, el nom de l'enzim (**Aldolasa**) revela la seva funció. Aquestes trioses obtingudes no són iguals, una és gliceraldehid-3-fosfat o G3P, en canvi, l'altra és una dihidroxiacetona-fosfat o DHAP.



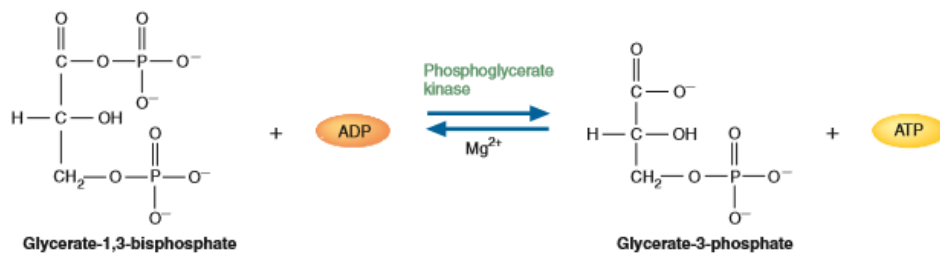
5. Amb aquest pas s'inicia la segona fase de la glicòlisi. Dels productes de la reacció anterior només el gliceraldehid-3-fosfat(G3P) serveix com a substrat pel següent pas de la glicòlisi. Per evitar desaprofitar l'altra triosa, la DHAP és transformada en G3P per l'enzim triosa fosfat isomerasa.



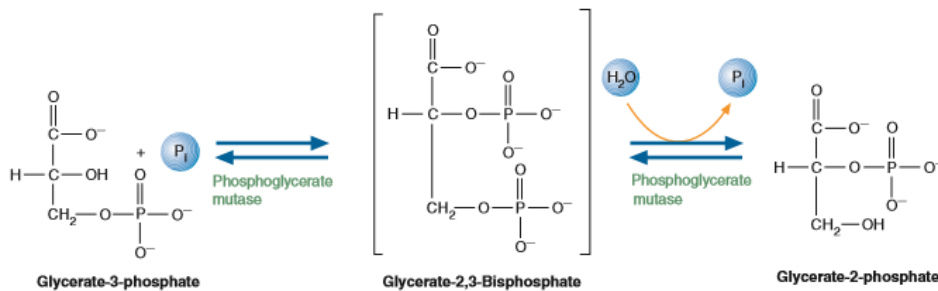
6. Aquest pas consisteix amb l'oxidació i la fosforització del G3P. Aquesta reacció està catalitzada per l'enzim G3P-dehidrogenasa, una molècula formada per quatre subunitats. Cadascuna d'elles té un lloc d'enllaç per un G3P i un NAD⁺, un agent oxidant. Primer, el G3P reacciona i s'enllaça amb el sofre d'una cisteïna covalentment. L'enzim provoca, llavors, la transferència d'un ió hidrur del substrat al NAD⁺, el qual es redueix a NADH. L'enllaç format entre la molècula oxidada i l'enzim té una elevada energia d'hidròlisi. Finalment, un grup fosfat trenca l'enllaç mencionat i en forma un de nou amb el carboni, el qual conserva gran part de l'energia anterior. La molècula formada s'anomena glicerat 1-3 bifosfat(BGP).



7.El BGP conté un grup fosfat amb alt potencial de transferència, el qual és transferit a un ADP per l'enzim PGK (fosfoglicerat quinasa) tot formant una molècula d'ATP. Com que per cada molècula de glucosa es formen dos BGP, en aquesta reacció es formen dos molècules d'ATP i per tant, recuperem els ATP invertits en els passos anteriors. El producte d'aquesta reacció, el glicerat-3-fosfat té un baix potencial de transferència de fosfat i, per tant, no és adient per a la formació de més molècules d'ATP.

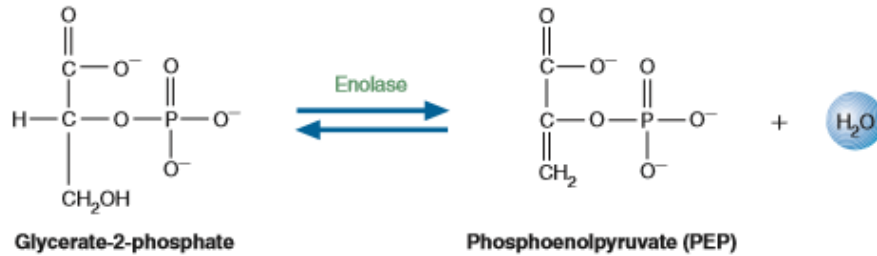


8.En aquest pas, el glicerat-3-fosfat és transformat en una altra molècula amb un potencial molt més alt de transferència de fosfats, el glicerat-2-fosfat. Aquesta transformació és catalitzada per l'enzim PGM (fosfoglicerat mutasa). En aquesta reacció, simplement es passa de tenir un fosfat al carboni 3 de la molècula a tenir-ne un al carboni 2. Aquest canvi es fa mitjançant un cicle d'addició/eliminació que consisteix en el següent: primer, un grup fosfat és unit al carboni 2 del compost i després el fosfat del carboni 3 és desenllaçat.

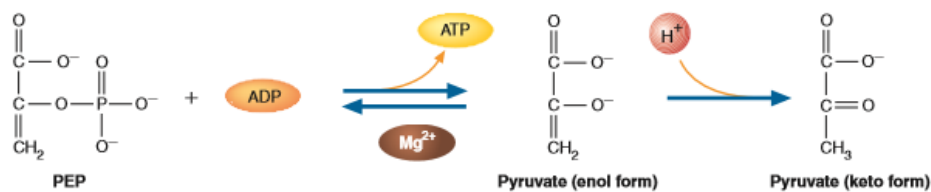


9.El glicerat-2-fosfat és deshidratat per l'enzim enolasa, cosa que el converteix en fosfoenolpiruvat o PEP. Aquesta molècula té un potencial més alt de transferència de fosfats perquè conté un fosfat-enol, estructura formada per un enllaç doble entre dos carbonis. La forma enol d'una molècula i la ceto (carboni enllaçat per un enllaç doble amb un oxigen) coexisteixen en un equilibri inclinat cap a la forma ceto, per aquest motiu hi ha una tendència de conversió de forma a enol a ceto en un procés conegut com a tautomerització.

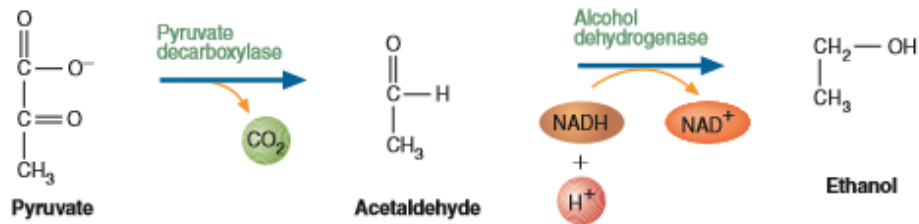
La presència d'un grup fosfat dificulta la transformació de la forma enol a la ceto. Per aquest motiu, la transferència d'aquest grup fosfat a un ADP en la següent reacció es veu afavorida.



10.Finalment, l'enzim piruvat quinasa transfereix el grup fosfat del PEP a un ADP, formant ATP. Com que per cada molècula de glucosa s'acaben obtenint dues molècules de PEP, en aquest pas es produeixen dos ATP. Amb la formació del piruvat la glicòlisi finalitza i comença la següent via metabòlica: la fermentació en absència d'oxigen o la respiració cel·lular en presència d'oxigen. Durant aquest procés, la cèl·lula ha recuperat les dues molècules d'ATP que havia invertit i ha guanyat dues molècules més d'ATP. A més, també s'han format dues molècules de NADH., les quals s'utilitzen per obtenir energia en la respiració cel·lular.



En la fermentació alcohòlica, el piruvat és descarboxilat (pèrdua d'un grup carboxil en forma de **CO₂**) i convertit en acetaldehid per l'enzim piruvat descarboxilasa. A continuació, l'acetaldehid és transformat en **etanol** (alcohol) per l'enzim alcohol deshidrogenasa 1. Aquesta reacció es basa en la reducció de l'acetaldehid. Com a conseqüència s'oxida el NADH i s'aconsegueix produir NAD⁺, el qual és necessari per realitzar el pas 6 de la glicòlisi. Un cop finalitzat aquest procés, ja s'ha obtingut l'alcohol i el CO₂ desitjats com a objectiu de la fermentació de la cervesa.



La fermentació al S. cerevisiae

Saccharomyces Cerevisiae és un organisme anaeròbic facultatiu, és a dir, pot obtenir energia mitjançant la respiració cel·lular, en presència d'oxigen, i també pot dur a terme la fermentació. En la gran majoria de fermentadors, la presència d'oxigen reprimeix la glucòlisi i la fermentació, fenomen conegut com a efecte Pasteur. No obstant, aquest llevat és capaç de realitzar la fermentació en presència d'aquest element.

Les diferències entre aquest llevat i la resta no acaben aquí: quan la quantitat de glucosa és elevada, independentment de la presència d'oxigen; es produeixen uns canvis en la seva expressió gènica (afavoriment del transport de glucosa cap a les cèl·lules, augment dels enzims implicats en la glucòlisi i disminució dels que ho estan en la respiració aeròbia) que resulten en la ràpida producció de piruvat i en l'afavoriment de la conversió d'aquest en etanol en detriment del seu ús en la respiració cel·lular. A primera vista, aquest canvi pot semblar ineficient en termes energètics, cal recordar que la quantitat d'energia obtinguda per molècula de glucosa durant la fermentació, 2 ATP, és molt menor a la de la respiració, 30 ATP. No obstant, la ràpida conversió de la glucosa en etanol, una molècula tòxica per una gran multitud d'organismes, i el seu posterior abocament al medi elimina gran part de la competència del *S. cerevisiae*. Aquest fenomen, pel qual la presència elevada de glucosa en el medi condueix a la repressió del metabolisme aeròbic, es coneix com a efecte Crabtree, en honor al seu descobridor.

L'efectiva estratègia competitiva del *S. cerevisiae* també li permet reaprofitar l'etanol produït: quan la glucosa és esgotada, els canvis produïts per la seva alta concentració són revertits i l'enzim responsable de la transformació

de l'etanol en acetaldehid, l'alcohol deshidrogenasa II, és sintetitzat. L'etanol és, per tant, reconvertit en acetaldehid, el qual és utilitzat posteriorment en la respiració cel·lular.

El peculiar metabolisme del llevat és tingut en compte pels humans en el seu ús per a la fabricació de begudes alcohòliques. Al principi, el fong és cultivat en presència d'oxigen per afavorir la seva reproducció, ja que l'oxigen facilita reaccions cel·lulars implicades en la divisió cel·lular del llevat. A més, la presència d'oxigen dificulta que apareguin organismes competidors per l'efecte Pasteur. Quan tot l'oxigen ha estat esgotat, l'organisme segueix produint etanol. Eventualment, la glucosa és totalment consumida i la fermentació acaba. El fet de realitzar el procés en un recipient que no deixi entrar l'oxigen és crucial perquè impedeix a *S. cerevisiae* efectuar els canvis descrits en el paràgraf anterior i que causarien la desaparició de l'etanol.

7.6.Tècniques de determinació de concentracions

7.6.1.Tècniques experimentals

En un dels experiments de la part pràctica del treball es determina la concentració de glucosa a partir de la radiació absorbida per una substància, el NADPH. Aquesta substància apareix com a producte d'un seguit de reaccions químiques en les quals intervé la glucosa com a reactiu inicial. Per tant, la concentració d'aquest producte està relacionada directament amb la de glucosa i és per això que ens servirà per a fer la mesura. Aquest procediment forma part d'una tècnica anomenada recta patró, però abans d'endinsar-nos en l'explicació explícita de la tècnica es fa necessari comentar els seus fonaments, que són l'espectrofotometria, el funcionament d'unes màquines anomenades espectrofotòmetres i finalment la llei de Lambert-Beer.

7.6.2.Espectrofotometria

Les molècules poden absorbir energia lluminosa i emmagatzemar-la en forma d'energia interna. Des d'un punt de vista físic, quan una radiació electromagnètica incideix sobre una molècula, part de l'energia d'aquesta radiació és absorbida pels electrons de la molècula i consegüentment, aquests puguen a nivells energètics superiors. Tanmateix, els electrons no poden absorbir qualsevol fotó. Com que l'energia es conserva, només es produirà absorció quan l'energia dels fotons sigui suficient per arribar a un nivell energètic superior. Aquest fet provoca que les substàncies absorbeixin determinats tipus de radiació electromagnètica i determinades longituds d'ona, i no d'altres.

La capacitat de les diferents substàncies per absorbir algunes longituds d'ona concretes es pot utilitzar per determinar i quantificar la seva presència en una mescla. Així doncs, l'espectrofotometria és el camp que engloba les tècniques que utilitzen la quantitat d'energia lluminosa d'una longitud d'ona concreta absorbida per un sistema químic amb l'objectiu de determinar la concentració d'una substància present en aquest mateix sistema.

Espectrofotòmetre

En els seus orígens, el mètode utilitzat per determinar la quantitat de radiació absorbida per una substància era merament apreciatiu. L'experimentador obtenia les dades en base a allò que els seus ulls percebien. Òbviament, aquesta tècnica no era gens exacta i, amb el progrés de la tecnologia, es van inventar uns aparells que realitzaven amb més exactitud la mateixa funció: els espectrofotòmetres.

Un espectrofotòmetre és un instrument que té la capacitat de mesurar la diferència entre les energies entrant i sortint d'un feix de llum monocromàtica d'una longitud d'ona determinada. De manera general, està compost per cinc parts: la font de llum, el monocromador, el compartiment de les mostres, les cubetes i els detectors.

La font de llum que s'utilitza normalment són làmpades de tungstè i de xenó. L'elecció d'aquestes correspon al fet que s'esgoten lentament i emeten llum en un espectre continu, cosa que permet anar variant la longitud d'ona a què se sotmet la mostra.

El monocromador és un dispositiu òptic que permet seleccionar i transmetre una franja concreta de longituds d'ona a partir d'una radiació d'espectre continu incident.

Les mostres es troben a dins de cubetes, uns recipients de mides i volum determinats i que estan fets amb un material transparent a la longitud d'ona amb què s'està treballant. Acostumen a ser de plàstic o vidre quan es treballa amb llum visible, de clorur de sodi quan la radiació és infraroja i de quars quan és ultraviolada. Les cubetes contenen les mostres que s'estan mesurant.

El detector és un aparell que té la capacitat de determinar la intensitat de llum que hi incideix.

Quan s'utilitza l'aparell, la font de llum emet radiació, la qual és filtrada pel monocromador i passa al compartiment de les mostres. Allà travessa la mostra i és en part absorbida per aquesta. Seguidament arriba al detector i en mesura la intensitat. Finalment, els valors són processats per la màquina i les dades que arriben a l'observador són els valors d'absorbància que corresponen a la llum absorbida per les mostres.



Imatge 26. Espectrofotòmetre.

7.6.3.Llei de Lambert-Beer

Com s'acaba d'explicar, quan un feix de llum monocromàtica es propaga a través d'una substància, interactua i és absorbida per les seves partícules. Això causa que aquesta llum perdi intensitat. D'aquesta manera, ens podem adonar que la pèrdua d'intensitat ha d'estar relacionada amb la concentració de la substància que absorbeix la llum. Quanta més matèria hi hagi, més interaccions tindrà la radiació i més llum serà absorbida per la substància. Així doncs, quan es passa una substància per un espectrofotòmetre, com més alt sigui el valor d'absorbància obtingut, més alta serà la concentració de la substància estudiada.

La llei de Lambert-Beer és l'expressió matemàtica que explica el fet anterior:

$A=c \cdot l \cdot \epsilon$, on A és l'absorbància (logaritme decimal de la relació entre les intensitats entrant i sortint), c és la concentració de la substància en mol/L, l és la distància que ha de recórrer la llum i ϵ és l'absortivitat de la substància en qüestió (valor que depèn de cada substància).

Si ens fixem bé, per a una substància i una distància fixes, l'absortivitat només depèn de la concentració de la mateixa substància. Així, podem reescriure la llei anterior com a $A=m \cdot c$, on c és la concentració i m el producte de l i ϵ . Com es pot observar, l'expressió anterior correspon a la d'una recta ($y=mx+n$) que passa per l'origen de coordenades ($n=0$) i amb pendent m .

Gràcies a aquesta llei hem obtingut una expressió que ens permet mesurar la concentració d'una substància a partir de la seva absorbància. Aquesta expressió ens servirà en últim terme per calcular la quantitat de glucosa consumida pel llevat i, en conseqüència, la seva velocitat de fermentació mitjançant una tècnica explicada més endavant, la recta patró.

