

## ÍNDEX

|                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| DADES DEL CENTRE .....                                                                                     | 4  |
| RESUM I PARAULES CLAU .....                                                                                | 4  |
| INTRODUCCIÓ .....                                                                                          | 5  |
| 1. Producció de cervesa.....                                                                               | 5  |
| 2. Fermentació alcohòlica i llevats.....                                                                   | 6  |
| 3. Àcids grassos.....                                                                                      | 8  |
| 4. Ciclodextrines.....                                                                                     | 10 |
| 5. Ús de les ciclodextrines en fermentació del vi .....                                                    | 11 |
| HIPÒTESIS DE TREBALL I OBJECTIUS .....                                                                     | 12 |
| METODOLOGIA.....                                                                                           | 14 |
| 1. Estudi de l'efecte de les ciclodextrines en la fermentació i el creixement i viabilitat cel·lular ..... | 14 |
| 2. Anàlisi de les característiques químiques.....                                                          | 16 |
| RESULTATS I DISCUSSIÓ.....                                                                                 | 17 |
| 1. Efecte de les ciclodextrines en la cinètica fermentativa .....                                          | 17 |
| 2. Efecte de les ciclodextrines sobre la població de cèl·lules totals i viables .....                      | 19 |
| 3. Efecte de les ciclodextrines sobre la mortalitat cel·lular.....                                         | 21 |
| 4. Anàlisi de les característiques químiques: Sucres .....                                                 | 23 |
| 5. Anàlisi de les característiques químiques: Glicerol .....                                               | 26 |
| 6. Anàlisi de les característiques químiques: Etanol.....                                                  | 27 |
| CONCLUSIONS .....                                                                                          | 29 |
| BIBLIOGRAFIA .....                                                                                         | 32 |
| AUTOAVALUACIÓ .....                                                                                        | 34 |
| AGRAÏMENTS.....                                                                                            | 35 |

## DADES DEL CENTRE

Aquest treball de final de grau s'ha dut a terme gràcies a la col·laboració amb el grup de recerca Tecnologia Enològica, també anomenat TECNENOL, present en el departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili.

El grup d'investigació s'especialitza en l'estudi del vi i les seves característiques físico-químiques, com la estabilitat química i microbiana, anàlisis sensorial, estudi de proteïnes i polifenols, producció de vi espumós, etc...

## RESUM I PARAULES CLAUS

En la indústria de la cervesa, generalment trobem que es fan fermentacions successives on es reutilitzen els llevats encarregats del procés metabòlic. Aquesta dinàmica de fermentació s'anomena repicatge i permet estalviar diners i temps i obtenir un producte homogeni derivat d'una mateixa població de llevats. No obstant, aquesta fermentació en sèrie acaba estressant els microorganismes disminuint els rendiments i cinètiques fermentatives i el creixement i viabilitat cel·lular. Aquests efectes negatius poden comportar parades de fermentació o contaminació d'altres espècies de microorganismes. En estudis anteriors del grup de recerca s'ha vist que en la fermentació de vi, l'ús de ciclodextrines, uns oligosacàrids cíclics capaços d'encapsular molècules hidrofòbiques, millora la cinètica fermentativa en presència d'àcids grassos, encapsulant-los de forma que es redueix l'estrès i la toxicitat en el medi. S'ha observat que l'ús de les ciclodextrines en el repicatge de cervesa millora la velocitat i nivell de fermentació, obtenint valors superiors que el grup control, pel que s'hipotetitza que les ciclodextrines puguin encapsular productes tòxics en el medi, fins i tot més enllà dels àcids grassos, mantenint les funcions metabòliques dels llevats per poder seguir una comportament fermentatiu òptim.

Paraules claus: Cervesa, ciclodextrina, àcids grassos, fermentació alcohòlica, *repitching*, *Saccharomyces cerevisiae*.

## INTRODUCCIÓ

### 1. Producció de cervesa

La fermentació industrial del most cerveser usa llevats com biocatalitzadors cel·lulars centrals. Tanmateix, una pràctica habitual a l'indústria cervesera es que aquestes cèl·lules son reutilitzades de forma prolongada en processos discontinus successius, formant una dinàmica de treball anomenada repicatge en sèrie ("repique" en castellà o *repitching* en anglès) (1). Com es pot observar en la Figura 1, un cop acabada la fermentació, la cervesa s'extreu i els microorganismes sedimenten i reutilitzen per fermentacions posteriors (2).

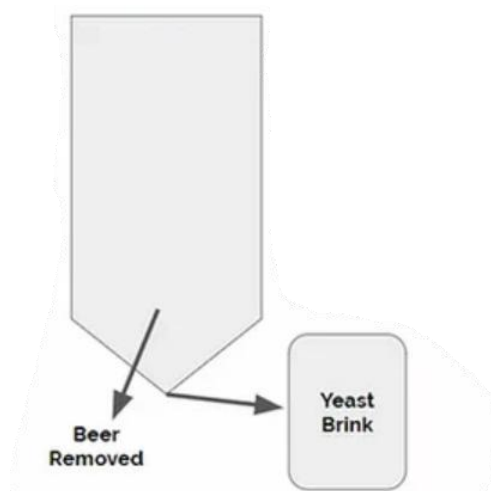


Figura 1: Il·lustració adaptada d'un mètode de repicatge extret de "A Practical Guide to Yeast *Repitching*"

El nombre de reutilitzacions possibles depèn de diferents factors, com la soca utilitzada, la qualitat del llevat, la densitat original del most i la política de l'empresa (3). Tot i això, aquest procés ve limitat per la degeneració cel·lular, la pèrdua de floculació de les cèl·lules, l'envelliment cel·lular, contaminacions microbiològiques, etc... que comporta la disminució del rendiment i la cinètica fermentativa (1). L'estat fisiològic del llevat determina l'eficiència de la fermentació i la qualitat del producte biotecnològic final.

En resum, el repicatge presenta certs avantatges com la reducció del temps tant en propagació de microorganismes com en la fermentació del most de cervesa. No obstant, s'ha de dur a terme de forma acurada per tal d'evitar afectacions cel·lulars, tant genètiques, morfològiques o metabòliques, que poden acabar perjudicant les qualitats organolèptiques del producte final (2).

## 2. Fermentació alcohòlica i llevats

Els llevats són microorganismes heteròtrofs que obtenen l'energia necessària per les funcions vitals a partir de sucres presents en el medi. A més, són els microorganismes productors d'etanol més usats en l'àmbit de begudes fermentades(2). Per poder introduir els sucres en les seves rutes metabòliques, els llevats catabolitzen la glucosa mitjançant la glicòlisi. D'aquesta forma, les cèl·lules obtenen energia en forma d'ATP i NADH i intermediaris com el piruvat. El destí final del piruvat difereix segons la disponibilitat d'oxigen i glucosa al medi. D'una banda, la Figura 2 mostra com en condicions anaeròbiques, els llevats fermenten produint etanol que alliberen al medi. D'altra banda, en condicions aeròbiques, els llevats fan la respiració produint diòxid de carboni i aigua. Tan mateix, en alguns casos, encara que hi hagi presència d'oxigen, la respiració cel·lular queda suprimida per un fenomen anomenat efecte Crabtree. Aquest efecte és present en el llevat per excel·lència del procés fermentatiu, *Saccaromyces cerevisiae*. Aquest llevat, a concentracions altes de glucosa, metabolitza els sucres gairebé exclusivament per via fermentativa. Usant aquest llevat en mosts rics en sucres, podem assegurar-nos de que aconseguirem un procés fermentatiu (4)

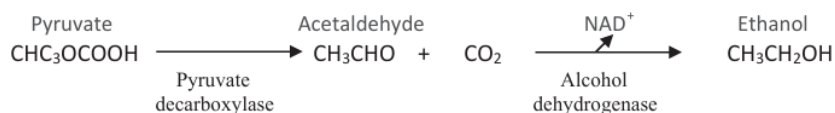


Figura 2: Il·lustració de la ruta fermentativa en llevats i els enzims i intermediaris que hi participen (5)

*Saccaromyces cerevisiae* catabolitza la glucosa obtenint piruvat. La fermentació comença amb la descarboxilació d'aquest en acetaldehid gràcies a l'enzim piruvat descarboxilasa. Seguidament, l'acetaldehid, mitjançant l'alcohol deshidrogenasa, pot reduir-se a etanol, gràcies a la despesa d'un NADH provinent de la glucòlisi. D'aquesta forma es regenera el NAD<sup>+</sup>, formant un cicle de reciclatge de poder reductor entre els dos processos metabòlics. La regeneració de NAD<sup>+</sup> al final de la fermentació permet obtenir un equilibri redox on la proporció NADH/NAD<sup>+</sup> es manté inalterada, tal com mostra la Figura 3. Des del punt de vista energètic, la combinació de la glucòlisi i la fermentació alcohòlica proporciona al llevat un guany net de dues molècules d'ATP per cada molècula de glucosa catabolitzada (5).

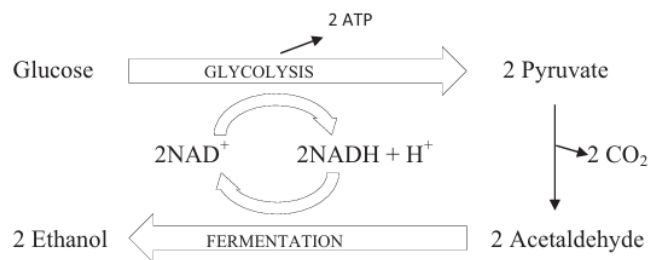


Figura 3: Reaccions enzimàtiques presents en les rutes metabòliques dels llevats, glucòlisi i fermentació (5)

D'altra banda, els llevats també poden conservar el seu equilibri redox durant la fermentació dels sucres mitjançant la síntesi de glicerol, procés en què el NAD<sup>+</sup> es regenera a través del fosfat de dihidroxiacetona dins la via glucolítica. Aquest procés es denomina fermentació gliceropirúvica, tal com representa la Figura 4 (5)

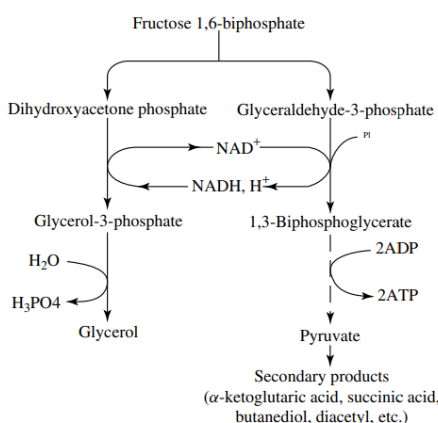


Figura 4: Ruta metabòlica gliceropirúvica (4)

En resum, en la via fermentativa, la formació d'etanol i CO<sub>2</sub>, la generació d'energia cel·lular (ATP), el manteniment del balanç redox i la multiplicació del llevat són processos íntimament relacionats. De fet, la velocitat de fermentació depèn fortament del ritme de creixement cel·lular del llevat (5)

Pel que fa a les condicions ambientals òptimes per a la fermentació alcohòlica, els llevats prosperen en entorns càlids i àcids. Les soques més habituals de *Saccharomyces cerevisiae* presenten un bon creixement en rangs de temperatura compresos entre els 20 i 30 °C, i en valors de pH entre 4,5 i 6,5 (6)

En el procés de fermentació de la cervesa, inicialment el most consta d'alta densitat, donat que es ric en sucres (principalment maltosa, i en menor mesura

glucosa, sacarosa, fructosa i maltotriosa). A mesura que avança el procés fermentatiu, els llevats transformen els sucres en alcohol i CO<sub>2</sub>, disminuint la densitat del most. Paral·lelament, també té lloc la formació d'altres compostos i subproductes que influiran decisivament en el perfil aromàtic i gustatiu de la cervesa. Els llevats que fermenten també contribueixen a l'acidificació del medi de cultiu. Això es deu a diversos mecanismes com la secreció de protons durant el transport de nutrients, l'alliberament d'àcids orgànics, la desaparició d'agents tamponadors i l'emissió de diòxid de carboni, que quan es dissol contribueix a abaixar encara més el pH del medi.

El creixement dels llevats implica el transport i l'assimilació de nutrients, que posteriorment s'incorporen a diverses estructures cel·lulars, permetent així l'increment de la biomassa i la divisió cel·lular. L'objectiu principal d'una cèl·lula de llevat no és produir alcohol, sinó reproduir-se. Tot i això, en els processos de fermentació de begudes, el creixement del llevat i la producció d'etanol estan estretament relacionats. L'etanol es genera com a part del mecanisme per mantenir l'equilibri redox i obtenir prou ATP per sostenir el creixement. De fet, la producció eficient d'etanol depèn d'un creixement actiu del llevat (6).

Quan les cèl·lules de *S. cerevisiae* s'inoculen en un medi fresc i es mantenen sota condicions òptimes, segueixen una corba típica de creixement que inclou: una fase de latència (adaptació fisiològica), una fase exponencial (duplicació cel·lular ràpida i constant), i una fase estacionària (aturada del creixement). Un cop finalitzada la fermentació, s'entra en la fase de maduració, durant la qual es deixa reposar el producte permetent que els llevats i altres substàncies en suspensió sedimentin, ajudant a clarificar la cervesa. En aquesta etapa també s'ajusten algunes característiques organolèptiques com l'aroma i el gust (6).

### **3. Àcids grassos**

En la via fermentativa s'obtenen principalment etanol i diòxid de carboni. Tanmateix, també es generen alguns subproductes del metabolisme del llevat com poden ser el glicerol, àcids, èsters, aldehids, àcids grassos... Entre aquests es destaca l'efecte tòxic dels àcids grassos, especialment els de cadena mitjana (MCFAs). Aquests àcids grassos de cadena mitjana es produeixen en condicions de baixa oxigenació i afecten al procés fermentatiu en un medi amb etanol i pH

àcid. La seva toxicitat ve donada per l'alteració de la membrana dels llevats fermentadors, generant estrès oxidatiu. Los MCFAs, altament lipofílics, poden interactuar amb la bicapa lipídica, el que disminueix la estabilitat d'aquesta afectant principalment la seva permeabilitat. En aquestes condicions, la homeòstasis cel·lular i el transport de nutrients es veu severament afectat. A més, en condicions de pH àcid, típic en fermentacions, els MCFAs travessen la membrana en la seva forma protonada i s'ionitzen a l'interior cel·lular, disminuint el pH intracel·lular causant estrès metabòlic i enzimàtic (7)

Entre els diferents MCFAs, destaquen els següents amb diferent nivells de toxicitat segons la molècula. L'efecte inhibidor augmenta amb la llargada de la cadena de carbonis (8):

- Àcid octanoic (C8): S'acumula en la paret cel·lular i pot ser expulsat per proteïnes transportadores, pel que l'impacte intracel·lular es menor i la seva toxicitat no és tan elevada.
- Àcid decanoic (C10): Alta capacitat de penetració en l'interior cel·lular, acumulant-se en el citoplasma i causant estrès cel·lular i danys oxidatius. Es veuen afectacions a nivell mitocondrial i peroxisomal.
- Àcid dodecanoic (C12): Màxima toxicitat, afecta la viabilitat cel·lular causant aturades de fermentació.

Finalment, aquests compostos es troben de manera natural en alguns substrats fermentatius i poden influir en la viabilitat i la taxa de creixement dels llevats utilitzats en processos industrials com la producció de cervesa i vi. A mesura que augmenta la concentració d'àcid octanoic i decanoic, s'observa una inhibició significativa del creixement del llevat. En concentracions elevades, el creixement és pràcticament nul donat que la integritat de la membrana cel·lular està compromesa, afectant el metabolisme cel·lular i la funció mitocondrial (8).

Quan es reutilitza llevat procedent de fermentacions anteriors per iniciar una nova fermentació, pot aparèixer un fenomen conegut com a "fermentació encallada". Aquest problema sol produir-se quan el llevat no disposa de compostos que són essencials per al seu creixement. En l'elaboració de vi, algunes investigacions apunten que certs àcids grassos de cadena mitjana, com ara l'àcid decanoic o l'àcid octanoic sintetitzats pel mateix llevat, podrien estar

implicats directament en l'aparició de fermentacions que s'aturen prematurament (9)

#### **4. Ciclodextrines**

Les ciclodextrines (CD) són una família de oligosacàrids cíclics formats per unitats de  $\alpha$ -D-glucopiranososa lligades per enllaços  $\alpha$ -1,4 glicosídics. Aquests oligosacàrids són d'origen natural, donat que deriven de la biotransformació enzimàtica del midó gràcies a microorganismes. El nombre de molècules de glucosa enllaçades varia, formant diferents subgrups d'aquestes molècules. Les ciclodextrines més habituals són l'alfa-ciclodextrina (amb sis unitats de glucosa), la beta-ciclodextrina (amb set unitats) i la gamma-ciclodextrina (amb vuit unitats), conegudes com les ciclodextrines natives (10).