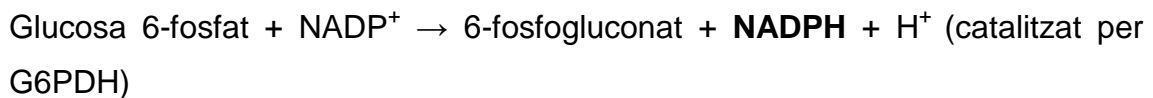
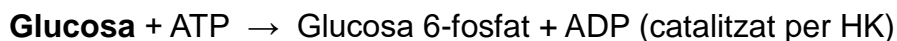
La recta patró

El fet que l'absorbància d'una substància per una longitud d'ona concreta sigui proporcional a la concentració de la mateixa ens permet fer ús d'un mètode que simplifica molt la mesura de concentracions: la recta patró.

Una recta patró o de calibratge és una tècnica que utilitza la relació lineal entre un parell de magnituds per, a partir d'una recta traçada en funció d'uns valors coneguts, calcular-ne uns de desconeguts d'una d'aquestes magnituds. Aquesta tècnica està fonamentada en la recentment explicada llei de Lambert Beer.

En el nostre experiment, les magnituds relacionades són l'absorbància i la concentració d'una molècula anomenada NADPH. Tot seguit s'explicarà el per què de l'ús d'aquesta molècula, però el primer que cal entendre és que aquestes dues magnituds (absorbància i concentració de NADPH) es relacionen en una recta de calibratge que ens servirà per conèixer els valors de les concentracions de NADPH de diferents mostres a partir dels valors de les absorbàncies d'aquestes mostres que hem obtingut prèviament amb un espectrofotòmetre.

Es parteix d'un conjunt de mostres de glucosa de concentració desconeguda i que es vol mesurar. Per fer-ho, es transforma la glucosa present en aquestes mostres en NADPH mitjançant un conjunt de reaccions químiques exposades a continuació:



on HK: hexoquinasa i G6PDH: glucosa 6-fosfat deshidrogenasa.

En la primera reacció l'hexoquinasa transforma la glucosa present en la mostra en glucosa 6-fosfat mitjançant l'ús d'una molècula d'ATP. En altres paraules, l'enzim hidrolitza l'ATP obtenint ADP i un fosfat inorgànic i incorpora aquest fosfat al carboni 6 de la molècula de glucosa.

En la segona reacció es produeix una oxidació en la qual el grup aldehid de la glucosa 6-fosfat s'oxida a àcid carboxílic.

Aquestes reaccions en cadena s'utilitzen perquè el NADPH que obtenim com a producte és una molècula que presenta unes propietats úniques que no tenen cap dels altres productes que participen en la reacció. Aquestes propietats són que el NADPH té una absorció específica de llum a una longitud d'ona de 340 nm. D'aquesta manera, si amb un espectrofotòmetre fem incidir un raig de llum a 340 nm de longitud d'ona sobre la mostra que conté el NADPH que hem obtingut, el seu valor d'absorbància ens indicarà indirectament quina és la concentració de glucosa de la mostra original. Si ens fixem en el balanç global de les reaccions, per a cada molècula de glucosa obtenim una molècula de NADPH. Així doncs, la concentració de NADPH és proporcional a la de glucosa, i és per això que aquesta tècnica ens permet mesurar la concentració de glucosa a partir de la concentració de NADPH. Com més gran sigui la concentració de glucosa en la mostra, es formarà més NADPH i el valor d'absorbància mesurat amb l'espectrofotòmetre serà més alt. Però per poder elaborar la recta de calibratge que permet realitzar tot el que s'ha dit, s'han de preparar unes mostres anomenades estàndards. Els estàndards són mostres de glucosa diluïdes amb aigua destil·lada a diferents concentracions conegudes. Un cop preparades, se sotmeten a les reaccions químiques anteriorment explicades i es mesura la seva absorció amb l'espectrofotòmetre. D'aquesta manera, obtenim una relació directa entre el valor d'absorbància que s'ha mesurat i la concentració de glucosa que coneixem perquè nosaltres hem preparat aquestes mostres a consciència. Per tant, si elaborem un gràfic que relacioni les diferents concentracions de glucosa que hem considerat amb els seus valors d'absorbància obtinguts experimentalment, obtindrem una recta de calibratge a partir de la qual calcularem el factor que relaciona l'absorbància amb la concentració. Aquest factor serà el pendent de la recta.

Finalment, només caldrà passar les mostres de glucosa de concentració desconeguda per l'espectrofotòmetre i col·locar els valors d'absorbància obtinguts a la recta de calibratge per obtenir les concentracions de glucosa d'aquestes mostres.

8.Part experimental

8.1.Protocol i disseny experimental

8.1.1.Introducció

Un cop assolits tots els coneixements necessaris, és hora d'iniciar els experiments que ens permetran donar resposta a les nostres preguntes d'investigació. Recordem que ens preguntàvem quines són les condicions de pH i temperatura que afavoreixen una fermentació més ràpida, com varia el creixement del llevat en funció d'aquestes condicions i, per altra banda, si aquestes condicions que permeten una fermentació més veloç són realment les òptimes per a obtenir un producte de qualitat.

Com bé sabem, la fermentació és un procés llarg, laboriós i a més, és un dels passos més importants en l'elaboració de la cervesa. Però al cap i a la fi, és una reacció química, i com a totes les reaccions químiques, hi ha un conjunt de factors que, en alterar-los, poden accelerar-les o alentir-les. A més, si es té en compte que la fermentació és en el fons un conjunt de reaccions enzimàtiques, s'arriba fàcilment a la conclusió que la temperatura i el pH són dos dels factors que més influencien la seva velocitat. Per aquests motius vam decidir estudiar la fermentació a diferents pHs i temperatures.

A remolc d'aquesta primera pregunta, vam pensar que seria interessant estudiar el creixement dels llevats durant la fermentació. Crèiem que si aquest creixement era major, seria un indicador que el llevat es troba còmode en aquelles condicions i que per tant, acabaria realitzant una fermentació més ràpida.

D'aquesta manera vam arribar a pensar que si aconseguíem optimitzar el temps de fermentació sense alterar el producte final seria un gran avenç pel món cerveser. No obstant això, una fermentació més ràpida no ha de ser necessàriament una fermentació més bona. Per aquest motiu, un cop s'hagi donat resposta a la primera part experimental, conclourem el treball amb l'estudi d'aquesta última pregunta.

8.1.2. Experiment 1

El primer experiment el vam poder realitzar als laboratoris de la facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, la qual cosa va ser molt positiva perquè ens va permetre utilitzar tota una sèrie d'instal·lacions i maquinària de laboratori de la qual no disposem a l'institut i a més, vam guanyar molta experiència de laboratori. Tot i això, cal esmentar que ha estat l'experiment més difícil de tots, ja que hem hagut de dedicar moltes tardes a fer-lo i hem hagut de fer grans esforços per superar les dificultats que se'ns plantejaven.

L'objectiu de l'experiment és, com hem esmentat anteriorment, trobar quines són les condicions de pH i temperatura que afavoreixen una fermentació més ràpida. Un cop vam tenir clar l'objectiu i les variables que estudiaríem (pH i T^a), ens vam posar a fer càlculs de combinatòria per establir quants pHs i temperatures diferents podíem estudiar en funció del temps que teníem. Finalment vam concloure que analitzaríem dues temperatures i dos pHs diferents i els combinaríem. A l'hora d'escollir els valors exactes de les variables vam pensar que no podíem escollir pHs i temperatures molt extrems perquè danyarien les estructures del *Saccharomyces Cerevisiae* i gairebé no es produiria fermentació. D'aquesta manera, vam triar uns valors mitjans però que fossin prou diferents com per observar diferències en el resultat. Aquests valors van ser pHs de 5 i 9, i temperatures de 20° C i 40° C. Si els combinem ens surten 4 preparacions diferents.

Per tal d'obtenir uns resultats clars, vam dissenyar un experiment de les següents característiques: Vam elaborar un caldo de cultiu per als llevats que contenia glucosa i el vam sotmetre a les diferents condicions que havíem establert i que tot just acabem d'esmentar (pH 5 i 9, i T^a 20°C i 40°C). Seguidament vam inocular-hi el llevat, que va començar a fermentar la glucosa, i vam anar extraient mostres al llarg del temps. Finalment només calia mesurar les concentracions finals de glucosa d'aquestes mostres i concloure que la preparació en la qual havia disminuït més la concentració de glucosa al llarg del temps era la que contenia les condicions que acceleren més la fermentació. Com que aquest experiment és molt llarg està dividit en tres parts: preparació del caldo de cultiu, fermentació del caldo i mesura de la concentració de glucosa.

Part 1. Preparació i esterilització del caldo YPD

Material

Per a realitzar aquesta primera part de la pràctica vam necessitar el següent material i els següents productes:

- Balança
- Espàtula
- Embut
- Recipient gran graduat d'uns 2 L de capacitat amb tap
- D(+) - Glucosa anhidra
- Extracte de llevat
- Triptona
- Aigua destil·lada
- Cinta indicadora d'esterilització
- Autoclau

Procediment

Per començar, vam preparar un caldo de cultiu YPD. Un caldo YPD és un tipus de medi de creixement per a llevats que conté glucosa, extracte de llevat i peptona o triptona en unes proporcions estandarditzades. La glucosa és el nutrient principal, que en el nostre cas serà la molècula que fermentarà el llevat. L'extracte de llevat és una font de nutrients que conté aminoàcids, pèptids, vitamines, etc. I per altra banda, la triptona és un dígerit pancreàtic de caseïna (proteïna de la llet de vaca) que s'utilitza com a font de nitrogen en els medis de cultiu.

Un cop contextualitzats prosseguim amb la preparació del caldo. Primer de tot vam agafar el recipient gran de 2 L, el vam posar sobre la balança, vam posar l'embut al coll del recipient i vam tarar la balança perquè tornés a indicar els 0 g. A continuació vam introduir al recipient 20 g d'extracte de llevat

(concentració 10 g/L). Seguidament vam tornar a tarar la balança i vam afegir 40 g de triptona (concentració 20 g/L). Després de tornar a fer la tara vam abocar 40 g de glucosa (concentració 20 g/L) i finalment, vam omplir el recipient amb aigua destil·lada fins a la marca que indicava els 2 L.



Imatge 27. Preparació del caldo YPD

En segon lloc, vam esterilitzar el caldo per tal d'eliminar qualsevol microorganisme que pogués contaminar el cultiu. Vam realitzar l'esterilització amb una màquina anomenada autoclau, que utilitza el vapor d'aigua per esterilitzar. Per fer una mena de control d'aquesta esterilització vam fer servir una cinta adhesiva que conté unes ratlles d'un compost basat en ferro que reacciona en entrar en contacte amb el vapor i es torna de color negre. D'aquesta manera, si en treure el material de l'autoclau la cinta ha canviat de color, podem donar per segur que ha estat en contacte amb el vapor i per tant, que l'esterilització ha anat bé.

Un autoclau consisteix en una cambra metàl·lica de parets gruixudes amb un sistema de tancament 100% hermètic. Dins la cambra hi ha unes reixes on s'encaixen uns suports de ferro sobre els quals col·loques les preparacions que vols esterilitzar. La meitat inferior de la màquina és una gran caldera on es produeix vapor d'aigua a una alta temperatura, el qual entrarà a la cambra més endavant. Quan iniciés l'esterilització, es fa el buit dins la cambra per assegurar que no hi ha aire que pugui contenir espores i també per garantir que hi cabrà el màxim volum de vapor. Seguidament es va omplint la cambra de vapor fins que queda totalment saturada, de manera que s'assoleix una pressió de 2 atmosferes i una temperatura de 121° C. La cambra es manté en aquestes condicions durant 21 minuts per assegurar que qualsevol microorganisme que

hi pogués haver ha mort. Finalment es torna a fer el buit, es deixa reposar la cambra perquè es refredi i baixi la pressió a poc a poc i ja es pot retirar el material esterilitzat.



Imatge 28. Autoclau

És de gran importància esmentar que just abans d'introduir el recipient amb el caldo YPD a l'autoclau vam afloixar el tap del recipient per permetre que el vapor pogués entrar a dins.



Imatge 29. Caldo YPD.

*Part 2. Preparació de les mostres, fermentació de la glucosa i mesura del creixement del *Saccharomyces Cerevisiae**

Material

Per a realitzar aquesta segona part de l'experiment vam necessitar el següent material i productes:

- Cultiu de *Saccharomyces Cerevisiae*
- Caixa amb gel
- Tubs Eppendorf d'1 mL
- Pipetes automàtiques amb les seves puntes corresponents

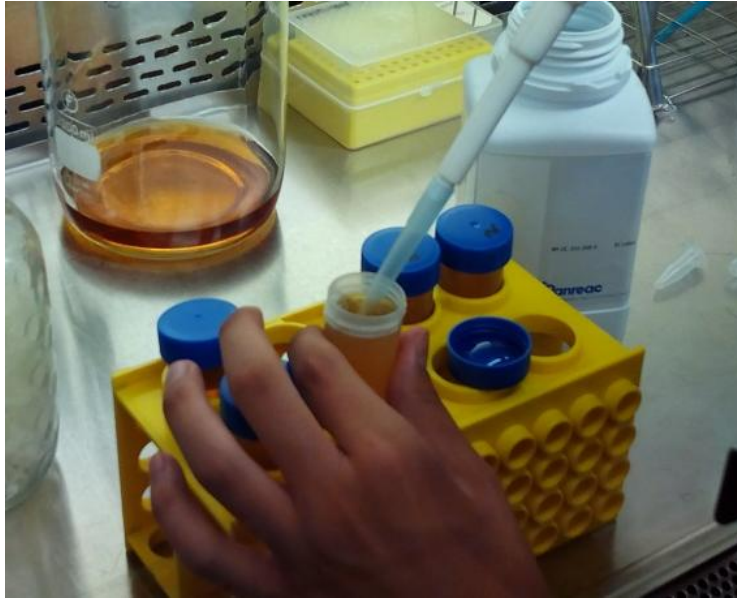
- Centrifugadora
- Tubs grans de 50 mL
- Gradeta
- 2 incubadores
- Sensor de pH
- H_3PO_4 (àcid ortofosfòric)
- NaOH (sosa càustica)
- Espectrofotòmetre
- Cubetes per a l'espectrofotòmetre

Procediment

El dia abans de començar aquesta part de l'experiment vam fer un precultiu del llevat, que consisteix en inocular el *Saccharomyces Cerevisiae* a un medi de caldo YPD i deixar-lo durant un dia en creixement per augmentar el nombre de cèl·lules viables.

Al dia següent ja vam poder començar l'experiment. Com hem esmentat a la justificació de l'experiment, vam preparar 4 mostres diferents: una a pH 5 i T^a 20° C , una pH 5 i T^a 40° C , una a pH 9 i T^a 20° C i una a pH 9 i T^a 40° C.

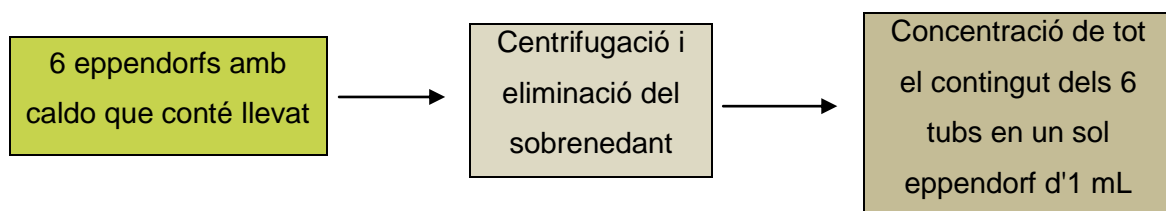
El primer que vàrem fer va ser preparar dos tubs de caldo YPD a pH 5 i dos tubs més a pH 9. A cada tub, hi vam posar 50 mL de caldo YPD. Un cop fet això ens vàrem disposar a ajustar el pH dels tubs. Ho vam fer afegint àcid fosfòric (H_3PO_4) als tubs de pH 5 i afegint sosa càustica (NaOH) als tubs de pH 9 en les proporcions indicades a la taula següent tot arribant a un volum final de 51 mL. Cal esmentar que per ajustar els tubs de pH 5 vàrem necessitar la meitat de volum d'àcid que de base per ajustar els tubs de pH 9. D'aquesta manera, en els tubs de pH 5 vam haver d'afegir un volum extra d'aigua per igualar tots els volums finals.



Imatge 30. Preparació dels tubs

pH final	Caldo YPD	Àcid/Base	H ₂ O destil·lada	Volum final
5 (x2 rèpliques)	50 mL	500 µL H ₃ PO ₄	500 µL	51 mL
9 (x2 rèpliques)	50 mL	1000 µL NaOH	0 µL	51 mL

Seguidament vam començar a fer la preparació dels llevats que teníem en precultiu des del dia anterior. Com que aquests llevats es trobaven en un recipient amb un volum gran, els llevats estaven força diluïts, i és per aquest motiu que els vam concentrar. Ho vàrem fer d'una manera molt senzilla. Vam omplir 6 eppendorfs d'1 mL amb el caldo que contenia el llevat i els vam centrifugar tots 6. Seguidament, vàrem extreure el sobrenedant i només ens vam quedar amb les cèl·lules de llevat que havien precipitat al fons dels tubs durant la centrifugació. Finalment vàrem ajuntar les cèl·lules de llevat dels 6 tubs en un de sol i vàrem obtenir una solució concentrada de llevat amb un volum d'1 mL aproximadament.





Imatge 31. Centrifugació



Imatge 32. Concentració dels llevats

Recordem al pas anterior havíem preparat 2 tubs de caldo YPD a pH 5 i dos a pH 9. Així doncs, aquest procediment de concentració dels llevats el vàrem fer 4 vegades, una per cada preparació.

Seguidament vam inocular les solucions amb llevat a cada una de les 4 preparacions i les vam posar a incubar perquè els llevats realitzessin la fermentació a la temperatura que volíem. A la temperatura de 20°C hi vàrem fermentar un dels tubs de pH 5 i un dels tubs de pH 9. Per altra banda, a la temperatura de 40°C hi vàrem fermentar l'altre tub de pH 5 i l'altre tub de pH 9. A mesura que el temps avançava, els llevats anaven consumint glucosa, i per això, vàrem extreure mostres d'1 mL de cada una de les 4 preparacions als temps 15, 45, 75 i 105 minuts. Aquestes mostres ens van permetre estudiar posteriorment l'evolució de la fermentació en cada preparació al llarg del temps.

pH	Inoculació de llevat	Temperatura	Temps d'extracció de dues mostres d'1 mL
5	Solució concentrada de 800 µL	20°C	15
			45
			75
			105
5	Solució concentrada de 800 µL	40°C	15
			45
			75
			105
9	Solució concentrada de 800 µL	20°C	15
			45
			75
			105
9	Solució concentrada de 800 µL	40°C	15
			45
			75
			105

És necessari especificar que aquestes 4 mostres que vàrem extreure de cada una de les 4 preparacions les vàrem extreure per duplicat. Unes eren per dedicar-les a l'estudi de l'evolució de la fermentació (estudi de la concentració

de glucosa) i les altres eren per mesurar el creixement del llevat al llarg de la fermentació (l'altre objectiu de l'experiment).



Imatge 33. Inoculació dels llevats



Imatge 34. Incubació i fermentació

Així doncs, vam obtenir dues sèries de 4 mostres per a cada una de les 4 preparacions. Les mostres que volíem destinar a mesurar-ne la concentració de glucosa les vam haver de centrifugar per separar el caldo del llevat i així evitar que el llevat continués consumint glucosa. El caldo obtingut el vàrem posar cadascun en un eppendorf diferent i ben etiquetat i ho vàrem congelar tot plegat per mantenir el caldo en bones condicions durant uns dies. Per contra, les cèl·lules de llevat que vam separar de la resta del caldo les vam llençar perquè ja havien fet la seva funció i ja no les necessitàvem més.

Finalment, les mostres que volíem destinar a mesurar el creixement dels llevats les vam anar posant una per una a la cubeta d'un espectrofotòmetre i vam prendre mesura de les absorbàncies resultants. Cal entendre que com

més alts siguin els valors de les absorbàncies, més llum haurà absorbit la mostra. I com més concentració de llevats hi hagi a la mostra, més llum absorbirà. Així doncs, com més alt sigui el valor d'absorbància obtingut, més llevats hi haurà a la mostra i això serà signe de que en les condicions de pH i temperatura d'aquella mostra s'hi trobava còmode i per això ha crescut més abundantment.

Part 3. Mesura de les concentracions de glucosa per mitjà d'una recta patró

Introducció

Un cop realitzada la primera part de l'experiment i congelades les mostres de glucosa extretes als temps 15, 45, 75 i 105 minuts de cada fermentació, necessitàvem mesurar d'alguna manera la concentració de glucosa que hi havia a cada mostra per determinar sota quines condicions de pH i temperatura la fermentació havia estat més ràpida. Entenem que si en unes condicions determinades de pH i temperatura la concentració de glucosa entre els temps inicial i final ha disminuït molt més que en els altres casos, aquestes condicions seran les que afavoreixen una fermentació més ràpida d'entre les que hem estudiat. Per realitzar aquesta mesura de les concentracions vam recórrer a una tècnica anomenada recta patró, una tècnica molt important i que ja ha estat explicada en apartats anteriors. Explicat de manera sintètica, el que vàrem fer va ser diluir les nostres mostres de glucosa que teníem congelades, elaborar els estàndards necessaris i passar-los per l'espectrofotòmetre per fer la recta de calibratge i finalment mesurar les absorbàncies de les nostres mostres diluïdes per poder encabir-les dins la recta.

La realització d'aquesta part de l'experiment a la Universitat de Barcelona ha estat, sense cap mena de dubte, la part més complicada d'aquest treball de recerca. És un experiment llarg i laboriós i se'ns van presentar moltes dificultats, les quals ens van portar a haver de repetir-lo fins a cinc vegades. Seguidament, s'explicarà separatament cada un dels intents i s'anirà justificant cada error comés per tal d'arribar a entendre'l.

Material

Per realitzar aquesta part de l'experiment vam necessitar el següent material i els següents reactius:

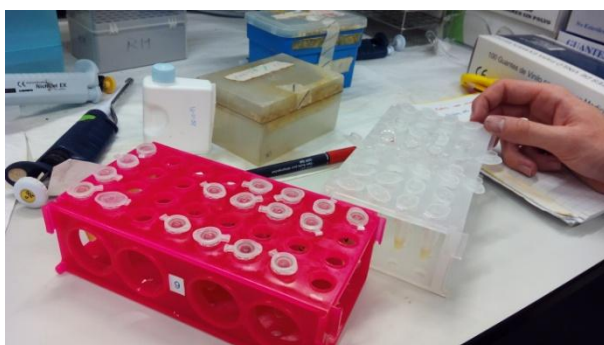
- Tubs Eppendorf d'1 mL
- Retoladors per retolar els tubs.
- Pipetes automàtiques amb precisió de fins a 10 μ L
- Puntetes de pipeta corresponents a les pipetes utilitzades
- Gradeta per als eppendorfs
- Vas de precipitats
- Balança
- Espàtula
- Espectrofotòmetre
- Cubetes per a l'espectrofotòmetre
- Aigua Mil-liQ (destil·lada i molt pura)
- Les nostres mostres de glucosa
- Glucosa anhidra
- Tampó pH 5
- Tampó pH 9
- Tampó pH 7
- Solució enzimàtica (bàsicament hexoquinases i glucosa 6-fosfat deshidrogenases)

Intent número 1

Per començar vam descongelar les nostres mostres de glucosa obtingudes com a producte de les fermentacions de la part 1 de l'experiment.

Seguidament, vam consultar altres exemples de rectes patró realitzades prèviament per altres científics i vam veure que la concentració màxima que es pot arribar a mesurar amb aquesta tècnica era de 20mM. Tenint en compte que la concentració màxima de les nostres mostres (concentració de glucosa del caldo YPD) era de 20 g de glucosa per cada litre d'aigua, que es tradueix a 111,11 mM, veiem clarament que les nostres mostres eren gairebé 6 vegades més concentrades que el que podíem arribar a mesurar. D'aquesta manera, el primer que vam haver de fer va ser diluir les nostres mostres 6 vegades (fer una dilució 1/6). Tenint en compte ens interessava arribar a un volum final de 10 μ L, vàrem realitzar la dilució 1/6 en les següents proporcions:

	Volum de la mostra amb glucosa	Volum d'H ₂ O destil·lada
Cadascun dels 16 tubs	1,6 μ L	8,4 μ L



Imatge 35. Mostres diluïdes

Un cop diluïdes les mostres vam començar a preparar els estàndards o mostres de glucosa de concentració coneguda que ens permetran elaborar la recta de calibratge. Vam decidir fer 4 estàndards, un de 20mM, un de 15mM, un de 10mM i un de 2mM. Aquests es preparen agafant una mostra de glucosa de concentració coneguda (provinent d'una solució mare) i diluint-la segons convingui.

Per tal d'elaborar els estàndards, vam preparar una solució mare de glucosa amb una concentració de 100mM (que és el mateix que 0,1M) seguint les següents proporcions:

Recipient	Glucosa	H ₂ O destil·lada
Vas de precipitats	1,8 g	100mL

Un cop obtinguda la solució mare a partir de la qual elaborariem els estàndards, ens vàrem disposar a preparar-los:

Preparació de l'estàndard de 20mM:

Recipient	Solució mare de glucosa	H ₂ O destil·lada
Eppendorf 1 mL	200 µL	800 µL

Preparació de l'estàndard de 15mM:

Recipient	Solució mare de glucosa	H ₂ O destil·lada
Eppendorf 1 mL	150 µL	850 µL

Preparació de l'estàndard de 10mM: consisteix en una dilució 1/2 de l'estàndard 20mM

Recipient	Volum de l'estàndard 20mM	H ₂ O destil·lada
Eppendorf 1 mL	100 µL	100 µL

Preparació de l'estàndard de 2mM: consisteix en una dilució 1/5 de l'estàndard 10mM.

Recipient	Volum de l'estàndard 10mM	H ₂ O destil·lada
Eppendorf 1 mL	20 µL	80 µL

Un cop vam tenir llestos els estàndards, vam agafar un volum de 10µL de cada estàndard i el vàrem mesclar amb 1 mL de la mescla enzimàtica d'hexoquinases i glucosa 6-fosfat deshidrogenases i ens vàrem esperar 30 minuts per obtenir les molècules de NADPH. A continuació vam passar una mostra d'aigua per l'espectrofotòmetre per marcar el blanc de lectura i després, vàrem anar passant els diferents estàndards per l'espectrofotòmetre, en vam mesurar les absorbàncies i vàrem fer les rectes de calibratge.



Imatge 36. Addició dels enzims

Tot seguit, vam procedir a preparar les mostres de glucosa del nostre experiment real (les que havíem descongelat i diluït 6 vegades). Vam agafar tubs nous i vam barrejar les nostres mostres amb la solució enzimàtica que conté les hexoquinases i les 6-fosfat deshidrogenases que convertirien la glucosa de les mostres en molècules de NADPH tal i com acabàvem de fer amb els estàndards. Transcorreguts els 30 minuts que dura la reacció vam dirigir-nos a mesurar-ho tot amb l'espectrofotòmetre. El primer que vam fer va ser omplir la cubeta de l'espectrofotòmetre amb aigua per tornar a marcar el blanc de lectura, efectivament, l'absorbància va donar zero. Seguidament vam anar passant cada una de les nostres mostres per l'espectrofotòmetre i també en vam apuntar les absorbàncies.

Finalment, va ser mirant els resultats que ens vam adonar que alguna cosa havia anat malament. Els valors d'absorbància dels estàndards eren força inferiors als valors d'absorbància obtinguts a les nostres mostres estudiades, de manera que els valors de les nostres mostres se sortien de la recta de calibratge que formaven els estàndards i per tant no ens servien per a calcular les concentracions originals de glucosa de les mostres.

Després de molt reflexionar ens vam adonar del nostre error. Els estàndards els havíem preparat amb aigua destil·lada, i per tant estaven a pH 7. Per altra banda, la meitat de les nostres mostres estaven a pH 5 i l'altre meitat a pH 9. Com bé sabem, les reaccions enzimàtiques estan fortament

influenciades pel pH, de manera que la producció de NADPH per part dels enzims hexoquinasa i 6-fosfat deshidrogenasa en les diferents mostres i en els estàndards era totalment diferent i per això unes absorbàncies no tenien res a veure amb les altres. Tot i així, malgrat que estàvem força segurs que aquest havia estat el problema, ho havíem de comprovar.

Intent número 2

L'únic que vam fer aquest vegada va ser preparar dues mostres de glucosa de la mateixa concentració però una a pH 5 i l'altra a pH 9. Com que la concentració en ambdós casos era la mateixa, si un cop feta la reacció enzimàtica i un cop passades les mostres per l'espectrofotòmetre els dos valors d'absorbància no coincidien, hauríem demostrat que el pH influeix en la producció de NADPH i que per tant, no considerar el pH era l'error que havíem comès.

Vàrem preparar les dues mostres seguint les proporcions següents:

	Volum de la solució mare de glucosa 0,1 M	Volum de tampó de pH
Mostra a pH 5	100µL	100µL de tampó de pH 5
Mostra a pH 9	100µL	100µL de tampó de pH 9

L'única diferència respecte de les mostres preparades en el primer intent, a part de les concentracions, és que en comptes d'usar aigua destil·lada com a dissolvent vam utilitzar els tampons de pH, que són uns medis aquosos que fixen un pH determinat i el mantenen estable al llarg del temps.

Seguidament vam posar 10µL de cada mostra preparada en eppendorfs separats i vam afegir 1mL de solució enzimàtica a cada tub. Un cop van haver transcorregut els 30 minuts de la reacció i vam haver obtingut el NADPH, vam passar les mostres per l'espectrofotòmetre i ens va donar dos valors d'absorbància diferents. Així doncs, vam demostrar que el pH de les mostres influencia la producció de NADPH durant la reacció enzimàtica. Finalment, vàrem establir que la qüestió era fer dues rectes patró diferents per tal d'elaborar una recta de calibratge obtinguda a partir d'estàndards preparats a pH 5 i una altra recta de calibratge obtinguda a partir d'estàndards preparats a pH 9.

Intent número 3

Aquesta vegada, tenint en compte les conclusions extreïtes de l'apartat anterior, vam realitzar dues rectes patró diferents, una preparant els 4 estàndards (20mM, 15mM, 10mM i 2mM) usant un tampó de pH 5 en substitució de l'aigua destil·lada i una altra preparant els estàndards usant un tampó de pH 9 en substitució de l'aigua destil·lada. No es tornarà a explicar el procediment experimental perquè és exactament igual que el que ha estat descrit a "*Intent número 1*", excepte la diferència d'utilitzar els tampons de pH com a dissolvent en lloc de l'aigua. D'aquesta manera, vam preparar els dos grups d'estàndards, vam sotmetre'ls a les reaccions enzimàtiques, vam passar-los per l'espectrofotòmetre i vam elaborar les dues rectes de calibratge corresponents a cada pH, les quals es poden observar a l'apartat de resultats. Un cop obtingudes les dos rectes només calia tornar a mesurar les absorbàncies de les nostres mostres de glucosa a analitzar i col·locar les absorbàncies de les mostres a pH 5 a la recta de calibratge de pH 5 i les absorbàncies de les mostres a pH 9 a la recta de calibratge de pH 9. Això va ser el que ens vàrem disposar a fer en els següents apartats.

Intent número 4

Un cop vam tenir les dues rectes a diferents pHs preparades, ja no ens va caldre elaborar més estàndards. Simplement, havíem de diluir les nostres mostres de glucosa, sotmetre-les a la reacció enzimàtica, passar-les per l'espectrofotòmetre i col·locar els valors d'absorbància de cada mostra a la seva recta corresponent tal com s'ha explicat al final de l'apartat anterior.

Malauradament, aquesta vegada vam ser víctimes d'un malentès i ens vam equivocar a l'hora de diluir les nostres mostres. D'aquesta manera, tots els valors d'absorbància obtinguts tornaven a estar fora de les rectes i l'experiment tornava a no ser vàlid.

Intent número 5

Aquesta vegada vam repetir l'experiment descrit a "*Intent número 4*" però realitzant les dilucions apropiades. Per assegurar-nos que tots els valors entrarien dins les rectes, vam preparar unes mostres fent una dilució 1/12 i unes altres fent una dilució 1/24 de les mostres originals de glucosa. Cal

especificar que al llarg dels intents realitzats en les setmanes anteriors vam consumir bona part de les solucions enzimàtiques i per tant, aquesta vegada vam haver de reduir el nombre de mostres analitzades. Vàrem mesurar només els temps 45 min i 105 min de cada grup de mostres en comptes de mesurar tots els temps, però no va suposar cap problema perquè una dada del principi de la fermentació i una dada del final són suficients per veure com és l'evolució de la fermentació al llarg del temps.

Vàrem fer les preparacions descrites anteriorment seguint les proporcions següents:

Dilució	Volum de glucosa	H ₂ O destil·lada	Volum de solució enzimàtica
1/12	80 µL de la mostra de glucosa a estudiar	880 µL	1mL per cada 10 µL de mostra diluïda 1/12
1/24	100 µL de la dilució 1/12	100 µL	1mL per cada 10 µL de mostra diluïda 1/24

Després de la mitja hora que dura la reacció per obtenir el NADPH vam fer la mesura de les absorbàncies amb l'espectrofotòmetre i en vàrem prendre nota. Finalment, vam col·locar les absorbàncies de les mostres a pH 5 a la recta de calibratge de pH 5 i les absorbàncies de les mostres a pH 9 a la recta de calibratge de pH 9 i vam calcular les concentracions de glucosa de les mostres originals. A l'apartat de resultats i d'interpretació dels resultats es troben els comentaris sobre els resultats obtinguts en aquest experiment.