Aquestes molècules han sigut de gran interès científic en els darrers anys donat per la seva versatilitat alhora de ser usades com sistemes de transport o “carriers” per l'administració de compostos bioactius en diversos àmbits, dels quals destaquen la medicina, l'alimentació i la cosmètica (11). La seva capacitat de transport ve donada per la seva estructura toroidal. A nivell estructural, presenten una forma de con truncat amb la cavitat interna apolar (hidrofòbica) i la superfície externa polar (hidrofílica) causada per la disposició dels grups hidroxils.

D'una banda, aquesta cavitat apolar els permet encapsular substàncies hidrofòbiques o poc solubles (10,11). La unió de la molècula transportadora amb molècules apolars forma complexos d'inclusió, representats en la Figura 5. Aquests complexos es formen quan una molècula, de mida adequada, queda encaixada dins la cavitat de la ciclodextrina. La mida de la cavitat esdevé un factor clau per la formació d'aquest complex d'inclusió. A més de la mida, la formació d'aquest complex ve donada per una constant d'equilibri d'associació/dissociació entre la molècula hidrofòbica, la ciclodextrina i el complex d'inclusió. Com les interaccions són febles, la unió del complex es reversible i pot ser propens a dissociar-se. Aquesta capacitat encapsuladora permet protegir els compostos de condicions adverses de forma que poden ser preservats en aquests “envasos actius” durant el processament del producte, millorant algun aspecte de la qualitat o la seguretat (12).

D'altra banda, la superfície externa hidrofílica va que la molècula interactuï fàcilment amb l'aigua, conferint una bona solubilitat del complex d'inclusió que forma amb les molècules lipofíliques que encapsula (12).

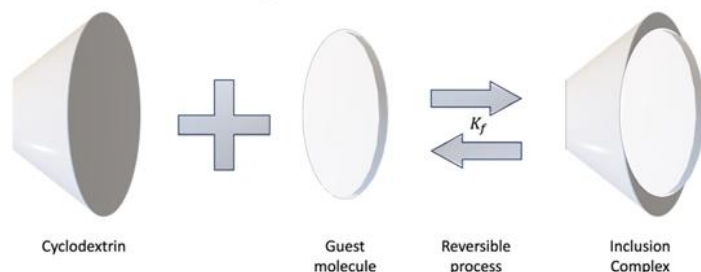


Figura 5: Il·lustració esquemàtica de la capacitat encapsuladora de les ciclodextrines i la formació dels cossos d'inclusió (12)

Encara que actualment l'aplicació de les ciclodextrines està centrada en la seva capacitat per transportar molècules, el seu ús s'estén més enllà de la funció de "*drug carrier*". La formació de cossos d'inclusió pot permetre disminuir la biodisponibilitat de certes molècules en el medi, pel que poden aportar millores o beneficis en el producte final. S'ha observat que les ciclodextrines poden esdevenir coadjuvants enològics, de forma que s'afegeixen en el procés de fabricació del vi per millorar-ne la qualitat o el procés tecnològic, però sense perjudicar les característiques organolèptiques del producte final (13).

## 5. Ús de les ciclodextrines en fermentació del vi

Les ciclodextrines s'han usat prèviament en altres estudis del grup de recerca TECNENOL com molècules encapsuladores de àcids grassos. En el treball de fi de Grau de l'alumna Nadia Gregori, es va analitzar l'efecte de les ciclodextrines en diferents grups experimentals i condicions, i també amb diferents subtipus de ciclodextrines (14). D'aquesta manera es va poder determinar quina de les diferents ciclodextrines influïa més en la cinètica fermentativa.

Entre els diferents resultats de la investigació, es remarca que la alfa-ciclodextrina és la més eficient, i que per tant serà usada en el experiment que es constata a continuació. La concentració d'alfa-ciclodextrina i d'àcids grassos usats en aquest precedent seran replicats en el procediment a continuació. No obstant, s'ha de tenir en compte que tot i que comparteixen el mateix procés fermentatiu mitjançant microorganismes, les begudes difereixen en matèria prima, condicions de fermentació, característiques de producte final...

D'una banda, la cervesa es fermenta amb un most de cereals (ordi maltejat, aigua i llúpol) que conté principalment maltosa però també glucosa, sacarosa, fructosa i maltotriosa, esmentat anteriorment. Aquests sucres provenen de la hidròlisi del midó durant el procés de maceració del malt. És una fermentació més ràpida donat que la concentració d'alcohol final es menor. Les cerveses comercials oscil·len entre un 4% i un 6% vol. d'alcohol, encara que hi ha estils que poden superar el 10%. En la fermentació el pH disminueix fins assolir valors de 4-4.5 (9).

D'altra banda, el vi es fermenta amb most de raïm (varietats de *Vitis vinífera*), que conté glucosa i fructosa de forma natural i en proporcions variables segons la maduració del fruit. El most de raïm sol ser més àcid, pel que en la fermentació finalment s'obté un pH d'entre 2,9 i 4. Aquesta acidesa més elevada en el vi contribueix tant a la seva estabilitat microbiològica com al seu perfil sensorial. Pel que fa al grau alcohòlic, el vi presenta habitualment una graduació alcohòlica compresa entre el 11% i el 15% vol., depenent del tipus de raïm, la zona de cultiu i les pràctiques enològiques. Això comporta una fermentació més llarga per poder assolir concentracions d'etanol majors (15).

En resum, tot i compartir la base comuna de la fermentació alcohòlica, la cervesa i el vi difereixen clarament en els substrats utilitzats, el perfil de sucres, la microbiologia implicada, les condicions de fermentació i els paràmetres fisicoquímics finals, configurant dues begudes amb identitats pròpies tant des del punt de vista tecnològic com organolèptic. Per aquest motiu, els valors i comportaments descrits en les dades bibliogràfiques esmentades anteriorment s'han d'interpretar amb precaució a l'hora d'aplicar-los al camp cerveser. Així doncs, s'utilitzen com a referència inicial o punt de partida, amb la previsió de revisar, ajustar i validar els resultats obtinguts mitjançant experimentació específica amb cervesa, a mesura que avanci el desenvolupament del projecte (9,15).

## **HIPÒTESIS DE TREBALL I OBJECTIUS**

En tot l'exposat a la introducció i segons els resultats previs de l'experiment realitzat per l'alumna Nadia Gregori al grup de recerca TECNENOL, la hipòtesi que ens plantejem és:

L'ús de ciclodextrines pot millorar la cinètica fermentativa del procés de fermentació alcohòlica de la cervesa, arribant a pal·liar l'estrès metabòlic que pateixen els llevats degut al procés de el *repitching*.

Per comprovar la hipòtesis postulada, l'objectiu és estudiar l'efecte de les ciclodextrines en diferents condicions, al llarg de diverses fermentacions:

- Estudiar l'efecte de les ciclodextrines sobre la cinètica fermentativa en els diferents cicles de *repitching*.
- Estudiar l'efecte de les ciclodextrines sobre la viabilitat cel·lular dels llevats responsables del procés de la fermentació alcohòlica durant els successius cicles fermentatius.
- Estudiar l'efecte de les ciclodextrines sobre la composició química de la cervesa obtinguda en els diferents cicles de fermentació.

## METODOLOGIA

### **1. Estudi de l'efecte de les ciclodextrines en la fermentació i el creixement i viabilitat cel·lular**

En l'estudi de l'efecte de les ciclodextrines en la fermentació de cervesa, es va fer amb most proporcionat per la cervesera artesana "Les clandestines", prèviament pasteuritzat. Es guarda el most congelat i es descongela un dia abans de ser utilitzat. El mateix dia es centrifuga el most per tal d'evitar grumolls i tenir un most el més homogeni possible.

D'altra banda, es prepara la solució inicial dels llevats (*Saccharomyces cerevisiae*), proporcionat per la cervesera (LalBrew BRY-97™, Lallemand Bio SL, Barcelona). Aquesta solució inicial es anomenada peu de cuba en el sector enològic i biotecnològic i es un cultiu inicial de microorganismes (normalment llevats o bacteris) que s'ha preparat i activat prèviament per inocular un cultiu principal o una fermentació a gran escala. En el nostre cas, per preparar el peu de cuba, es pesa un 10% de llevats respecte el volum usat. S'agafa una mostra i es fa comptatge del nombre de microorganismes totals, per poder calcular la població que s'inocularà a les diferents fermentacions. Finalment s'obté un peu de cuba de  $7,9E8$  cèl·lules/mL. D'aquest peu de cuba s'inocularà a cada medi de fermentació 1 mL, d'aquesta forma s'aconsegueix tenir una població inicial al voltant de  $3,4E6$  cèl·lules/mL.

Seguidament, es preparen les fermentacions. S'omplen 12 ampolles amb 200 mL del most centrifugat, de forma que tenim quatre condicions diferents amb triplicats per cada grup experimental: grup control (C), grup ciclodextrina (CD), grup àcids grassos (AG) i grup ciclodextrina - àcids grassos (CD-AG). Seguint la bibliografia i els resultats de Nadia Gregori (14), la concentració de cada component al medi de fermentació és de 200 mg/L d'alfa ciclodextrina (en el cas del grup CD i CD-AG) i 15 mg/L d'àcid octanoic, 5 mg/L d'àcid decanoic y 1 mg/L d'àcid dodecanoic (en el cas del grup AG i CD-AG). Tenint en compte aquests valors, es preparen unes solucions mare de ciclodextrina (en aigua) i d'àcids grassos (en etanol). El procediment és el següent, i queda il·lustrat en la Figura 6:

- En el grup control (C) s'afegeixen 200 mL de most i 1 mL de la solució amb els llevats. A més, per obtenir les mateixes condicions, s'afegeix 1 mL d'aigua i 1 mL d'etanol.
- En el grup ciclodextrines (CD) s'afegeixen 200 mL de most, 1 mL de llevats i 1 mL de solució de alfa-ciclodextrina. S'afegeix 1 mL d'etanol per compensar.
- En el grup d'àcids grassos (AG) s'afegeixen 200 mL de most, 1 mL de llevats i 1 mL de solució d'àcids grassos. S'afegeix 1 mL d'aigua per compensar.
- En el grup d'àcids grassos-ciclodextrina (AGCD) s'afegeixen 200 mL de most, 1 mL de llevats, 1 mL d'àcids grassos i 1 mL de ciclodextrina.

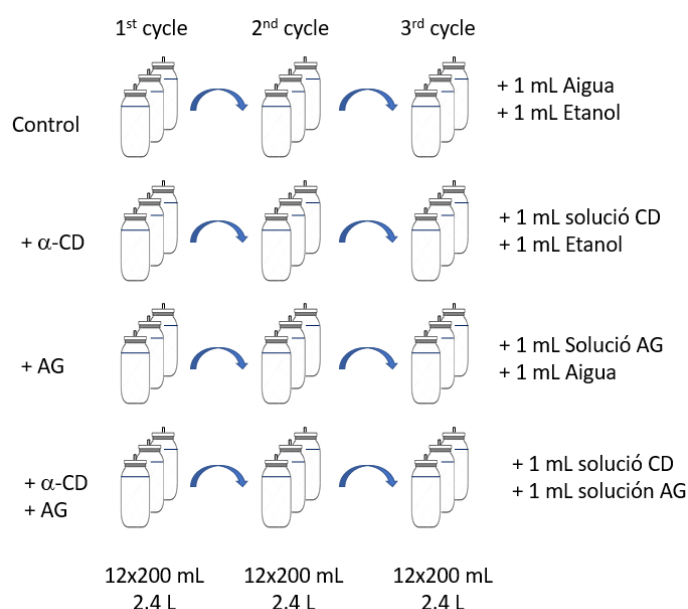


Figura 6: Il·lustració del procediment a seguir per posar en marxa les fermentacions dels diferents grups experimentals

Es fa un seguiment diari de la cinètica fermentativa mitjançant la mesura de la densitat del most amb ajuda del densímetre. La mesura de la densitat també ens ajuda a saber quan la fermentació ha finalitzat, donat que els valors de la densitat deixen de disminuir i resten constants. D'altra banda, es fa el comptatge diari de les poblacions de llevats, usant la tinció amb rodamina B i la cambra de Neubauer per tal d'avaluar la viabilitat cel·lular. La rodamina B és un colorant fluorescent que davant una membrana danyada o amb poca integritat, pot entrar fàcilment a l'interior cel·lular i unir-se a components en el citoplasma, provocant la tinció

intracel·lular de les cèl·lules no viables. En canvi, en cèl·lules vives amb la bicapa lipídica intacta, el colorant no pot entrar i per tant, no es tenyeixen de rosa (16)

Al final de cada fermentació, es guarda el producte final (cervesa ja fermentada) i es congela per poder avaluar les característiques químiques. També es guarda una mostra del most inicial per poder comparar el producte final respecte l'inicial. A cada mostra se li afegeix metabisulfit per poder aturar la fermentació i per les seves característiques antimicrobianes, antioxidants i protectores (17).

## **2. Anàlisi de les característiques químiques**

Per poder analitzar les característiques químiques de la cervesa, entre les quals destaquen la concentració de sucres, glicerol i etanol, es van usar dos procediments diferents.

D'una banda, s'usa l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography), una cromatografia líquida a alta pressió, que utilitza bombes per fer passar la fase mòbil a través de la columna a pressions elevades. Això permet una separació molt precisa i ràpida dels components d'una mescla complexa (18). Aquest tipus de cromatografia permetrà obtenir els nivells de glucosa, fructosa, etanol i glicerol. Les mostres s'han de filtrar prèviament per obtenir una matriu prou neta per poder ser analitzada per l'aparell automàtic. Les mostres s'injecten en l'aparell i seguidament s'obté un cromatograma on s'integra manualment cada pic. D'aquesta forma l'àrea del pic integrada es pot correlacionar amb concentració mitjançant l'ús de rectes patró

D'altra banda, s'usa un kit enzimàtic (AZUCARES GAB - Materias Reductoras Rebelein AAZ) per quantificar els sucres residuals presents en la cervesa fermentada. Com s'ha mencionat anteriorment, els primers sucres en ser hidrolitzats són glucosa i fructosa, més simples. No obstant, la cervesa consta de maltotrioses i altres sucres complexos que consten de més dificultat alhora de ser utilitzats pel metabolisme. En aquest kit es segueixen uns passos per hidrolitzar els sucres complexos i finalment es fa una valoració per retrocés fins poder quantificar els sucres presents en la matriu. El volum de valorant usat en la volumetria es correlaciona de forma inversament proporcional a la concentració de sucres presents en la matriu.

## RESULTATS I DISCUSSIÓ

Per estudiar els possibles efectes que pot tenir l'aplicació de ciclodextrines en la fermentació, es deixa fermentar el most i cada dia es fan anàlisis per poder fer un seguiment diari del procés.

### 1. Efecte de les ciclodextrines en la cinètica fermentativa

La Figura 7 presenta els resultats de densitat al llarg dels diferents cicles de fermentació per tal d'estudiar la cinètica fermentativa d'aquests cicles.

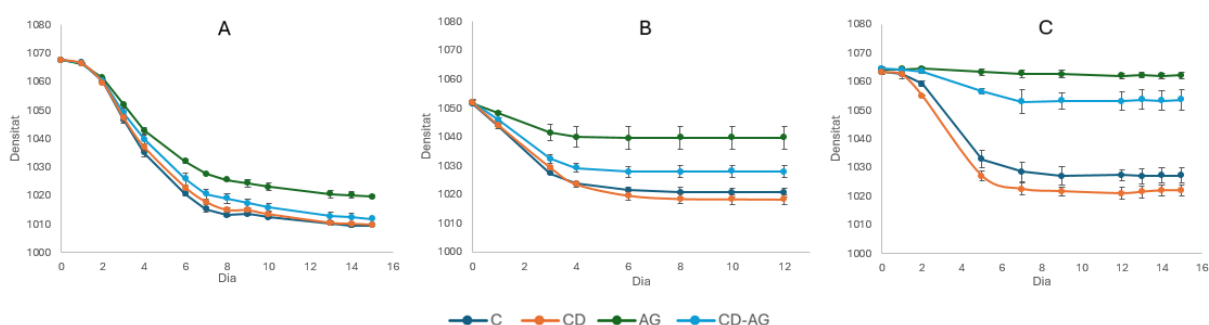


Figura 7: Gràfics de les cinètiques fermentatives al llarg de tres fermentacions successives. Apareix una llegenda de colors segons el grup experimental, sent C el grup control, CD el grup ciclodextrines, AG el grup àcids grassos i CD-AG el grup ciclodextrines - àcids grassos.