8.1.3. Experiment 2

Justificació del segon experiment

Una part força important del mètode científic diu que en tot experiment s'han de realitzar diverses rèpliques per tal de poder comparar i contrastar els resultats. Si no fos així, qualsevol error comès durant l'experiment podria passar desapercebut i el resultat seria poc fiable. En el nostre cas, quan vam realitzar l'experiment 1 a la Universitat de Barcelona només vam fer una sola

rèplica per manca de temps. D'aquesta manera, vam dissenyar un altre experiment que es pogués fer amb el material que teníem a l'abast a casa i a l'institut i que ens permetés obtenir uns resultats que poguéssim comparar amb els de l'experiment 1 per tal de fer les rèpliques corresponents.

A l'hora de dissenyar l'experiment teníem clar que havíem de preparar un medi amb glucosa a diferents condicions de pH i temperatura que el *Saccharomyces Cerevisiae* consumiria a diverses velocitats. Tot i així, mentre pensàvem com ho faríem ens vam topar amb un problema: no teníem cap mitjà per mesurar les concentracions finals de glucosa. Per solucionar-ho vam seguir un raonament molt simple: si la reacció de fermentació es pot resumir en $C_6H_{12}O_6$ (glucosa) \rightleftharpoons $2 CO_2$ (diòxid de carboni) + $2 C_2H_6O$ (etanol), s'arriba a la conclusió que l'únic gas produït és el CO_2 i que per tant existeix una relació entre els mols de glucosa consumits i els mols de gas produïts. Així doncs, vam decidir utilitzar un sensor de pressió de l'institut per mesurar amb quina velocitat augmenta la pressió del recipient on el llevat fermenta la glucosa per tal de saber sota quines condicions es produeix CO_2 més ràpidament. Finalment, només hauríem d'interpretar les dades i establir que el recipient en el qual l'increment de pressió hagués estat més ràpid seria el que conté les condicions òptimes per a una fermentació més veloç.

Protocol experimental

Material

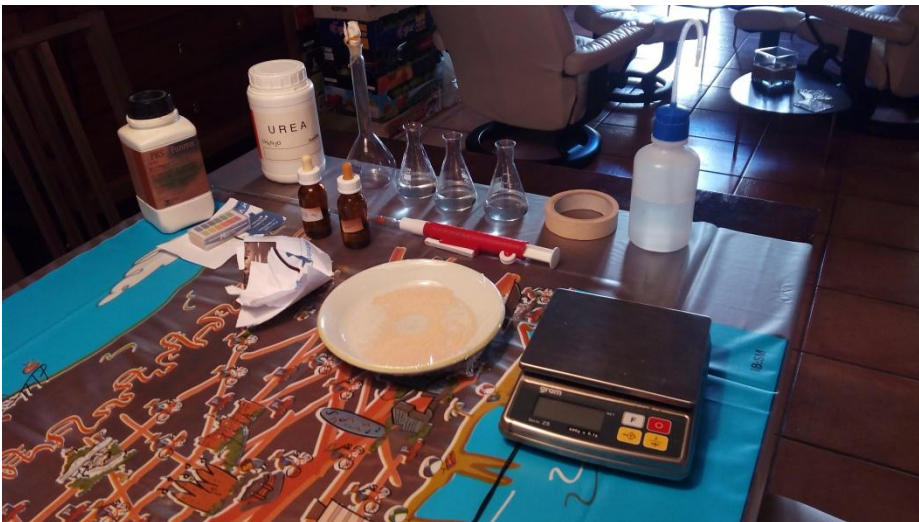
Per realitzar l'experiment vam necessitar el següent material:

- Matràs aforat
- Pipeta graduada de 10 mL
- Matràs erlenmeyer
- Sensor de pressió de gasos i ordinador amb el programa *Logger Lite*
- Paper de pH
- Espàtula
- Balança

- Termòmetre
- Recipient gran o olla de cuina

A més del material, vam necessitar els productes següents:

- Urea
- Glucosa
- Aigua destil·lada
- *Saccharomyces Cerevisiae*
- HCl (àcid clorhídric)
- NaOH (hidròxid de sodi o sosa càustica)



Imatge 37. Materials i productes utilitzats.

Procediment

Per començar, vam preparar una solució mare de caldo per als llevats. Aquest caldo està constituït per la glucosa que consumeix el llevat i la urea que utilitza com a font de nitrogen, per créixer dissoltes en un medi d'aigua. En primer lloc, vam posar 250 mL d'aigua destil·lada en un matràs aforat. A continuació vam pesar 0,75 g d'urea a la balança i els vam abocar a l'aigua (concentració d'urea: 3 g/L). Per acabar, afegírem 5 g de glucosa a la barreja (concentració de glucosa: 20 g/L) i ho vam barrejar bé fins que tots els soluts es van dissoldre completament.

En aquest experiment, com bé sabem, s'estudien 2 variables, el pH i la temperatura. Primerament, vam fer una simulació de l'experiment 1, de manera que vam preparar 4 preparacions combinant les condicions de pH 5 i 9 i les temperatures 20 i 40°C. És a dir, vam preparar 4 recipients, un a T^a 40° C i pH 5, un a T^a 40° C i pH 9, un a T^a 20° C i pH 5 i un a T^a 20° C i pH 9.

En aquesta segona fase de l'experiment vam preparar les diferents mostres. Vam agafar 4 matrassos erlenmeyer petits i vam posar 50 mL del caldo preparat prèviament a cada recipient amb la pipeta graduada. A continuació vam mesurar el pH del caldo i ens va donar un pH de 6 aproximadament. A partir d'aquí, vam interpretar que per assolir un pH de 5 n'hi hauria prou amb un parell de gotes d'HCl, mentre que per assolir un pH de 9 necessitaríem una quantitat superior de NaOH. Un cop ajustat el pH de les diferents mostres vam procedir a variar la temperatura. L'ideal per a variar la temperatura és utilitzar una incubadora, però si no se'n té, com és el nostre cas, una bona opció és preparar un bany d'aigua en el qual es va afegint aigua calenta o freda per mantenir la temperatura desitjada. Aquest sistema és un molt bon substitut de la incubadora perquè una de les moltes propietats de l'aigua és que té un calor específic molt alt i això fa que la seva temperatura tendeixi a variar poc al llarg del temps. Per a preparar el bany vam utilitzar una olla o recipient gran que vam omplir d'aigua i hi vam posar un termòmetre a dins. Acte seguit, només calia escalfar o refredar l'aigua fins que el termòmetre marquès o bé 20°C o bé 40° C i submergir el matràs erlenmeyer corresponent. Per aconseguir els 20° C vam posar gels a dins de l'olla i per arribar als 40° C vam abocar a l'olla gots d'aigua calenta que havíem escalfat al microones.

Un cop preparades les mostres, només va caldre afegir-hi els llevats, tapar ràpidament el recipient amb un tap que va connectat al sensor de gasos i iniciar la presa de dades amb el programa de l'ordinador. Cal tenir en compte que per obtenir uns resultats més correctes i precisos s'ha d'intentar afegir la mateixa quantitat de llevat a cada mostra. En aquest cas, vam posar-n'hi uns 0,25 g.



Imatge 38. *Saccharomyces Cerevisiae*

En aquest punt, se'ns va presentar una important dificultat. Aquesta va consistir en la circumstància que el coll del matràs erlenmeyer era massa estret i el tap del sensor saltava constantment. D'aquesta manera, no es podia tancar hermèticament el recipient, l'aire de l'exterior entrava, el sensor mesurava la pressió atmosfèrica i, per tant, no obteníem uns resultats aprofitables.

Afortunadament, a la cuina de casa hi vam trobar un erlenmeyer gran d'un volum d'1'05 L (el típic recipient on es guarda l'oli) i va donar la casualitat que el tap del sensor de gasos encaixava a la perfecció amb el coll del matràs. Gràcies a això vam poder reprendre l'experiment.

Aquest cop, com que el nou recipient era molt més gran que els anteriors, vam preparar cada mostra amb 80 mL de caldo, una mica més d'HCl i NaOH per ajustar el pH i 0,5 g de llevat. Un altre fet a tenir en compte és que, en haver augmentat molt el volum, l'increment de pressió que es va obtenir aquest cop va ser considerablement més petit i per tant, el gràfic resultant va ser menys pronunciat.

Un cop vam tenir la primera mostra preparada amb el pH que li pertocava i vam tenir el bany d'aigua amb la temperatura desitjada, vam tapar el matràs amb el tap del sensor, vam submergir el recipient a l'aigua i ja vam estar en disposició d'obtenir les dades que ens permetrien establir la velocitat de la fermentació realitzada pel llevat. Per això, utilitzarem el programa d'ordinador *Logger Lite*, que interpreta les dades aportades pel sensor de pressió. El primer que vam fer va ser connectar el sensor al port USB de l'ordinador i indicar els intervals de temps que volíem que el programa complís a l'hora d'enregistrar dades. En el nostre cas, vam considerar apropiat fer una

mesura de pressió cada 10 segons durant 2 hores. Seguidament, vam iniciar la presa de dades i el programa va anar dibuixant un gràfic de les dades facilitades pel sensor, de manera que s'observava indirectament la velocitat de la reacció.



Imatge 39. Logger Lite i sensor

Un cop vam analitzar els resultats i vam ajustar els gràfics, els quals es poden observar al seu apartat corresponent dels resultats, ens vam adonar que teníem poques dades, o si més no, no suficients dades com per elaborar unes conclusions fiables. En conseqüència, vam repetir els experiments però amb un enfocament diferent. En primer lloc, vam ampliar el nombre de condicions estudiades, així que per tal d'esbrinar quin era el pH òptim del llevat i el rang de temperatures on els llevats treballen millor vam estudiar les següents condicions: pHs 1, 3, 5, 7, 9 i 11, i T° 20° C, 40° C i 80° C. Aquesta vegada vam estudiar tots els pHs un a un a temperatura fixa de 20° C i després totes les temperatures amb un pH fix de 7. El procediment d'arranjament dels preparatius és exactament igual al descrit anteriorment i en les mateixes proporcions. En el següent apartat, es poden observar tots els resultats obtinguts en aquesta col·lecció d'experiments fets a casa.



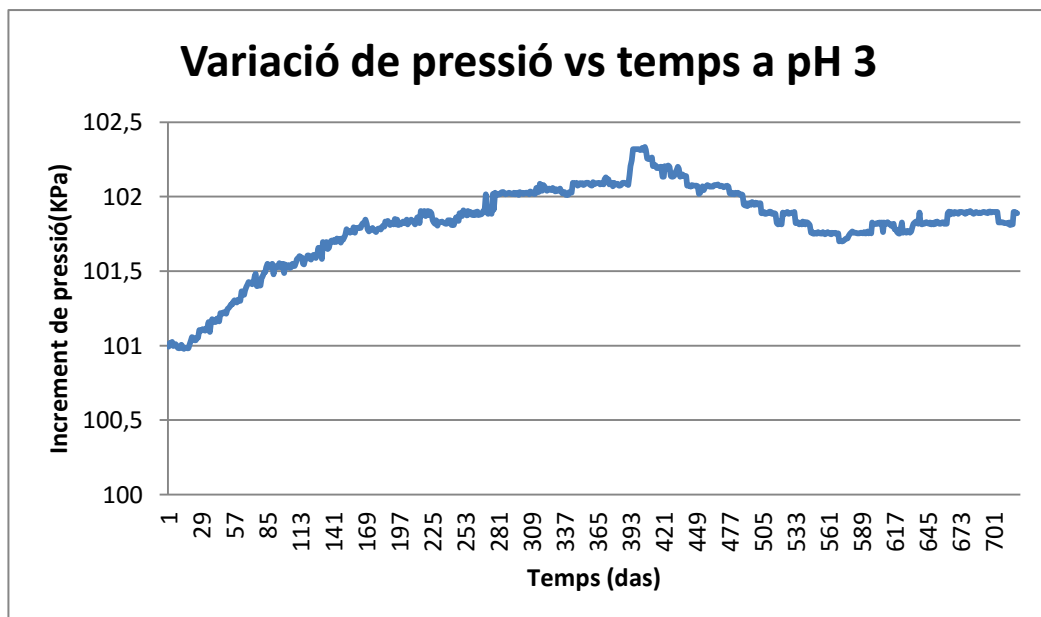
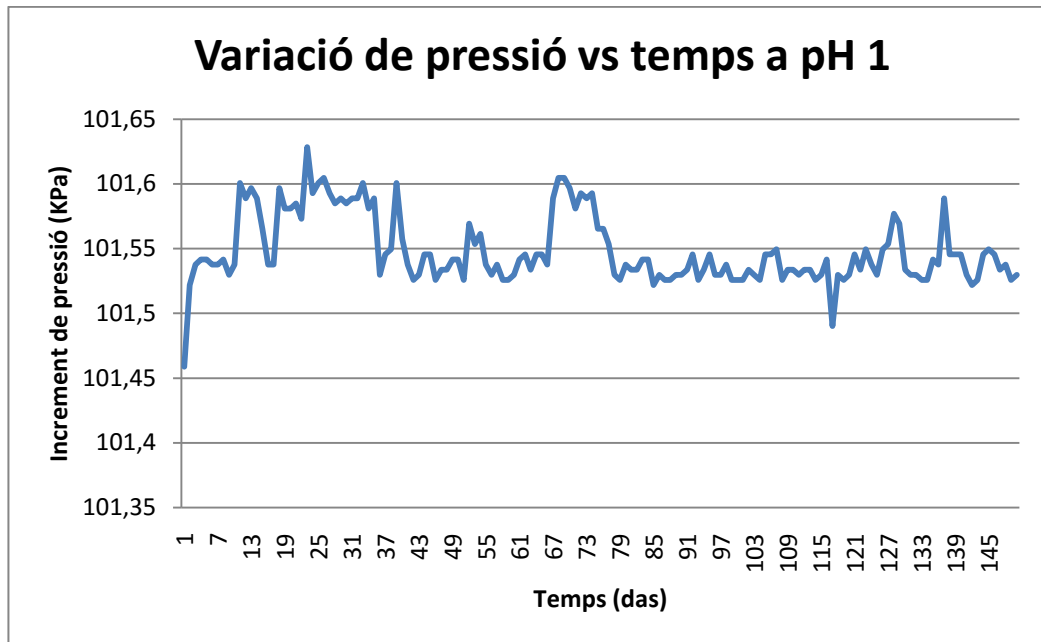
Imatge 40. Fermentació a temperatura controlada

8.2. Resultats i interpretació dels resultats

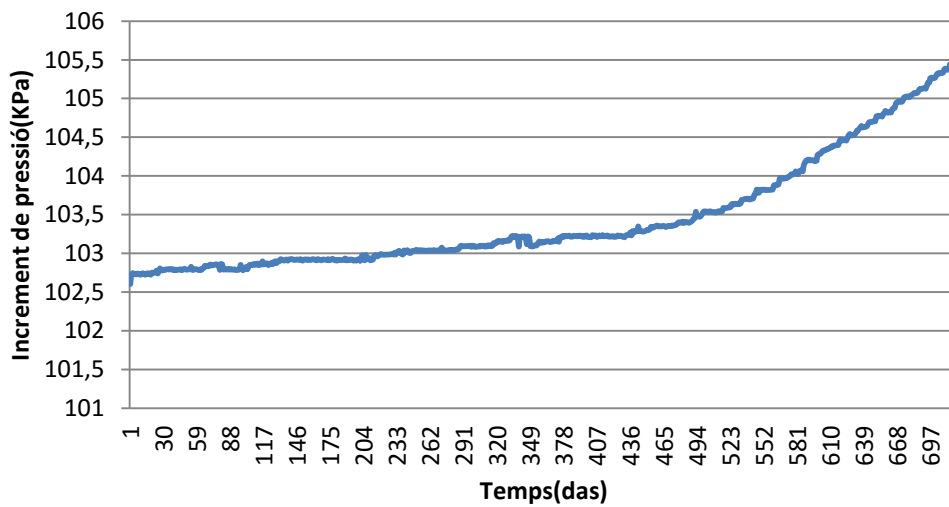
8.2.1. Resultats

Tenint en compte que els resultats de l'experiment 2 són més clars i millors que els de l'experiment 1, s'exposaran i s'analitzaran primer els de l'experiment 2 per tal de fer les coses més entenedores.

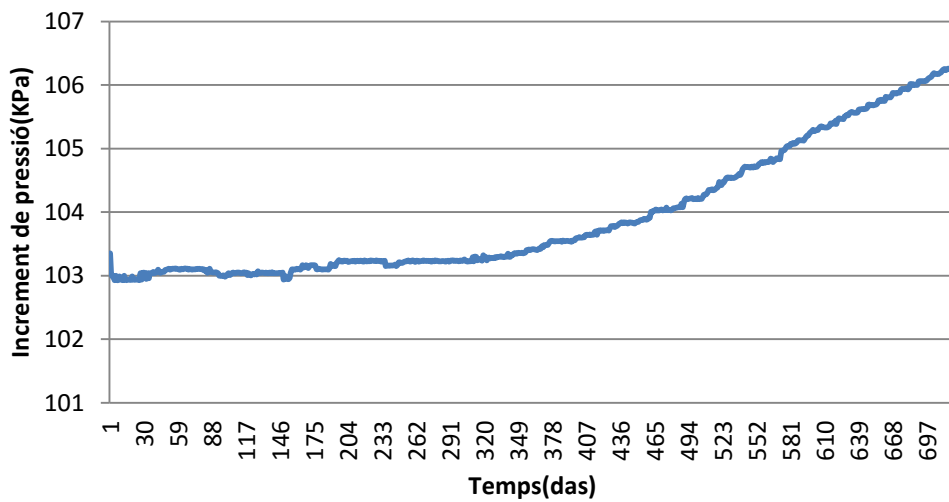
Experiment 2. Variació de la pressió segons el pH.