Pel que fa la primera fermentació (Figura 7.A), els quatre grups experimentals parteixen del mateix valor de densitat. Evolucionen de forma semblant els primers dies, sense diferències significatives, observant-se una fase de latència igual per totes les condicions. No obstant, a mesura que avança la fermentació, s'observa un retard significatiu en el grup que conté els àcids grassos (AG). D'aquesta forma es confirma que l'addició d'àcids grassos de cadena mitjana (MCFA) al medi afecta a les capacitats metabòliques dels llevats i per tant, al procés fermentatiu. Pel que fa el grup experimental CD-AG, s'observa que l'ús de ciclodextrines en un medi ric en MCFA permet una millora de la cinètica fermentativa respecte la condició AG, obtenint unes densitats semblants al control a partir del dia 4. No obstant, s'observa un lleuger retard d'aquesta condició respecte el control.

En la comparativa entre el grup control (C) i el grup amb ciclodextrines (CD), no es veu cap millora del grup tractat respecte el control. S'hipotetitza que les ciclodextrines per sí soles no garanteixen cap millora en aquest primer cicle fermentatiu, donat que probablement la quantitat de molècules tòxiques al medi

és baixa (encara no s'han donat suficients cicles fermentatius per trobar unes condicions perjudicials pels llevats).

Pel que fa l'efecte de les ciclodextrines en la segona fermentació (Figura 7.B), s'observa que en aquest cicle el most parteix d'una densitat menor que l'anterior (cicle 1) i que la fermentació és cinèticament més ràpida, no observant-se una fase de latència dels llevats ja que són actius metabòlicament. Pel que fa el grup tractat amb àcids grassos, s'observa que la fermentació està quasi del tot aturada. En aquest sentit, en el primer cicle la densitat en el grup AG disminueix fins 1020,0 aproximadament. En canvi, en aquest segon cicle no aconsegueix baixar la densitat per sota dels 1040,0. De forma semblant veiem un retard en la cinètica fermentativa del grup CD-AG, essent aquest retard major respecte el grup control, a diferència del cicle 1 en el qual les cinètiques eren pràcticament iguals. Aquesta tendència permet hipotetitzar que, al llarg del temps i dels cicles fermentatius, les ciclodextrines no acaben de pal·liar els efectes negatius dels àcids grassos com per mantenir les funcions metabòliques dels llevats d'una forma semblant a les del grup control. Finalment, la comparativa entre el grup control (C) i el de ciclodextrines (CD) ens mostra com les ciclodextrines presenten una millora en quant a la cinètica fermentativa respecte al control. Aquesta millora no s'observava en el primer cicle, i encara que en aquest segon cicle no presenta una diferència enormement significativa, es pot suposar que l'efecte de les ciclodextrines és més beneficiós i evident en aquest segon cicle donat que les cèl·lules poden estar sota un estrès major o amb dificultats per mantenir el seu estat metabòlic. S'avaluarà el seguiment d'aquesta tendència en un tercer cicle fermentatiu.

Finalment, pel que fa a l'evolució de la densitat del most al llarg de la tercera fermentació (Figura 7.C), s'observa que el procés fermentatiu en el grup tractat amb àcids grassos està totalment aturat. No s'observa cap canvi en les densitats al llarg del cicle, hipotetitzant que el metabolisme cel·lular dels llevats està greument afectat. El grup CD-AG presenta un retard significatiu en la fermentació essent més pronunciat que en el cas dels cicles anteriors (cicles 1 i 2). El procés no està aturat però ja no segueix la mateixa tendència de recuperació com en el primer cicle. En aquesta tercera fermentació es postula que l'efecte de les

ciclodextrines per recuperar la situació quan hi ha MCFA al medi es significatiu en el primer cicle. A partir del segon i tercer, la davallada metabòlica i les afectacions que poden causar aquests compostos perjudicials no poden ser pal·liats per les ciclodextrines. Per l'altra banda, aquest tercer cicle mostra diferències significatives entre el grup control i el grup ciclodextrines. El grup control mostra una cinètica de densitats més pausada en comparació a les ciclodextrines. Aquest grup tractat consta d'una fermentació més ràpida arribant a valors de densitats més petits. Això ens confirma que les ciclodextrines presenten una millora de les capacitats metabòliques dels llevats a mesura que passen les fermentacions i aquests es veuen afectats per les quantitats d'etanol al medi i el desgast de les seves funcions, pal·liant la davallada de rendiment que es veu en el control.

## **2. Efecte de les ciclodextrines sobre la població de cèl·lules totals i viables**

A continuació s'avalua l'efecte de les diferents condicions sobre les poblacions de cèl·lules recollides diàriament, fent ús de la cambra de Neubauer i la tinció amb Rodamina B. Els resultats obtinguts queden il·lustrats en les gràfiques presents en la Figura 8. Els resultats de població s'analitzaran de forma conjunta donat que tant la dinàmica de cèl·lules vives com la de totals és la mateixa, seguint la mateixa tendència en cada fermentació.

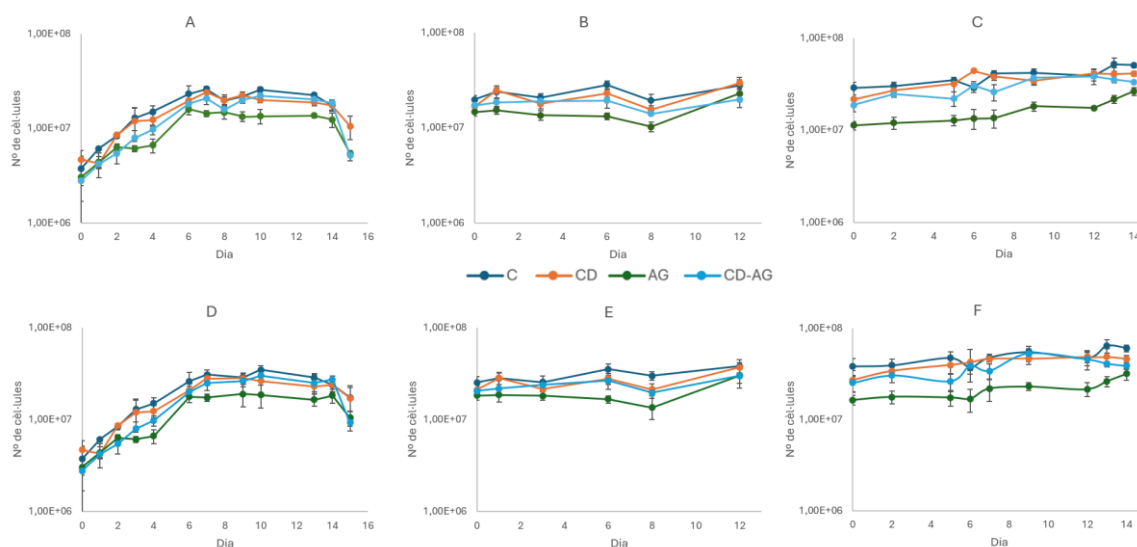


Figura 8: Gràfics de les cinètiques poblacionals al llarg de tres fermentacions successives. Les figures A, B i C corresponen al nombre de cèl·lules vives en la primera, segona i tercera fermentació. Les figures D, E i F corresponen al nombre de cèl·lules totals en la primera, segona i tercera fermentació. Apareix una

llegenda de colors segons el grup experimental, sent C el grup control, CD el grup ciclodextrines, AG el grup àcids grassos i CD-AG el grup ciclodextrines-àcids grassos.

Pel que fa el nombre de cèl·lules vives i totals durant la primera fermentació, representades en les Figures 8.A i 8.D respectivament, s'observa un patró típic de creixement. En els primers dos dies, el creixement és lent donat que les cèl·lules es troben en la fase de latència. En aquesta fase, els llevats s'estan adaptant al nou medi. Hi ha molta síntesi de components cel·lulars per tal d'activar el metabolisme, però no hi ha una divisió cel·lular significativa. En els següents dies, els llevats entren en la fase exponencial, on comencen a dividir-se i a créixer de forma significativa. El nombre de cèl·lules augmenta al trobar-se en un medi ric en nutrients i unes condicions òptimes per créixer i dividir-se. Finalment, a partir del dia 7, les cèl·lules deixen de créixer i es manté constant el nombre de llevats, arribant a la fase estacionària del creixement. En aquesta fase, el nombre de cèl·lules es manté estable mentre es van exhauint els nutrients i es van acumulant els residus i tòxics en el medi. Això comporta l'entrada de la fase de mort o declivi en els últims dies, on el nombre de cèl·lules vives disminueix dràsticament. En aquestes condicions, el nivell d'etanol al medi es eleva i el nombre de sucres i nutrients es molt baix.

En aquest primer cicle, en el grup amb suplementació d'àcids grassos (AG) es pot veure una lleugera reducció en el creixement cel·lular dels llevats, el qual ens estaria corroborant que els MCFA són tòxics per als llevats. El fet que el creixement dels llevats en grup CD-AG sigui molt similar als grups C i CD confirma l'efecte positiu de les ciclodextrines per pal·liar els efectes tòxics que tenen els MCFA sobre els llevats. Aquest resultat, aniria en consonància amb els resultats de cinètica fermentativa presentats a la Figura 7.A.

A continuació, tal com s'observa en la Figura 8, la dinàmica de creixement cel·lular durant la segona i la tercera fermentació segueix la mateixa tendència general: una població inicial de llevats elevada (al voltant de  $2,13 \times 10^7$  cèl·lules totals aproximadament), ja adaptada al medi, activa metabòlicament i preparada per dur a terme la fermentació, la qual cosa evita l'aparició d'una fase de latència. Aquesta adaptació prèvia comporta una fermentació més ràpida en comparació amb la primera fermentació.

En ambdues fases fermentatives, el grup suplementat exclusivament amb àcids grassos (AG) presenta un recompte de cèl·lules totals i viables inferior respecte als altres grups. Aquesta disminució de la població no sembla ser causada per un augment de la mortalitat cel·lular, sinó per un estrès derivat dels àcids grassos, que afecta principalment la permeabilitat de la membrana cel·lular i interfereix amb el creixement i la divisió dels llevats. Això es tradueix en una menor població activa i un rendiment fermentatiu reduït, com es mostra també a les corbes cinètiques. Tanmateix, la incorporació de ciclodextrines en el medi (grup CD-AG) sembla contrarestar parcialment els efectes nocius dels àcids grassos. En aquest grup, el recompte de cèl·lules viables és superior al del grup AG, i assoleix valors similars als del grup control i CD, la qual cosa indica un efecte protector de les ciclodextrines en ambients amb concentracions elevades de MCFA. Tanmateix, tot i recuperar-se la capacitat de creixement i divisió, el rendiment metabòlic no arriba completament al nivell dels grups control o ciclodextrines, fet que explicaria els retards observats en la cinètica fermentativa.

Així doncs, la variabilitat de la cinètica fermentativa no es deguda a una disminució o augment en la població de cèl·lules viables. Aquest fet indica que la toxicitat del medi per part dels àcids grassos i l'efecte pal·liatiu de les ciclodextrines no estarien afectant a viabilitat cel·lular sinó a l'estat metabòlic d'aquest llevats, probablement a través d'afectacions en la permeabilitat de membrana (esmentat anteriorment en la introducció). Malgrat que la població de llevats en la segona i tercera fermentació mostra una tendència comuna pel que fa a la dinàmica de creixement, les diferències en la composició del medi, especialment la presència d'àcids grassos i el paper modulador de les ciclodextrines, condicionen l'activitat metabòlica i el comportament fermentatiu dels llevats.

### **3. Efecte de les ciclodextrines sobre la mortalitat cel·lular**

Per completar la informació sobre l'estat metabòlic i cel·lular dels llevats, es fa recompte del nombre de cèl·lules mortes i es calcula el % de mortalitat al llarg dels diferents cicles, representat en la Figura 9.

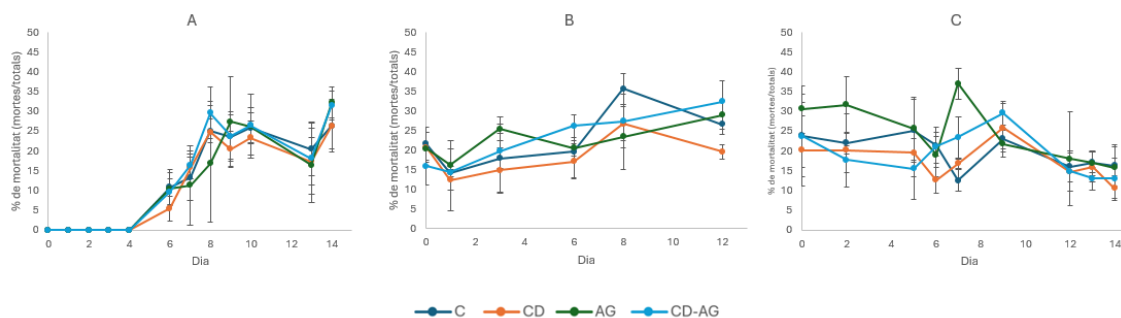


Figura 9: Gràfics del % de mortalitat al llarg de tres fermentacions successives, mitjançant la divisió de cèl·lules mortes entre les totals. Apareix una llegenda de colors segons el grup experimental, sent C el grup control, CD el grup ciclodextrines, AG el grup àcids grassos i CD-AG el grup ciclodextrines-àcids grassos.

Com podem observar, en la primera fermentació (Figura 9.A), totes les fases de creixement esmentades en l'apartat anterior es confirmen amb l'augment del percentatge de mortalitat dels llevats al llarg que avança la fermentació. En els primers dies, com les cèl·lules creixen i es divideixen, no hi ha cap cèl·lula morta. A mesura que s'esgoten els nutrients i es va produint la fermentació, en que es genera etanol, el nombre de cèl·lules mortes respecte les totals augmenta dràsticament, augmentant-se el % de mortalitat, representat a la Figura 9.A. Un fet a tenir en compte es que no s'observen diferències significatives entre els grups en aquest primer cicle fermentatiu en quant al percentatge de mortalitat. Aquest fet corrobora que els àcids grassos no produïrien la mortalitat cel·lular sinó que inhibirien el creixement cel·lular i produïrien l'estrès metabòlic.

Tal com s'observa a la Figura 9.B, el % de mortalitat registrat en els diferents grups al llarg de la segona fermentació presenta una lleugera variabilitat. Aquesta dispersió en els resultats és atribuïble a l'error experimental en el comptatge al microscopi. Tot i aquesta variabilitat, l'anàlisi global de les dades corrobora la hipòtesi plantejada prèviament: no s'observa un percentatge de mortalitat més elevat en els grups tractats amb àcids grassos en comparació amb els controls. Al contrari, els valors mitjans de mortalitat es mantenen dins d'un rang similar entre grups, i la tendència general apunta a una resposta comparable al llarg del procés. Aquest comportament homogeni suggereix que, en les condicions assajades, la presència d'àcids grassos no té un efecte advers rellevant sobre la supervivència dels microorganismes durant la segona fermentació.

Tal com es mostra a la Figura 9.C, el percentatge de mortalitat observat durant la tercera fermentació presenta una elevada dispersió, especialment en les fases

més avançades del procés. Aquesta variabilitat pot atribuir-se al progressiu esgotament dels nutrients, a l'acumulació de subproductes tòxics com l'etanol, així com a les diferències individuals entre rèpliques derivades de la naturalesa biològica del sistema. Tot i aquestes fluctuacions, no s'observa cap increment sostingut en la mortalitat associat a la presència d'àcids grassos, ja sigui amb o sense l'addició de ciclodextrines. De fet, els valors mitjans de mortalitat es mantenen dins un rang semblant al dels grups control, sense indicar un efecte tòxic rellevant atribuïble als compostos afegits.

Així, els resultats obtinguts en aquesta tercera fermentació reforcen la idea que la toxicitat dels àcids grassos en el sistema no afecta a la viabilitat cel·lular, sinó al rendiment metabòlic. De la mateixa manera, la presència de ciclodextrines no modifica substancialment la supervivència cel·lular en aquesta etapa final del procés fermentatiu, sinó que estarien millorant les capacitats metabòliques.

#### 4. Anàlisi de les característiques químiques: Sucres

Primerament, es van analitzar els sucres totals presents en les mostres. Per fer-ho, s'analitzen la glucosa, fructosa pel HPLC i posteriorment es van analitzar els sucres totals previs a inversió, en el qual es determina tant la glucosa com la fructosa com aquells sucres compostos que després de la seva hidròlisi podrien ser fermentats pel llevats. D'aquesta forma, s'obté la Taula 1 a continuació, on hi ha el recopilatori dels resultats analitzats.