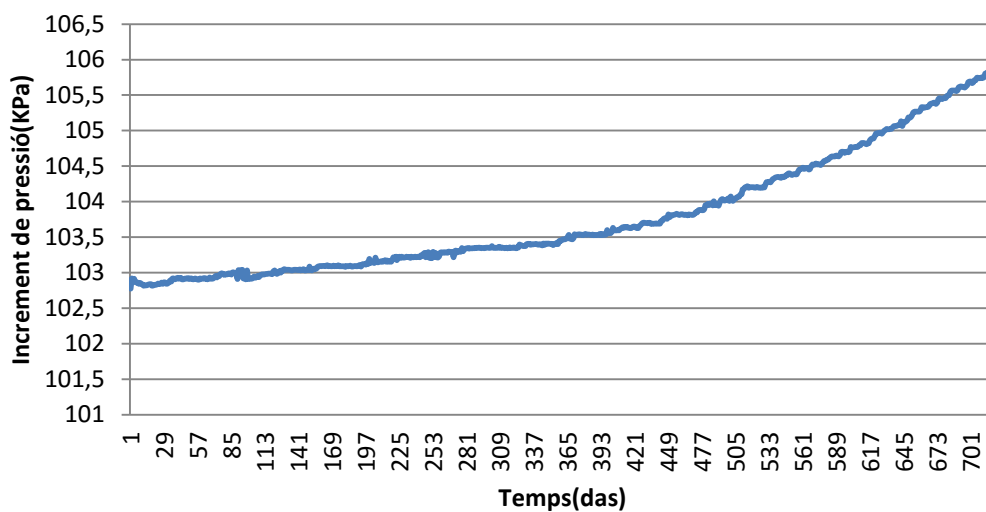
Variació de pressió vs temps a pH 5



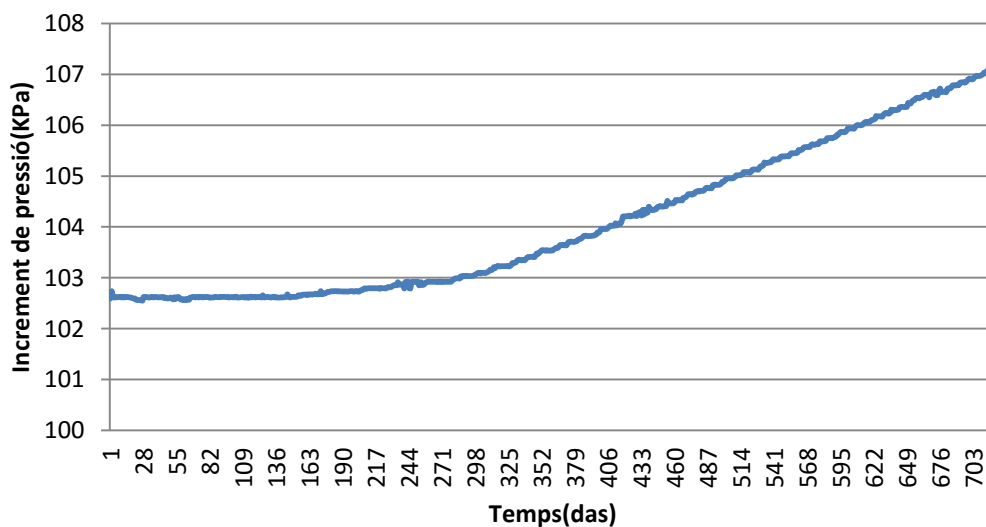
Variació de pressió vs temps a pH 7



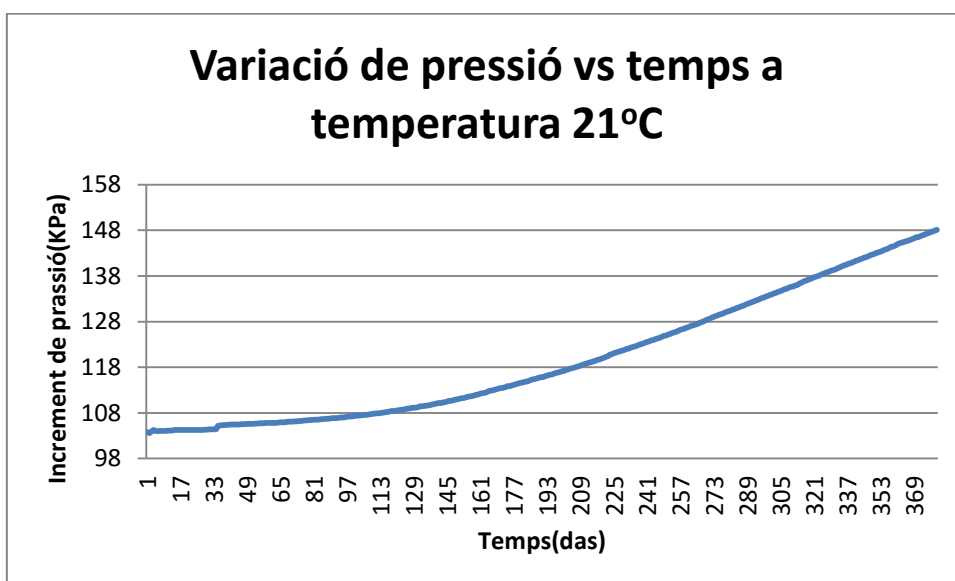
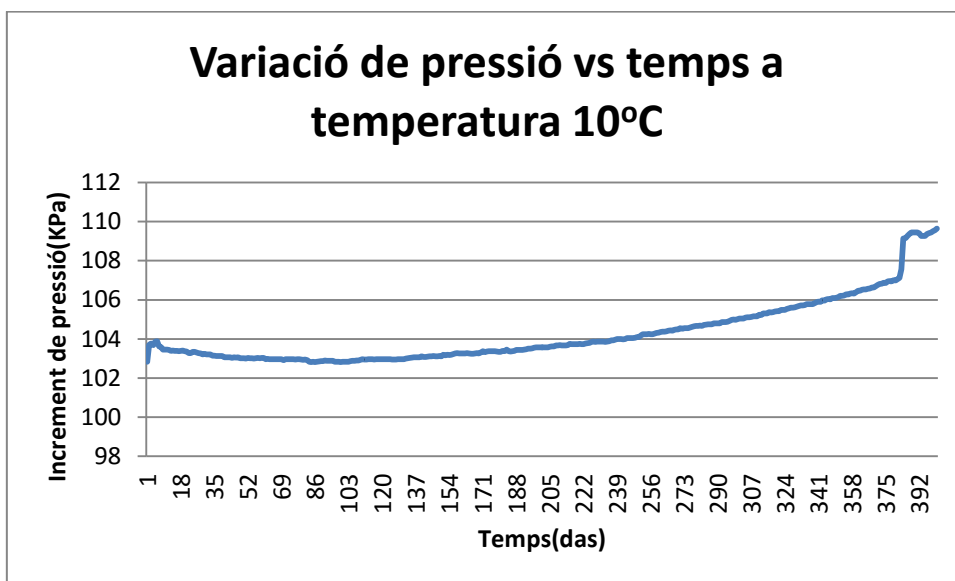
Variació de pressió vs temps a pH 9



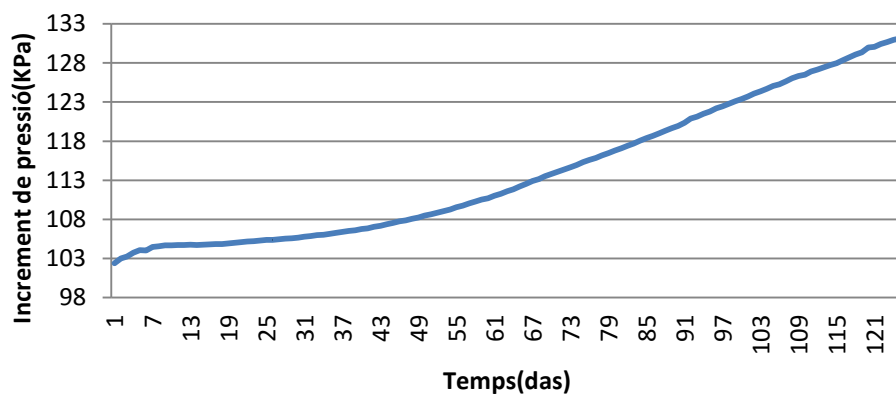
Variació de pressió vs temps a pH 11



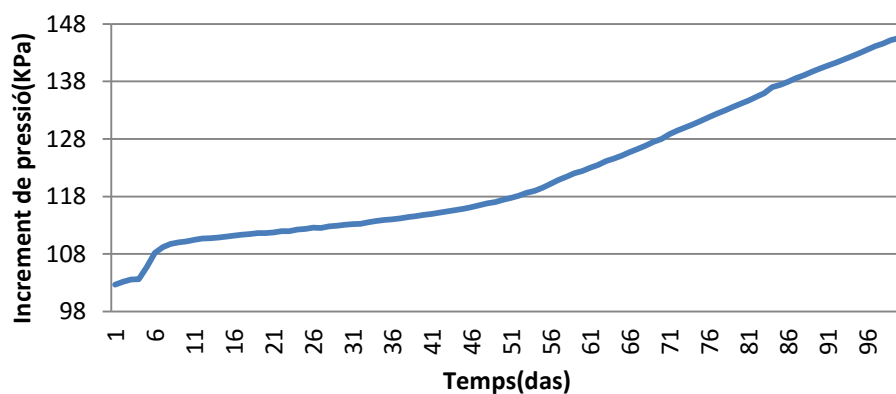
Experiment2 . Variació de la pressió segons la temperatura.



Variació de pressió vs temps a temperatura 30°C



Variació de pressió vs temps a temperatura 40°C



Experiment 2. Tractament de les dades

A continuació s'exposaran les taules de velocitats de fermentació, però abans, és necessari explicar breument com vàrem fer els càlculs que ens van permetre calcular-les.

L'objectiu de l'experiència realitzada consisteix en determinar sota quines condicions de pH i temperatura, la velocitat mitjana de fermentació és més elevada. Per tal de fer-ho ens basarem en l'augment de pressió provocat al recipient per la formació de molècules de CO₂ durant la transformació del piruvat a etanol. La reacció que ocorre és la següent:



D'acord a la llei dels gasos ideals, la pressió **P** en un recipient de volum **V** a temperatura **T** és directament proporcional al nombre de mols de gas **n** presents. La constant de proporcionalitat **R** es coneix com a constant de gasos ideals i té el valor de $8,314 \frac{J}{mol \cdot K}$.

L'equació que relaciona les magnituds relacionades és la següent:

$$P \cdot V = n \cdot R \cdot T$$

Si volem calcular la variació del nombre de mols de gas present (Δn) a partir de la variació de pressió (ΔP) suposant temperatura i volum constant:

$$\begin{aligned} P_i \cdot V &= n_i \cdot R \cdot T \\ P_f \cdot V &= n_f \cdot R \cdot T \end{aligned}$$

Restant una equació a l'altra, obtenim una expressió que ens serà útil:

$$\Delta P \cdot V = \Delta n \cdot R \cdot T$$

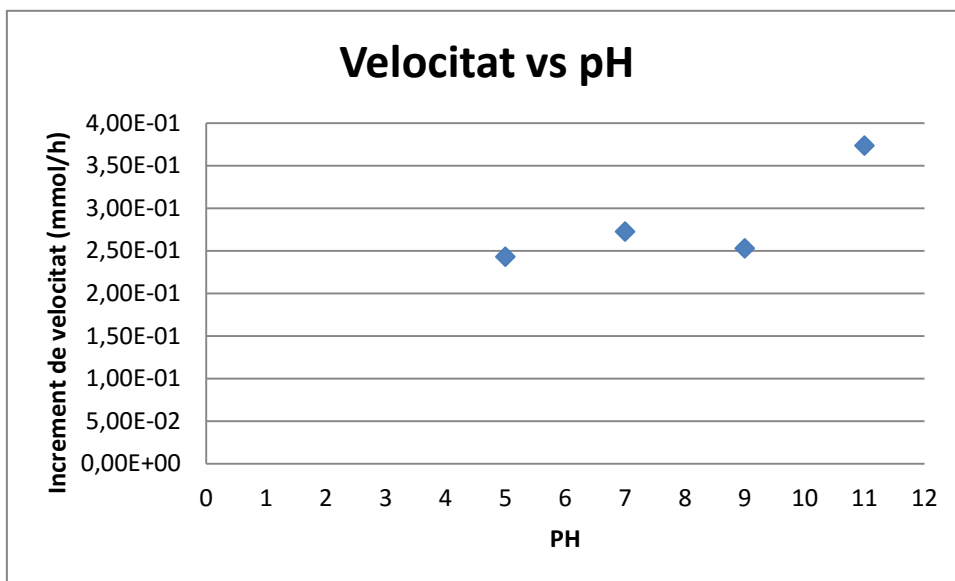
En el nostre cas, allò que ens interessa és l'increment de mols de CO₂ (Δn_{CO_2}). Com que el recipient on ha estat dut a terme l'experiment estava tancat hermèticament i com que a les reaccions que s'hi duïen a terme no hi estava implicat de manera significativa cap gas, excepte el CO₂ resultant de la fermentació, podem afirmar que $\Delta n_{CO_2} = \Delta n$. Substituint a l'expressió anterior, obtenim la fórmula que farem servir $\Delta P \cdot V = \Delta n_{CO_2} \cdot R \cdot T$, que reordenant els termes es converteix finalment en:

$$\Delta n_{CO_2} = \frac{\Delta P \cdot V}{R \cdot T}$$

Per obtenir la velocitat mitjana simplement hem de dividir per l'interval de temps, Δt . L'expressió resultant és:

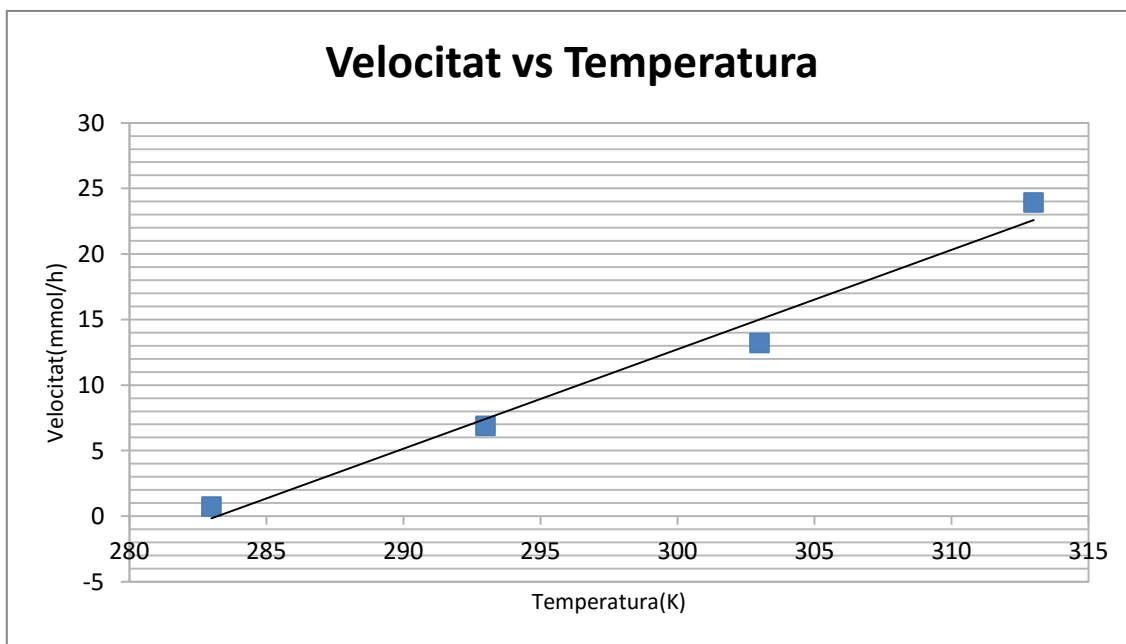
$$\bar{v} = \frac{\Delta P \cdot V}{R \cdot T \cdot \Delta t}$$

Experiment 2. Velocitats de fermentació



Els resultats obtinguts, respectant el pH es mostren a la taula següent:

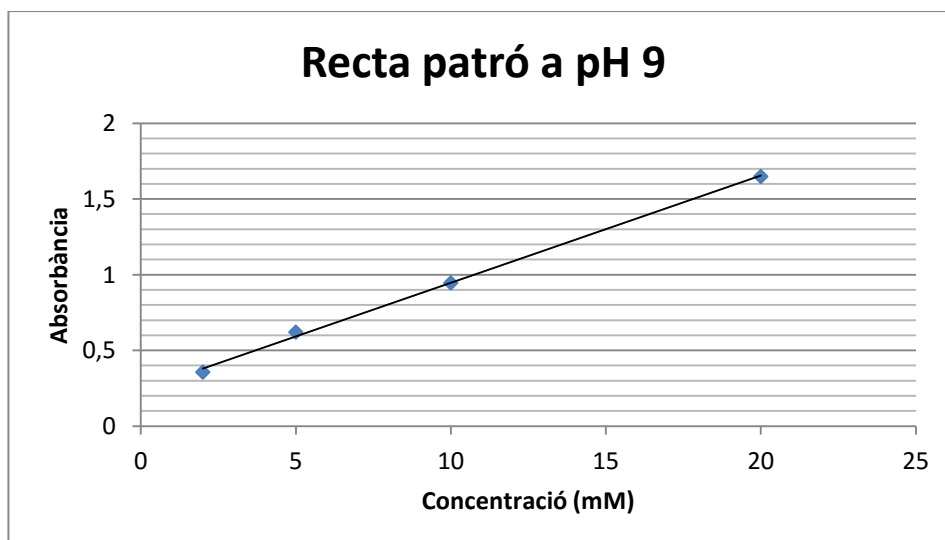
T ^a (°C)	Volum(L)	Pressió inicial(kPa)	Pressió final(kPa)	Temps(s)	Δn (mmol)	velocitat(mmol/h)	pH
20	0,4	101,46	101,53	1490	1,15E-02	2,78E-02	1
20	0,4	100,99	101,89	7200	1,48E-01	7,39E-02	3
20	0,4	102,6	105,56	7200	4,86E-01	2,43E-01	5
20	0,4	103	106,32	7200	5,45E-01	2,73E-01	7
20	0,4	102,78	105,86	7200	5,06E-01	2,53E-01	9
20	0,4	102,59	107,14	7200	7,47E-01	3,74E-01	11

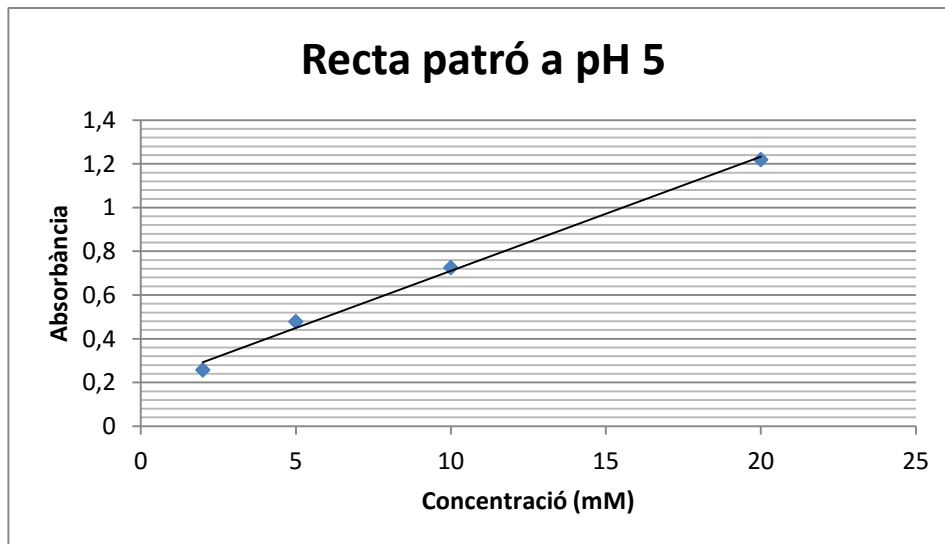


Els resultats obtinguts, respectant la temperatura es mostren a la taula següent:

Tª(K)	Volum(L)	Pressió inicial(kPa)	Pressió final(kPa)	Temps(s)	Δn (mmol)	velocitat(mmol/h)
283	0,4	102,84	107,56	3830	8,02E-01	7,54E-01
293	0,4	103,77	148,07	3790	7,27E+00	6,91E+00
303	0,4	102,39	131,09	1240	4,56E+00	1,32E+01
313	0,4	102,67	145,52	990	6,59E+00	2,40E+01

Experiment 1. Rectes patró a pH 9 i a pH 5





Experiment 1. Resultats de les rectes patró

Malauradament, alguns dels resultats eren incoherents i estan marcats en vermell. Aquesta incoherència serà comentada a la interpretació i a les conclusions

Mostra		Dilució 1:12	Dilució 1:24
	Temps(min)	Absorbància	Absorbància
PH 5 Temperatura 17°C	45	0,99	0,6
	105	1,07	0,61
PH 5 Temperatura 40°C	45	0,93	0,64
	105	0,87	0,4
PH 9 Temperatura 17°C	45	0,41	0,65
	105	1,1	0,5
PH 9 Temperatura 40°C	45	0,79	0,49
	105	1,3	0,32

Experiment 1. Resultats de la mesura del creixement dels llevats

Mostra	Absorbància a 15min	Absorbància a 45min	Absorbància a 75min	Absorbància a 105min
pH 9 17°C	0,12	0,12	0,2	0,18
pH 9 40°C	0,13	0,17	0,21	0,12
pH 5 40°C	0,15	0,28	0,2	0,13
pH 5 17°C	0,18	0,18	0,19	0,17

8.2.2.L'equilibri a les reaccions químiques

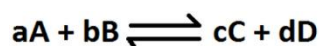
Durant la realització dels experiments de la part pràctica, en què mesuràvem la velocitat de fermentació en funció del pH mitjançant l'augment de pressió pel diòxid de carboni produït, vam enregistrar uns resultats que no concordaven amb la teoria. Aquest fet ens va obligar a revisar escrupolosament els plantejaments inicials per trobar l'errada. Finalment, ho vam aconseguir. A continuació serà explicat el fenomen que no havíem tingut en compte i que va ser el responsable dels resultats incoherents.

Les reaccions químiques són canvis en què un o més reactius es transformen en un o més productes mitjançant la reorganització dels àtoms que els formen. Ara bé, la majoria de les reaccions químiques són reversibles, és a dir, poden ocórrer en ambdós sentits. Així, de la mateixa manera que els reactius es converteixen en els productes, els productes també es transformen en els reactius.

Tanmateix, quan observem una reacció química veiem que una substància es va convertint en una altra fins que la reacció s'atura i les concentracions de cada substància es mantenen constants, és a dir, s'arriba a un estat estacionari. La no variació en la concentració de cada substància podria semblar contradir la idea de reacció reversible; hom esperaria apreciar una ondulació en les concentracions a causa de la interconversió d'una en l'altra.

L'aparent contradicció es resol si considerem que la reacció ha arribat a un equilibri dinàmic. Un estat en què els productes i els reactius es van transformant uns en altres a un ritme tal que el canvi net és zero. La relació de les concentracions dels productes i els reactius quan s'arriba a un equilibri es

representa mitjançant la constant d'equilibri (K), la qual depèn únicament de la temperatura. Matemàticament:

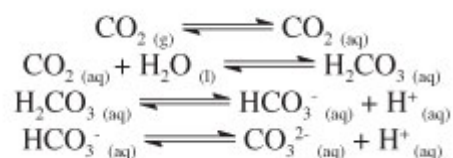


$$K_e = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b}$$

Si la relació entre les concentracions de productes i reactius és major que K, la reacció ocorrerà de dreta a esquerra; en cas contrari, ho farà d'esquerra a dreta.

L'equilibri dels carbonats

A l'aigua carbonatada hi són presents una sèrie de molècules en un equilibri dinàmic. La representació de les reaccions que ocorren és la següent:



A la primera equació hi és representada la dissolució del diòxid de carboni en aigua. En les condicions en què vam realitzar l'experiment, l'equilibri es troba molt desplaçat cap a l'esquerra, és a dir, la quantitat de CO_2 dissolt és petita en comparació amb la que no ho està.

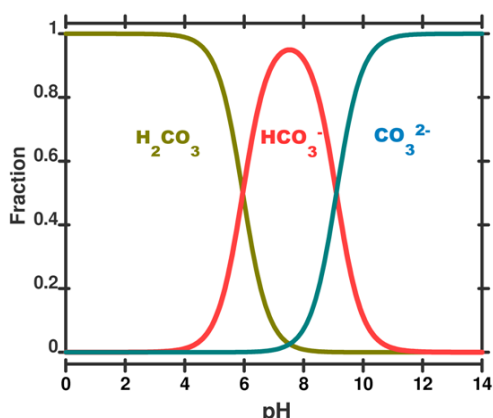
A la segona reacció, l'equilibri de la qual està desplaçat cap a l'esquerra, hi és representada la formació d'àcid carbònic a partir de CO_2 i aigua. L'àcid carbònic és un àcid feble, de manera que la proporció de molècules que es dissocien, que perden un protó, és petita. La desprotonació de l'àcid carbònic, que dóna lloc a bicarbonat, és representada en la tercera equació. A la quarta, hi és representada la segona desprotonació, la proporció de molècules que realitzen la qual és encara més petita.

Al nostre experiment vam variar el pH, la concentració de protons a la dissolució. Si escrivim les expressions per les equacions on intervé el pH podrem observar perquè els resultats que vam obtenir no reflectien allò que ens interessava mesurar. Cal recordar que el nostre objectiu era determinar la velocitat de fermentació a partir de l'augment de pressió produït pel diòxid de carboni en fase gasosa.

$$K_e = \frac{([HCO_3^-][H^+])}{[H_2CO_3]} K_e' = \frac{([CO_3^{2-}][H^+])}{([HCO_3^-])}$$

Com a resultat de variar el pH de les dissolucions vam variar el valors de K. De manera que modificàvem la proporció entre les molècules de diòxid de carboni que passaven a gas i eren enregistrades per nosaltres i les que es convertien en carbonats.

La influència del pH en les concentracions dels carbonats es veu en el següent gràfic:

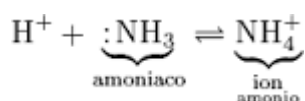


Com es pot apreciar, a pHs baixos la fracció d'àcid carbònic, que es transforma ràpidament en diòxid de carboni, representa pràcticament la totalitat dels carbonats. Conforme va augmentant el pH, però, la proporció d'aquest àcid va disminuint, de manera que el diòxid de carboni produït en la fermentació no passa a gas sinó que es converteix en carbonats, els quals no eren enregistrats al nostre experiment.

L'equilibri amoníac-amoni

Ara ja sabem que la producció de diòxid de carboni no comportava un augment de pressió a pHs bàsics. Tot i així, els nostres sensors enregistraven un augment de pressió, que, de fet, era més gran a pH bàsics que àcids!

Per tal de resoldre aquest misteri hem de tenir en compte un altre equilibri existent a la dissolució: l'equilibri amoníac-amoni. Aquestes substàncies apareixien a la dissolució fruit de la hidròlisi de la urea, la font de nitrogen del llevat. L'equació que representa la interconversió d'aquestes substàncies és la següent i la constant d'equilibri són les següents:



$$K_e = \frac{([NH_4^+])}{([H^+][NH_3])}$$

Com es pot veure, un augment en la concentració de protons significarà un desplaçament de l'equilibri cap a l'amoni i una disminució tindrà l'efecte contrari: la producció d'amoniac, el qual passa en part a fase gasosa. El segon cas era allò que ocorria als nostres experiments. A pHs bàsics, l'amoniac era el responsable de l'augment de pressió captat pels sensors.

Així doncs, finalment hem aclarit l'enigma de l'augment de pressió a pHs bàsics. El culpable no era, com en tota bona novel·la policíaca, aquell qui tothom esperava -el diòxid de carboni- sinó una petita molècula que voltava per l'escena del crim camuflada i de qui ningú no va sospitar res: l'amoniac.

8.2.3. Interpretació dels resultats

Experiment 2

pH

Els pH estudiats són 1,3,5,7,9 i 11. A pH 1 no s'ha observat cap increment significatiu de la pressió durant l'interval de temps mesurat. Aquest fet indica que no hi ha hagut cap augment en la quantitat de CO₂ present a l'erlemeyer com a producte de la reacció. Conseqüentment, podem afirmar que no s'ha produït la fermentació. La raó més probable és que aquest pH tant baix és incompatible amb l'activitat metabòlica del llevat.

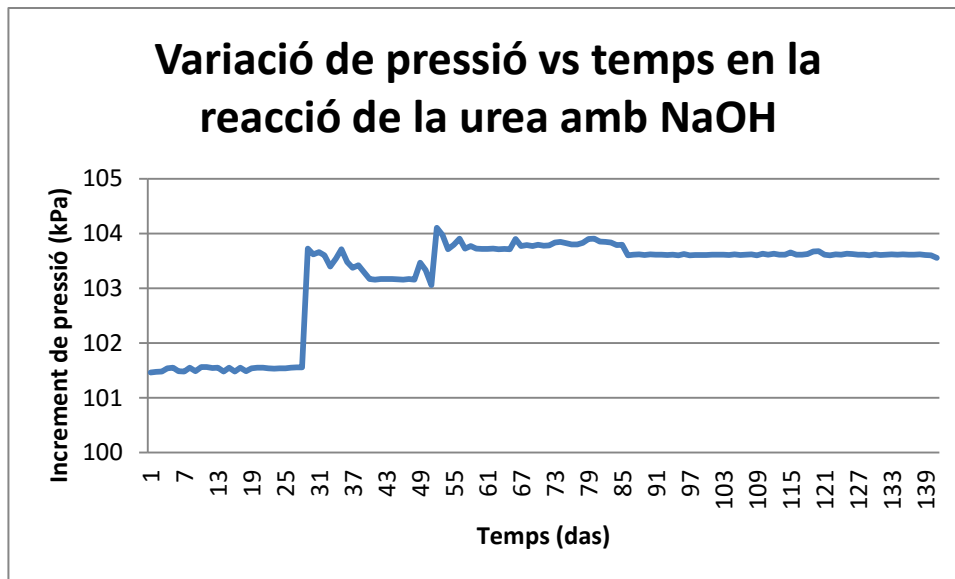
Als altres pH, excepte l'estrany cas del pH 11, sí que s'ha incrementat la pressió i, per tant, podem afirmar que la fermentació ha ocorregut en ells. La velocitat de fermentació, però, ha estat molt menor a pH 3 que als altres pH. Així doncs, aquest pH ha d'estar fora del marc òptim d'actuació dels enzims glicolítics i fermentadors del llevat.

La velocitat no ha tingut variacions importants entre els pH de 5, 7 i 9 però ha estat significativament superior a la de pH 3. Com que en un marge de 4 graus de pH la velocitat és alta i no varia significativament, es pot deduir que el marc òptim d'actuació dels llevats es troba al voltant d'aquests pHs. D'aquesta manera, el llevat treballa degudament sota cadascun d'aquests pH i per això les diferències en la velocitat són petites.

L'augment de pressió, curiosament, ha estat més gran del que

esperàvem a pH 11. Això va en contra de tot el que es sap sobre el pH òptim d'actuació dels enzims implicats en tant la glucòlisi com la fermentació, ja que si el pH òptim es troba al voltant de pHs de 5, 7... és impossible que a pH força superior com ara 11 la velocitat de reacció es dispari. Per poder donar explicació a aquest fet, vàrem haver de reflexionar molt i investigar una mica més. Finalment, vàrem descobrir que l'explicació al nostre problema era l'equilibri químic entre l'àcid carbònic i els carbonats. Efectivament, quan ens trobàvem a pH àcid, la concentració de protons H^+ augmentava i és per això que gairebé tot el CO_2 que es produïa es trobava en forma d'àcid carbònic i aquest es dissociava alliberant el CO_2 gasós que provocava l'augment de pressió que nosaltres mesuràvem. Per contra, quan el medi era de pH bàsic, el nombre de protons H^+ queia en picat i per tant l'equilibri anava en sentit contrari convertint pràcticament tot l'àcid carbònic en carbonats i alliberant gas amoníac que provocava l'augment de pressió que nosaltres observàvem. L'amoníac s'obtenia a partir de la metabolització de la urea per part del llevat i també per la reacció d'aquesta amb l'aigua. A pH àcids, l'amoníac es troba en forma d'ions amoni, que no són gasosos i, per tant, no afecta l'experiment. D'aquesta manera, com que a pHs bàsics entren en joc altres gasos no contemplats en les suposicions inicials necessàries per treure dades útils dels experiments, és necessari desestimar les dades obtingudes a tals pH. En l'experiment tractat, això torna els resultats a pH 9 i 11 no significatius. L'augment de pressió a pH 9 no es va disparar tant com a 11 perquè la quantitat de NaOH present a la solució era molt menor que a 11. Tot i així, tenint en compte aquesta interpretació, no podem afirmar que l'augment de pressió a pH 9 hagi estat únicament causat pel CO_2 produït en la fermentació i per tant, el marge òptim de pH s'ha de trobar al voltant de 5 i 7.

Per demostrar que a pH bàsic la pressió augmenta com a conseqüència d'un gas que no és el CO_2 (l'amoníac), vàrem barrejar una solució d'urea amb NaOH en un matràs erlenmeyer i ho vam connectar al sensor per veure si es produïa un increment de pressió. A continuació s'adjunta el gràfic que ho demostra:



Temperatura

Abans de començar, cal recordar que la temperatura és un factor que influeix en la pressió segons indica l'equació dels gasos ideals ($P \cdot V = n \cdot R \cdot T$). Així que per comparar l'augment de diòxid de carboni a diferents temperatures, s'ha tingut en compte i s'ha descomptat l'augment de pressió degut a temperatura.

Els resultats han indicat que la velocitat de fermentació augmenta conforme ho fa la temperatura. A més, els valors que pren la velocitat en les temperatures de 10, 20 i 30°C encaixen de manera quasi perfecta en una recta, d'equació $v(T) = 0,624T - 176,810$. Aquest fet ens permet predir de manera bastant acurada la velocitat de fermentació per a qualsevol temperatura que es trobi entre 10 i 30°C. El valor a 40°C, però, no s'ajusta a la recta perquè entre ell i el de 30°C el ritme de variació és més ràpid. Així doncs, a 40°C la velocitat de reacció ha estat més alta que en els altres casos. Basant-nos en els resultats anteriors, podem realitzar una explicació d'allò que està ocorrent al nostre cultiu des d'un punt de vista molecular. La temperatura, com ja sabem, està relacionada amb l'energia cinètica mitjana de les partícules. De manera que una temperatura més elevada significarà una velocitat mitjana més alta, la qual resultarà en un major nombre d'interaccions entre els substrats i els enzims implicats en el procés estudiat. Això repercutirà en un augment de la velocitat global de reacció. La correlació entre l'augment de temperatura i l'augment de velocitat de reacció no es manté indefinidament, sinó que té un

límit. Això ocorre perquè en el procés intervenen enzims, l'estructura dels quals es veu modificada a temperatures per sobre d'un cert límit. Per sobre d'aquest límit es corre el risc que els enzims es desnaturalitzin i esdevinguin no funcionals. Tot això acaba resultant en què, tot i que l'augment de temperatura causi un major nombre de contactes enzim-substrat, la velocitat de reacció no augmenti en proporció o, inclús, disminueixi a temperatures molt elevades. De totes maneres, la velocitat de fermentació més elevada dels nostres experiments s'ha donat a 40°C.

Experiment 1.

Abans de tot, és necessari confessar que els resultats d'aquest experiment presenten algunes incongruències que fan que siguin poc concloents. Les raó prové molt probablement d'errors en el procediment, amplificats enormement per la petitesa dels volums amb què s'ha treballat. No obstant això, una quantitat suficient de resultats és aprofitable.

Mostra		Dilució 1:12	Dilució 1:24
	Temps(min)	Absorbància	Absorbància
PH 5 Temperatura 17°C	45	0,99	0,6
	105	1,07	0,61
PH 5 Temperatura 40°C	45	0,93	0,64
	105	0,87	0,4
PH 9 Temperatura 17°C	45	0,41	0,65
	105	1,1	0,5
PH 9 Temperatura 40°C	45	0,79	0,49
	105	1,3	0,32

Com es pot apreciar, entre els resultats obtinguts en les dilucions 1:12 hi ha casos en què l'absorbància, i per tant, la concentració de glucosa, augmenta a mesura que avança el temps. Això no té cap mena de lògica perquè no s'ha afegit en cap moment més sucre al llarg de la fermentació, de manera que estem obligats a menysprear tots aquests resultats.

Els valors obtinguts de les dilucions 1:24 sí que tenen sentit en tots els casos menys en un, per aquest motiu, aquests resultats sí que els podem aprofitar. No obstant això, ens trobem amb un altre problema. Quan fem els càlculs de les concentracions de glucosa a partir de les absorbàncies obtingudes, ens donen valors de concentració superiors a la concentració de glucosa del caldo YPD que constituïa el medi fermentat. Això és degut a possibles errors que ja comentarem més endavant. Tot i així, les dades encara resulten aprofitables, perquè és més que probable que l'error hagi estat el mateix en totes les mostres i per tant, tot i que aquestes absorbàncies no ens serveixen per calcular amb precisió la concentració final de glucosa, sí que ens serveixen per comparar-les entre elles i establir que els casos on l'increment d'absorbància sigui major serà perquè el descens de glucosa també ha estat major.

Temperatura

Si ens limitem a mirar les diferències entre els increments, les diferències no són molt significatives, però si ens hi fixem, en els dos casos a temperatura 40 °C, les absorbàncies al temps 105 són més baixes que als dos casos a temperatura 20°C. Això, malgrat els errors comesos, podria ser degut a que la quantitat de glucosa al temps 105 de les mostres a temperatura 40°C era més petita que a 20°C i per això l'absorbància també. Així que podríem afirmar que temperatures altes al voltant de 40°C augmenten la velocitat de fermentació, la qual cosa concorda amb els resultats obtinguts als altres experiments fets a casa i dels quals s'han extret dades fiables.

pH

La influència del pH és molt poc clara. Els resultats obtinguts no ens permeten pronunciar-nos en cap sentit. Abans de poder determinar la influència del pH en la velocitat de fermentació seria necessari realitzar més experiments. Tot i així, en els experiments fets a casa sí que s'han extret conclusions pel que fa al pH i

estan exposades a l'apartat de conclusions.

Estudi del creixement del llevat al llarg de la fermentació

Mostra	Absorbància a 15min	Absorbància a 45min	Absorbància a 75min	Absorbància a 105min
pH 9 17°C	0,12	0,12	0,2	0,18
pH 9 40°C	0,13	0,17	0,21	0,12
pH 5 40°C	0,15	0,28	0,2	0,13
pH 5 17°C	0,18	0,18	0,19	0,17

Com es pot apreciar, els resultats no guarden cap tipus de consistència. No és possible que la quantitat de substàncies present a la mostra vagi augmentant i disminuint sense seguir cap tipus de patró. Per aquest motiu, hem de suposar que els resultats han estat alterats per errors experimentals i han de ser rebutjats. Es podria especular d'alguna manera amb els resultats, però com no s'han pogut fer rèpliques i la col·lecció de dades és francament petita, no podem extreure conclusions fiables pel que fa a aquest apartat del treball.

8.2.4. Justificació dels errors de mesura

Com s'ha fet evident al llarg de l'experiment número 1 realitzat a la universitat, els resultats no han estat els esperats. S'han obtingut uns resultats en alguns casos incongruents i aquest fet ha de tenir una explicació. Aquesta explicació no és cap altra que els errors que s'hagin pogut cometre al llarg del procediment experimental. En primer lloc, cal considerar que en aquest experiment s'ha treballat amb volums molt petits i que la precisió de la tècnica utilitzada és molt alta. En algunes parts de l'experiment vàrem arribar a treballar amb volums de 10µL, que per fer-nos una idea és el volum pertanyent a mitja gota d'aigua. És per això que és molt fàcil cometre errors al pipetejar. Podria ser que alguna gota de líquid quedés a la punta de la pipeta i això ja alteraria el volum final i conseqüentment els resultats. Un altre error, no tant fàcil d'imaginar però també possible seria que a la part 2 de l'experiment 1, quan vàrem extreure 4 mostres de cada preparació als temps 15, 45, 75 i 105 i les vàrem centrifugar per separar el caldo dels llevats, haguéssim agafat alguna

cèl·lula de llevat per error juntament amb el caldo. Aquest fet hauria suposat que aquestes cèl·lules de llevat haguessin seguit consumint glucosa i això explicaria que en alguns casos la concentració de glucosa al temps 105 sigui major que al temps 15.

8.3.Elaboració de cervesa artesanal

Per finalitzar la part experimental d'aquest treball de recerca, vàrem posar en pràctica els nostres coneixements elaborant la nostra pròpia cervesa artesana. Cal dir que vàrem realitzar dos cops la cervesa. El primer cop el resultat va ser desastrós, perquè vam fer-la a l'estiu i vàrem ser víctimes d'un descontrol de la temperatura que ens va espantillar la cervesa. A les conclusions entendrem el per què d'aquest fet. Per altra banda, el segon cop que vàrem fer cervesa va ser al hivern i per tant vàrem poder controlar bé la temperatura obtenint un bon resultat.



Imatge 41

En primer lloc s'esterilitza tot el material que s'utilitzarà amb un producte anomenat Oxi-pro.



S'esterilitzen les ampolles amb les quals s'envasarà la cervesa.

Imatge 42



Per elaborar el most es necessita una preparació de malta i llúpul.

Imatge 43

Es bull aigua i es posa la preparació de malta i llúpul al bany maria durant 10 minuts.



Imatge 44



Un cop passats els 10 minuts s'aboca tot el contingut de la preparació dins del fermentador.

Imatge 45

S'aboca 1 litre d'aigua calenta a la llauna per acabar d'escurar-la i no perdre sucres de la malta.



Imatge 46



Es torna a abocar tot al fermentador i es remena.

Imatge 47



Imatge 48

Es dissolen 502 grams de sucre en 2 litres d'aigua calenta. Aquest sucre extra ajudarà a augmentar la graduació alcohòlica de la cervesa. Posteriorment s'aboca al fermentador i es remena.



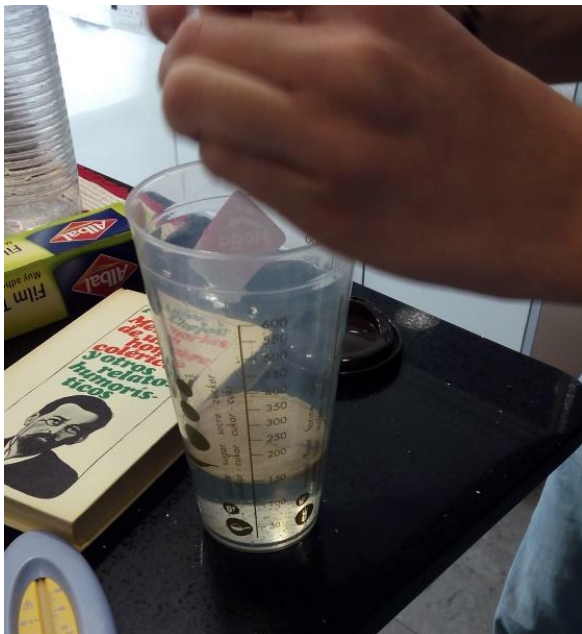
Imatge 49

S'afegeixen 8 litres d'aigua al fermentador i es remena bé fins a obtenir una mescla homogènia.



Imatges 50 i 51

S'extreu una mica de most i es mesura la seva densitat amb un densímetre o hidròmetre. La densitat inicial ha de ser de 1'053 kg/L.



Imatge 52

S'escalfen 150 ml d'aigua a 25°C i s'afegeixen els llevats. Es remena i es deixa reposar durant 15 minuts. Finalment s'aboca al fermentador.



Imatge 53

Es tanca hermèticament del fermentador i es col·loca el tap *air-lock*. Aquest tap deixarà sortir el CO_2 durant la fermentació i impedirà que entri l'aire atmosfèric.



Imatge 54

Finalment es deixa fermentar la cervesa durant 10 dies a temperatura fixa de $18\text{-}20^{\circ}\text{C}$.



Imatge 55

Acabada la fermentació es transvasa la cervesa a un segon bidó.



Imatge 56

S'extreu una mostra de cervesa i es mesura la densitat final. Aquesta ha de ser de 1'01 kg/L.



Es posen 3 grams de sucre a cada ampolla, s'omplen les ampolles de cervesa i es tanquen les ampolles amb les tapes.

Imatge 57



Imatge 58

Per acabar es deixa reposar la cervesa durant 2-3 setmanes. Durant aquest temps, els llevats que han quedat en suspensió a la cervesa fermentaran els 3 grams de sucre que s'han abocat a cada ampolla i produiran el CO₂. Transcorregut aquest temps la cervesa està llesta per consumir.

9.Conclusions

Arribats a aquest punt, és necessari recuperar les nostres preguntes d'investigació.

La primera pregunta plantejava quines eren les condicions de temperatura i pH en què el llevat *Saccharomyces Cerevisiae* duia a terme la fermentació més ràpidament.

"Sota quines condicions de pH i temperatura la velocitat de fermentació de la cervesa és més elevada? "

La hipòtesi respecte a aquesta qüestió era que la velocitat seria major a 20°C i a pH 9. Els nostres experiments no han validat la nostra hipòtesi pel que fa a la temperatura, ja que s'ha demostrat que la velocitat de fermentació a 40°C és major que a 20°C. Malauradament, la influència del pH no l'hem pogut determinar acuradament com a conseqüència de la incoherència d'alguns dels resultats obtinguts a l'experiment 1 i com a conseqüència de l'equilibri químic entre l'àcid carbònic i els carbonats que ens va alterar els resultats de l'experiment 2. Sí que s'ha pogut demostrar que dins dels pHs àcids, com més proper a 7 sigui el pH més ràpida és la fermentació, però no hem pogut demostrar que a pH bàsic la fermentació sigui més veloç perquè el nostre mètode de mesura de la velocitat és l'increment de pressió degut al diòxid de carboni i a pH bàsic el gas amoníac ens esguerra els resultats. Així doncs no podem validar tampoc, aquest cop per falta de dades, que la fermentació sigui major a pH 9 com nosaltres creïem. No obstant això, sí que em pogut extreure conclusions importants pel que fa al pH en la tercera pregunta d'investigació.

Amb la segona pregunta d'investigació preteníem observar l'evolució del creixement del llevat durant la fermentació en diferents condicions per comparar-les entre elles.

"Com varia el creixement del llevat a mida que avança la fermentació en funció de les condicions esmentades anteriorment? "

Aquest experiment el vam intentar per dos mètodes diferents, cap dels quals va tenir èxit. El primer procediment consistia en l'ús d'una cambra de Neubauer per contar el nombre aproximat de cèl·lules de llevat presents a cada

mostra. Tanmateix, l'estat dels llevats, els quals es trobaven apinyats en forma de grumolls, ens va impedir fer ús d'aquesta tècnica. El segon procediment feia ús de l'espectrofotometria per comparar la quantitat de llevats entre diferents mostres. No obstant, els errors al pipetejar que molt possiblement vam cometre ens van impedir extreure'n resultats significatius. En conseqüència, aquesta pregunta es queda sense resposta i la nostra hipòtesi no pot ser ni validada ni rebutjada.

Finalment arribem a la pregunta d'investigació més important de totes. La resposta a la tercera i última pregunta d'investigació ens permet afirmar si les condicions en què la fermentació es produeix de manera més ràpida, són aquelles més adients per l'elaboració de la cervesa.

"Les condicions que afavoreixen una fermentació més veloç impliquen una fermentació òptima per a la fabricació de cervesa?"

Originalment, nosaltres no creïem que la velocitat a què es produís la fermentació tindria cap efecte en les propietats de la cervesa. La nostra hipòtesis, basada en una argumentació més que raonable, consistia en el fet que la fermentació és una reacció química i que per tant, els reactius es converteixen en els productes independentment de la velocitat de reacció. Tot i la lògica de la nostra hipòtesis, la ciència ha guanyat la disputa i els experiments ens han demostrat que estàvem equivocats.

Inicialment creïem que a pH 9 la fermentació seria més veloç. Independentment del fet que no puguem validar amb seguretat la nostra hipòtesis hem trobat experimentalment que per a un resultat de qualitat, la fermentació de la cervesa sempre es fa a pHs àcids. Qualsevol persona que hagi provat la cervesa sap que una cervesa sense CO₂ es pot qualificar de moletes coses menys de bona cervesa. D'aquesta manera, si es realitzés la fermentació de la cervesa a pHs bàsics, com hem demostrat experimentalment, l'equilibri químic es desplaçaria i gran part del CO₂ produït es trobaria en forma de carbonats i no en estat gasos com és necessari. Per aquest motiu la fermentació de la cervesa sempre es fa a pH àcid. Ara bé, dins del marge de pHs àcids (de 6 a 1), sí que podem tenir en compte els resultats obtinguts a l'experiment número 2. A pH 1, com s'ha demostrat, la fermentació no té lloc, i

a pH 3 la velocitat de fermentació és força menor que a pH 5. Així doncs, com la velocitat més alta que hem trobat ha estat a pH 7 i com la fermentació s'ha de fer a pH àcid, podem afirmar que el pH òptim en l'elaboració de la cervesa es troba entre pH 5 i 6.