**Taula 1: Il·lustració representativa dels valors de sucres obtinguts en les diferents fermentacions i per les diferents condicions experimentals. Totes les dades corresponen a la mitjana aritmètica  $\pm$  desviació estàndard. Lletres diferents indiquen l'existència de diferències significatives ( $p < 0.05$ ), sent les minúscules la comparativa entre grups experimentals en una mateixa fermentació. Les majúscules comparen les diferències en un mateix grup experimental al llarg de les fermentacions.**

| Glucosa (g/L) |                 |                 |   |   |                 |   |                 |   |                 |
|---------------|-----------------|-----------------|---|---|-----------------|---|-----------------|---|-----------------|
| Cicle         | M               | C               |   |   | CD              |   | AG              |   | CD-AG           |
| 1             | 8,41 $\pm$ 0,20 | 0,30 $\pm$ 0,12 | a | A | 0,20 $\pm$ 0,02 | a | 0,04 $\pm$ 0,08 | a | 0,14 $\pm$ 0,05 |
| 2             | 5,25 $\pm$ 1,66 | 0,00 $\pm$ 0,01 | a | A | 0,00 $\pm$ 0,00 | a | 0,00 $\pm$ 0,00 | a | 0,00 $\pm$ 0,00 |
| 3             | 6,00 $\pm$ 0,19 | 0,09 $\pm$ 0,12 | a | A | 0,10 $\pm$ 0,09 | a | 2,16 $\pm$ 2,09 | a | 0,00 $\pm$ 0,00 |

| Fructosa (g/L) |                 |                 |   |   |                 |   |                 |   |                 |
|----------------|-----------------|-----------------|---|---|-----------------|---|-----------------|---|-----------------|
| Cicle          | M               | C               |   |   | CD              |   | AG              |   | CD-AG           |
| 1              | 1,43 $\pm$ 0,39 | 0,13 $\pm$ 0,03 | a | A | 0,14 $\pm$ 0,03 | a | 0,10 $\pm$ 0,03 | a | 0,10 $\pm$ 0,02 |
| 2              | 0,45 $\pm$ 0,35 | 0,15 $\pm$ 0,00 | b | A | 0,11 $\pm$ 0,04 | b | 0,02 $\pm$ 0,03 | a | 0,05 $\pm$ 0,05 |
| 3              | 0,48 $\pm$ 0,16 | 0,10 $\pm$ 0,02 | a | A | 0,10 $\pm$ 0,04 | a | 2,17 $\pm$ 0,19 | c | 0,39 $\pm$ 0,31 |

| Sucres previ a inversió (g/L) |                  |                  |   |   |                  |   |                  |   |                  |
|-------------------------------|------------------|------------------|---|---|------------------|---|------------------|---|------------------|
| Cicle                         | M                | C                |   |   | CD               |   | AG               |   | CD-AG            |
| 1                             | 86,50 $\pm$ 2,12 | 7,73 $\pm$ 0,15  | a | A | 7,73 $\pm$ 0,31  | a | 18,70 $\pm$ 1,27 | c | 9,57 $\pm$ 0,55  |
| 2                             | 74,50 $\pm$ 4,95 | 20,70 $\pm$ 0,57 | b | B | 16,85 $\pm$ 2,90 | a | 37,13 $\pm$ 1,29 | d | 28,90 $\pm$ 2,40 |
| 3                             | 90,50 $\pm$ 6,36 | 23,70 $\pm$ 5,37 | b | B | 11,05 $\pm$ 5,16 | a | 71,00 $\pm$ 0,02 | d | 55,50 $\pm$ 0,71 |

En la Taula 1 s'observen els valors de sucres presents en el most inicial per cada fermentació. S'ha de tenir en compte que, encara que el most utilitzat en els cicles 1 i 3 consten de concentracions de sucres previ a inversió pràcticament iguals, el most emprat en la segona fermentació consta de nivells menors, el que repercutirà en la composició química del producte final. Tanmateix, per mostrar els resultats de forma clara i concisa, es genera un gràfic (Figura 10) per poder observar la concentració de sucres al final de cada fermentació i comprendre la dinàmica de les fermentacions realitzades.

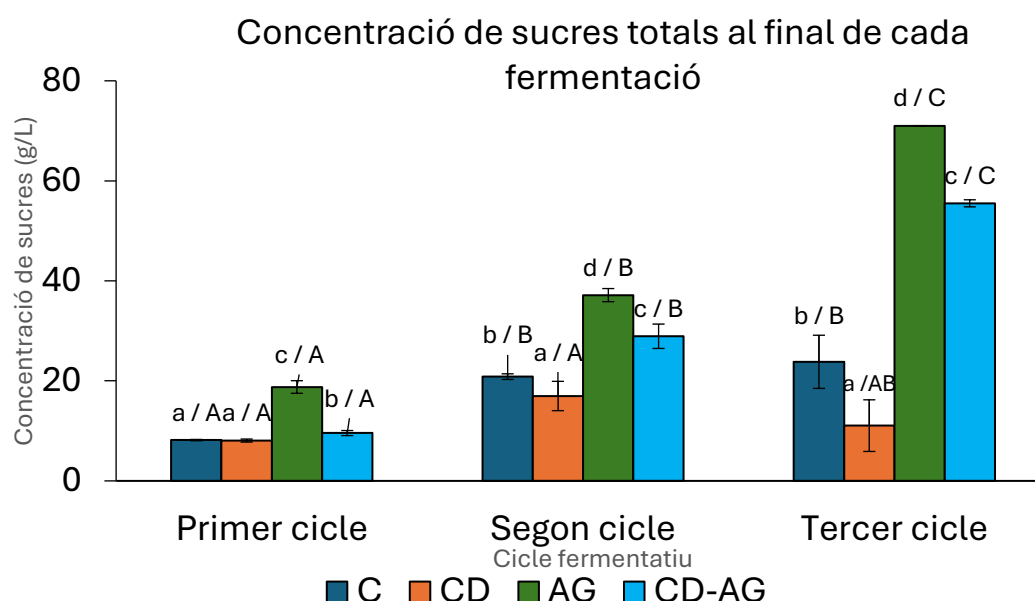


Figura 10: Il·lustració representativa dels valors de sucres totals (glucosa, fructosa, previ a inversió) obtinguts en les diferents fermentacions i per les diferents condicions experimentals. Totes les dades corresponen a la mitjana aritmètica  $\pm$  desviació estàndard. Lletres diferents indiquen l'existència de diferències significatives ( $p < 0.05$ ), sent les minúscules la comparativa entre grups experimentals en una mateixa fermentació. Les majúscules comparen les diferències en un mateix grup experimental al llarg de les fermentacions.

Pel que fa els sucres en la primera fermentació, tal com mostra la Taula 1, s'observen uns nivells de glucosa i fructosa baixos, significativament iguals en totes les condicions. Això indica que els llevats han utilitzat els sucres simples com primer substrat fermentable, donat la seva accessibilitat. No obstant, hi ha certes diferències en aquells sucres complexos que han de ser hidrolitzats per poder ser metabolitzats pel llevat. Pel que fa el grup control (C) i ciclodextrines (CD), el nivell de sucres és el mateix, tal com s'observa a la Figura 10. Això es correspon amb la Figura 7 esmentada anteriorment, on la cinètica fermentativa dels dos grups era gairebé igual, obtenint unes densitats idèntica al final de

fermentació. D'altra banda, el grup CD-AG presenta uns nivells lleugerament més alts de sucres prèvia inversió. Per últim, el grup d'àcids grassos ja presentava una densitat del most més elevada, amb una aturada de la fermentació. Aquest fet queda representat amb uns nivells de sucres totals molt més elevats que la resta de grups. Seguint la hipòtesis, es postula que la toxicitat dels àcids grassos provoca una disminució del rendiment metabòlic dels llevats provocant una aturada de fermentació, fins i tot en una situació on encara hi ha sucres presents al medi.

Anteriorment, en la segona fermentació s'ha observat una aturada de la fermentació en el grup AG, i una millora de la cinètica fermentativa del grup CD respecte el grup control (Figura 7). Pel que fa els nivells de sucres en aquesta fermentació, veiem que la glucosa i fructosa lliures s'han exhaurit per complet en tots els grups. Tanmateix, els sucres previ a inversió presenten diferències significatives entre els grups. La millora del rendiment fermentatiu en el grup CD es correlaciona amb uns nivells de sucres complexos menors, el que ha permès avançar més la fermentació. El grup control presenta una quantitat de sucres lleugerament major que el grup CD, i es confirma amb una fermentació on la densitat no havia assolit el seu mínim possible. El grup CD-AG presenta encara més sucres complexos en solució, el que implica que la fermentació no ha avançat tant i que l'efecte protector de les ciclodextrines comença a disminuir davant un entorn amb alta concentració de substàncies tòxiques. Finalment, el grup AG és el grup amb més presència de sucres previ a inversió i al mateix temps, el grup que presenta la major aturada fermentativa respecte els demés. Es confirma que la presència d'àcids grassos en solució afecta al rendiment i metabolisme dels llevats, el que provoca que no puguin hidrolitzar i utilitzar els sucres més complexos provocant l'aturada del procés i un producte que no ha completat la fermentació.