Pel que fa a la temperatura la cosa es complica. Experimentalment hem trobat que a temperatures de 40°C la velocitat de fermentació és més alta, però la nostra hipòtesi era que la fermentació més veloç seria a 20°C. Recordem que la nostra hipòtesi estava basada en la tendència general dels cervesers a no sobrepassar mai els 20-23 °C de temperatura. Aquest fet, demostra un altre cop que una fermentació més veloç no suposa una fermentació òptima, però la dificultat es troba en trobar el per què. El *què* de l'assumpte es troba en pensar quin efecte pot tenir la temperatura sobre la cervesa o sobre el llevat durant la fermentació. Per tal de trobar una resposta fiable vàrem recórrer a l'Albert Viaplana, el mestre cerveser de la marca Moritz que ens havia fet una visita guiada per les seves instal·lacions mesos enrere i va compartir el seu coneixement i la seva experiència amb nosaltres. El que hem tret en net de les converses amb l'Albert i de la investigació post experimental que hem fet, ha estat que a temperatures altes, el llevat fermenta ràpidament però a la vegada està sotmès a un estrès que el mestre cerveser de la Moritz qualifica d'innecessari i perjudicial per al perfil organolèptic de la cervesa resultant. Recordem a més, que un dels components que més aromes i complexitat donen a la cervesa són els èsters i aquests també juguen el seu paper. Durant una fermentació relaxada, harmònica i a la velocitat adient, els llevats van fermentant els sucres i a la vegada es van produint tot un conjunt d'èsters que milloren les propietats organolèptiques de la cervesa. Aleshores, quan accelerem la fermentació a base d'incrementar la temperatura, la reacció és tant ràpida que molts èsters deixen i produir-se i no només això, sinó que l'estrès del llevat pot induir la producció de determinats èsters que proporcionin mals gustos i males aromes. L'Albert Viaplana ens explicava que en més d'una ocasió ell va provar també d'accelerar la reacció i el resultat va ser un líquid que no s'atreveix a anomenar cervesa degut al mal gust i les males olors que en van resultar. A més a més, podem acabar de corroborar aquest fet amb la nostra pròpia experiència. Nosaltres hem elaborat cervesa a casa en diverses

ocasions, una d'elles va ser a l'estiu i per tant la calor ambiental va suposar un descontrol inevitable de la temperatura. D'aquesta manera, la nostra cervesa va fermentar al voltant dels 30°C. El resultat va ser desastrós. Cal dir que l'aroma no era pas dolent, però no podem dir el mateix del gust, el qual era salat i desagradable.

Un cop discutides les preguntes d'investigació justificarem si hem acomplert o no els diferents objectius que ens vàrem proposar.

1."Estudiar el rerefons històric i cultural de la cervesa."

L'hem acomplert totalment, ja que al llarg d'aquest treball ens hem culturitzat un munt pel que fa a la història de la cervesa, la seva evolució al llarg dels temps i les seves característiques actuals.

2."Conèixer els ingredients i els procediments necessaris per elaborar la cervesa així com ser capaços d'establir les diferències entre l'elaboració industrial i artesanal d'aquesta beguda. " i

3."Conèixer els diferents tipus de cervesa existents i les seves peculiaritats. "

Aquests dos objectius també ha estat assolits, ja que hem estudiat minuciosament les propietats i components de la cervesa i ho hem posat en pràctica elaborant la nostra pròpia cervesa.

4."Estudiar el *Saccharomyces cerevisiae*, el seu metabolisme i les reaccions bioquímiques implicades en la fermentació alcohòlica. "

Tot i que estem molt satisfets dels resultats que hem obtingut i tot i que creiem que hem acomplert l'objectiu, creiem adient esmentar que ens hagués agradat tenir més temps i més recursos per poder aprofundir més en els experiments per tal d'obtenir una col·lecció molt més gran de dades amb què poder treballar i ampliar la investigació.

5."Visitar la fàbrica de la famosa marca barcelonina Moritz per tal de comprendre com es viu l'elaboració de la cervesa en l'àmbit professional i per tal d'ampliar els nostres coneixements sobre aquest procés. "

Vàrem realitzar la visita i ens va servir de molt per ampliar i contrastar la informació de l'apartat d'elaboració de la cervesa. A més, a nivell personal va ser molt enriquidor, ja que ens va proporcionar un munt de dades, curiositats i coneixements nous sobre el món de la cervesa. Al llarg d'aquest treball nosaltres potser hem viscut la cervesa des d'un punt de vista artesanal i per tant, va resultar molt positiu conèixer el món industrial de la cervesa, l'altre cara de la moneda. Sempre és bo veure les coses des de diferents perspectives.

6."Entendre el funcionament de la maquinària moderna de laboratori i les tècniques que usarem a la part experimental. "

En primer lloc volem destacar que l'accés a les instal·lacions de la facultat de bioquímica i biologia molecular de la universitat de Barcelona, així com les col·laboracions amb els doctors Josep Maria Fernandez Novell i Javier Mendez Viera han estat crucials per a la realització d'aquest projecte. En segon lloc podem afirmar que hem assolit l'objectiu i creiem que haver-lo acomplert ha estat una de les coses més importants d'aquest treball tenint en compte que hem guanyat un munt d'experiència de laboratori i hem tingut l'oportunitat d'aprendre noves tècniques i procediments utilitzats actualment en laboratoris d'investigació.

7."Determinar la influència de la temperatura i el pH en la velocitat de fermentació. " i

8 ."Estudiar com varia el creixement del *Saccharomyces Cerevisiae* en funció de les condicions a les quals és sotmès. "

Aquests dos objectius fan referència a les nostres preguntes d'investigació. El primer objectiu, com s'ha comentat prèviament, sí que s'ha assolit. Per altra banda, el segon no ha estat possible tot i que ho vàrem intentar.

9."Elaborar cervesa utilitzant els coneixements adquirits. "

Com hem dit anteriorment, vàrem realitzar la nostra pròpia cervesa artesanal tot aplicant els coneixements adquirits. Cal dir que el resultat no ha estat molt satisfactori, ja que era la primera vegada que vam fer cervesa tot

sols i no vam considerar un parell de factors que eren de crucial importància per a obtenir un producte de bona qualitat. Aquesta insatisfacció ens va portar a tornar a elaborar cervesa, però aquest cop seguint un procediment molt més rigorós i creiem que el resultat ha estat francament millor. Tot i així, no ens donarem per vençuts i seguirem elaborant cervesa i millorant a poc a poc com a productors aficionats.

Finalment podem concloure que, com vàrem afirmar al principi del treball, la cervesa és festa, és diversió i entreteniment però a més a més és ciència. Darrere la cervesa hi ha una immensitat de processos químics i biològics a tenir en compte si es vol arribar a obtenir un bon producte, i a més, com s'ha pogut demostrar en aquesta fase final del treball de recerca, la cervesa és també un art. Així doncs, un bon productor de cervesa no només ha de tenir experiència en el tema sinó que també ha de reunir la curiositat i el rigor d'un científic i la creativitat d'un artesà.

10. Propostes per futurs treballs

Gràcies al nostre treball hem aconseguit donar resposta a moltes de les qüestions plantejades a l'inici del projecte. Tanmateix, el procés mitjançant el qual es descobreixen els principis subjacents a la realitat/recerca no té límit i les respostes a unes preguntes generen qüestions noves, que, per la seva banda, en donaran lloc a altres posteriorment. Això no li treu, en cap cas, importància al procés; al contrari, és la seva pròpia naturalesa infinita allò que li confereix el seu major atractiu. Al cap i a la fi què pot despertar més intriga en l'esperit del curiós que un seguit de misteris que no s'acaben mai?

Amb aquesta idea en ment, proposem unes línies de recerca que esperem que siguin recorregudes en el futur per altres estudiants:

- Investigar com l'estrès que les temperatures altes li produeixen al llevat influencia la qualitat de la cervesa.
- Estudiar quins èsters es produeixen sota l'estrès del llevat i sota les influències de les temperatures altes. Investigar els mecanismes pels quals es produeixen i quines propietats organolèptiques aporten.
- Fer una comparativa entre les propietats de les cerveses artesanes i industrials.
- Estudiar la relació qualitat preu entre diferents cerveses artesanals i industrials, i de fermentació espontània, d'alta fermentació i de baixa fermentació.
- Estudiar la cervesa com a producte mèdic i nutritiu.

11. Bibliografia

Anthony H. Rose, 2a edició (1989) The Yeasts, Volume 3, Metabolism and Physiology of Yeasts

Jeff Hardin , Gregory Paul Bertoni, Lewis J. Kleinsmith, (2012) Becker's world of cell (8th edition)

Webb, T., Beaumont, S.(2012). *Atlas Mundial de la Cerveza*(1 a ed.). Barcelona: Blume.

Nelson, D. - Cox, M. (2009) Lehninger, Principios de Bioquímica

Stenesh, J. (1998). *Biochemistry: Solutions Manual* (1st ed.). Springer Science & Business Media.

11.1 Informació de la xarxa

Retrobat 6 de juny:

http://es.wikipedia.org/wiki/Historia_de_la_cerveza

<http://www.egiptomania.com/vidacotidiana/cerveza.html>

<http://www.civinova.com/2011/02/24/los-primeros-productores-de-cerveza/>

<http://lacienciadelhoy.blogspot.com.es/2012/05/fermentaciones-historicas.html>

<https://www.sabrosia.com/2012/08/los-origenes-historicos-de-la-cerveza/>

<http://www.history.com/news/ask-history/who-invented-beer>

<http://culturillacervecera.blogspot.com.es/2008/03/codigo-de-hammurabi-1692-adc.html>

<http://www.mahou-sanmiguel.com/es-es/cultura-cervecera/historia-de-la-cerveza.html>

Retrobat 7 de juny:

<https://observatoriodelnautilus.wordpress.com/2012/03/08/la-cerveza-los-barbaros-y-la-iglesia-desde-la-antiguedad-tardia-a-la-alta-edad-media/>

<http://cerveciafilo.blogspot.com.es/2014/03/la-cerveza-en-la-edad-media.html>

<http://historiasdelahistoria.com/2013/09/05/la-cerveza-medieval-lupulo-frente-a-gruyt>

http://www.shyraz.es/r_cerv_historia.html

Retrobat 13 de juny:

<http://cervesaencatala.blogspot.com.es/2009/12/estils-o-tipus-de-cervesa.html>

<http://www.cervezainternacional.net/>

<http://www.directoalpaladar.com/otras-bebidas/tipos-de-cerveza>

Retrobat 3 de juliol:

<http://seresmodelicos.csic.es/llevat.html>

<http://www.unavarra.es/genmic/micind-2-1.htm>

Retrobat 5 de juliol:

<http://www.sebbm.com/revista/articulo.asp?id=4823&catgrupo=262&tipocom=24>

www.cervezadeargentina.com

<http://www.fabricarcerveza.es>

<http://www.cervezas.info/>

<http://cervezartesana.es/>

<http://www.cervebel.es/>

Retrobat al 23 de juliol

<http://www.compoundchem.com/2015/01/27/maillardreaction/>

http://datateca.unad.edu.co/contenidos/301203/301203/leccin_36_pardeamiento_no_enzimtico.html

<http://sciencegeist.net/the-maillard-reaction/>

<http://chemwiki.ucdavis.edu/>

<http://www.csun.edu/~jm77307/Glycolysis.pdf>

<http://www.nicholls.edu/biol-biol155/Lectures/Glycolysis%20&%20Respiration%202.pdf>

Retrobat al 16 d'agost

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373162/pdf/microrev00047-0150.pdf>

Retrobat al 27 de setembre

<http://www.uv.mx/personal/aherrera/files/2014/05/L.-Ley-de-Bouguer-Lambert-Beer-0.pdf>

11.2.Fonts complementaries

Ref. QuèQuiCom, programa de TV3

Ref. Visita a Moritz S.A.

11.3. Bibliografía d'imatges:

Imatge 1. [http://www.taringa.net/posts/info/18219421/Conoce-la-historia-de-la-
cerveza.html](http://www.taringa.net/posts/info/18219421/Conoce-la-historia-de-la-cerveza.html)

Imatge 2. [http://cervezartesana.es/tienda/blog/la-cerveza-de-babilonia-o-la-
conocida-como.html](http://cervezartesana.es/tienda/blog/la-cerveza-de-babilonia-o-la-conocida-como.html)

Imatge 3. <http://webs.xadica.cat/cervesaencatala/102-hist-resum.html>

Imatge 4. [http://cerveteca-jab.blogspot.com.es/2012/06/cerveza-y-mitologia-los-
vikingos.html](http://cerveteca-jab.blogspot.com.es/2012/06/cerveza-y-mitologia-los-vikingos.html)

Imatge 5. [http://historiasdelahistoria.com/2013/09/05/la-cerveza-medieval-
lupulo-frente-a-gruyt](http://historiasdelahistoria.com/2013/09/05/la-cerveza-medieval-lupulo-frente-a-gruyt)

Imatge 6. <http://www.oktoberfest.net/cerveza-oktoberfest/>

Imatge 7. [http://www.vanitatis.elconfidencial.com/estilo/2012-03-06/damm-la-
historia-de-una-cerveza-con-estrella_546248/](http://www.vanitatis.elconfidencial.com/estilo/2012-03-06/damm-la-historia-de-una-cerveza-con-estrella_546248/)

Imatge 8. [http://www.coldcoolbeer.com/blogs/news/7371330-la-revolucion-de-
la-cerveza-artesana](http://www.coldcoolbeer.com/blogs/news/7371330-la-revolucion-de-la-cerveza-artesana)

Imatge 9. Presa per nosaltres.

Imatge 10. [http://www.directoalpaladar.com/cultura-gastronomica/la-reaccion-
de-maillard](http://www.directoalpaladar.com/cultura-gastronomica/la-reaccion-de-maillard)

Imatge 11. Presa per nosaltres.

Imatge 12. Presa per nosaltres.

Imatge 13. <http://es.malteurop.com/nuestra-actividad/maltas/malteado>

Imatge 14. [http://nutricionalas6.blogspot.com.es/2015/03/como-se-hace-la-
cerveza.html](http://nutricionalas6.blogspot.com.es/2015/03/como-se-hace-la-cerveza.html)

Imatge 15. Presa per nosaltres.

Imatge 16. <http://www.swanbournecellars.com.au/what-is-a-lambic-beer/>

Imatge 17. <http://www.theaustralian.com.au/life/food-wine/beers-for-all-seasons/story-e6frg8jo-1226518159465>

Imatge 18. <http://www.verema.com/blog/Cervezas/1106501-5-destinos-europeos-para-amantes-cerveza>

Imatge 19. Presa per nosaltres.

Imatge 20. Presa per nosaltres.

Imatge 21. Presa per nosaltres.

Imatge 22. Presa per nosaltres.

Imatge 23. <http://www.cervezadeargentina.com.ar/procesos/embotellado.html>

Imatge 24. <http://seresmodelicos.csic.es/llevat.html>

Imatge 25. <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectf03am/lect11.htm>

Imatge 26. Presa per nosaltres.

Imatge 27. Presa per nosaltres.

Imatge 28. Presa per nosaltres.

Imatge 29. Presa per nosaltres.

Imatge 30. Presa per nosaltres.

Imatge 31. Presa per nosaltres.

Imatge 32. Presa per nosaltres.

Imatge 33. Presa per nosaltres.

Imatge 34. Presa per nosaltres.

Imatge 35. Presa per nosaltres.

Imatge 36. Presa per nosaltres.

Imatge 37. Presa per nosaltres.

Imatge 38. Presa per nosaltres.

Imatge 39. Presa per nosaltres.

Imatge 40. Presa per nosaltres.

Imatge 41. Presa per nosaltres.

Imatge 42. Presa per nosaltres.

Imatge 43. Presa per nosaltres.

Imatge 44. Presa per nosaltres.

Imatge 45. Presa per nosaltres.

Imatge 46. Presa per nosaltres.

Imatge 47. Presa per nosaltres.

Imatge 48. Presa per nosaltres.

Imatge 49. Presa per nosaltres.

Imatge 50. Presa per nosaltres.

Imatge 51. Presa per nosaltres.

Imatge 52. Presa per nosaltres.

Imatge 53. Presa per nosaltres.

Imatge 54. Presa per nosaltres.

Imatge 55. Presa per nosaltres.

Imatge 56. Presa per nosaltres.

Imatge 57. Presa per nosaltres.

Imatge 58. Presa per nosaltres.

12.Agraïments

Aquest projecte no hauria estat possible sense la inestimable col·laboració de:

La nostra tutora del treball de recerca, l'ajuda de la qual ens ha estat incalculable. A més, la seva imponderable orientació ha resultat crucial per la finalització del document que teniu a les mans.

Albert Viaplana, mestre cerveser de la Moritz i guia durant la nostra visita a l'antiga fàbrica d'aquesta companyia qui ens ha ajudat a resoldre diferents dubtes que hem tingut al llarg del treball.

Finalment, cal esmentar que al llarg de tot el treball hem tingut la gran oportunitat de comptar amb l'ajuda i el suport dels doctors en bioquímica i microbiologia Josep Maria Fernández Novell i Javier Méndez Viera, de la Universitat de Barcelona. A més de compartir el seu coneixement amb nosaltres, ens van obrir les portes dels seus laboratoris per realitzar la part pràctica del nostre treball i van posar a la nostra disposició unes instal·lacions totalment inaccessibles per a nosaltres en circumstàncies normals.