En aquest últim cicle fermentatiu, s'observa una tendència semblant a l'anterior. No obstant, pel que fa els sucres més simples, veiem que el grup AG no ha pogut metabolitzar certa part de la glucosa i la fructosa. Això confirma la hipòtesi de que a mesura que avancen les fermentacions successives en un medi amb compostos perjudicials pels llevats, aquests perden la capacitat metabòlica d'aprofitar els nutrients del medi i continuar el procés fermentatiu. Això es

tradueix en un augment del nivell de sucres aprofitables en el medi i una disminució en la cinètica fermentativa del procés. En quant al grup CD i C, presenten el mateix nivell de glucosa i fructosa. Tanmateix, el grup CD mostra concentracions de sucres previ a inversió menors. Aquest fet corrobora que el grup tractat amb ciclodextrines consta d'una major capacitat metabòlica per hidrolitzar els sucres complexos, avançant la seva fermentació i obtenint una disminució de la densitat significativament major que els demés grups (vist anteriorment en la Figura 7.C).

### 5. Anàlisi de les característiques químiques: Glicerol

Com s'ha esmentat anteriorment a la introducció, els llevats també generen subproductes per mantenir l'equilibri redox, entre ells el glicerol. Aquest es sintetitza mitjançant la fermentació gliceropirúvica i a part de ser una vàlvula d'escapament metabòlica, acaba afectant sensorialment al producte final, ja que s'ha descrit que aquest compost ens pot donar sensorialment més untuositat i volum en boca. Finalment es recullen els resultats de la concentració de glicerol en la Taula 2.

Taula 2: Il·lustració representativa dels valors de glicerol obtinguts en les diferents fermentacions i per les diferents condicions experimentals. Totes les dades corresponen a la mitjana aritmètica  $\pm$  desviació estàndard. Lletres diferents indiquen l'existència de diferències significatives ( $p < 0.05$ ), sent les minúscules la comparativa entre grups experimentals en una mateixa fermentació. Les majúscules comparen les diferències en un mateix grup experimental al llarg de les fermentacions.

| Cicle | Glicerol (g/L)  |                     |                     |                     |                     |
|-------|-----------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|       | M               | C                   | CD                  | AG                  | CD-AG               |
| 1     | 0,00 $\pm$ 0,00 | 3,72 $\pm$ 0,11 a B | 3,39 $\pm$ 0,14 a B | 3,57 $\pm$ 0,37 a B | 3,66 $\pm$ 0,48 a B |
| 2     | 0,00 $\pm$ 0,00 | 2,41 $\pm$ 0,65 a A | 1,78 $\pm$ 0,27 a A | 2,16 $\pm$ 0,71 a A | 1,85 $\pm$ 0,29 a A |
| 3     | 0,00 $\pm$ 0,00 | 4,35 $\pm$ 0,17 b C | 3,98 $\pm$ 0,46 b B | 3,38 $\pm$ 0,12 a B | 4,15 $\pm$ 0,48 b B |

Tal com s'observa a la Taula 2, durant la primera fermentació, els nivells de glicerol són relativament homogenis entre els diferents grups (entre 3,39 i 3,72 g/L), indicant que, en aquesta fase inicial, ni els àcids grassos ni les ciclodextrines alteren significativament la via metabòlica de síntesi del glicerol. Aquesta estabilitat suggereix una adequada capacitat dels llevats per gestionar l'estrès redox independentment dels compostos afegits.

Pel que fa la segona fermentació, tots els grups presenten una concentració igual significativament de glicerol, essent aquesta concentració obtinguda menor estadísticament a les obtingudes en el cicle 1. Possiblement, això seria degut a

una menor concentració de sucres en el most de partida en aquesta segona fermentació.

Curiosament, en la tercera fermentació s'observa un increment dels nivells de glicerol en tots els grups, assolint valors fins i tot superiors als de la primera fermentació. Tot i això, el patró d'augment és semblant entre grups, indicant que, fins i tot sota condicions prolongades de fermentació i presència de compostos potencialment tòxics, la capacitat dels llevats per sintetitzar glicerol es manté activa. En conjunt, els resultats suggereixen una notable robustesa del metabolisme associat al glicerol, que no sembla veure's alterat per l'addició dels compostos testats.

## 6. Anàlisi de les característiques químiques: Etanol

Seguidament, es presenten els resultats de l'anàlisi del grau alcohòlic en les diferents fermentacions, tal com mostra la Taula 3:

Taula 3: Il·lustració representativa dels valors d'etanol obtinguts en les diferents fermentacions i per les diferents condicions experimentals. Totes les dades corresponen a la mitjana aritmètica  $\pm$  desviació estàndard. Lletres diferents indiquen l'existència de diferències significatives ( $p < 0.05$ ), sent les minúscules la comparativa entre grups experimentals en una mateixa fermentació. Les majúscules comparen les diferències en un mateix grup experimental al llarg de les fermentacions.

| Cicle | Etanol (g/L)    |                 |     |                 |     |                 |     |                     |
|-------|-----------------|-----------------|-----|-----------------|-----|-----------------|-----|---------------------|
|       | M               | C               |     | CD              |     | AG              |     | CD-AG               |
| 1     | 0,27 $\pm$ 0,00 | 6,66 $\pm$ 0,06 | b B | 6,39 $\pm$ 0,44 | b C | 5,45 $\pm$ 0,05 | a C | 6,40 $\pm$ 0,08 b C |
| 2     | 0,27 $\pm$ 0,01 | 3,86 $\pm$ 0,97 | c A | 3,73 $\pm$ 0,63 | c A | 1,73 $\pm$ 0,78 | a B | 2,92 $\pm$ 0,02 b B |
| 3     | 0,26 $\pm$ 0,00 | 4,67 $\pm$ 0,31 | c A | 5,30 $\pm$ 0,36 | d B | 0,31 $\pm$ 0,02 | a A | 1,38 $\pm$ 0,21 b A |

Pel que fa la primera fermentació, el grup C, CD, CD-AG presenten els nivells de grau alcohòlic més alts (presentes en la Taula 3), donat que són els grups que més sucres han fermentat produint una cinètica fermentativa ràpida. El grup AG no ha aconseguit fermentar tots els sucres disponibles ja que la situació de toxicitat va provocar una aturada de la fermentació. Això es tradueix en un grau alcohòlic estadísticament menor respecte els altres grups.

En la segona fermentació, s'observa una disminució general del contingut alcohòlic respecte al primer cicle donat que el most usat en aquest segon cicle constava d'una menor concentració de sucres inicials, per lo tant, la fermentació no ha avançat tant com en el primer cicle. Aquesta reducció és especialment evident en el grup AG, on el grau alcohòlic continua sent molt inferior respecte al control. Aquests resultats reforcen la hipòtesi que la presència d'àcids grassos exerceix un efecte inhibidor sobre l'activitat fermentativa dels llevats,

probablement per l'alteració de la membrana cel·lular o la desregulació del metabolisme energètic. D'altra banda, l'efecte mitigador de les ciclodextrines es fa evident en el grup CD-AG, on la producció d'etanol és superior a la del grup AG, tot i no assolir els nivells dels controls. Aquest patró suggereix una certa protecció per part de les ciclodextrines, tot i que insuficient per restaurar completament la fermentació. Pel que fa la comparativa entre el grup control i ciclodextrines, en aquesta fermentació els dos grups han aconseguit un grau alcohòlic igual, sense diferències significatives.

Pel que fa al tercer cicle, la Taula 3 mostra que la tendència observada en la segona fermentació es manté. El grau alcohòlic es veu disminuït en els grups AG i CD-AG, fet coherent amb la disminució progressiva de la capacitat fermentativa dels llevats a mesura que acumulen cicles, sobretot amb l'addició de MCFA al medi. En concret, el grup AG torna a mostrar una producció d'etanol molt baixa indicant una pèrdua pràcticament total de capacitat fermentativa. El grup CD-AG presenta una activitat una mica superior, però lluny dels valors observats en els controls. Aquest conjunt de dades consolida la idea que la toxicitat induïda pels àcids grassos persisteix al llarg del temps i que les ciclodextrines poden alleujar-ne parcialment els efectes, però no aconsegueixen restituir la funcionalitat fermentativa a nivells comparables als grups no tractats. Pel que fa el grup de ciclodextrines, finalment assoleix valors d'alcohol més elevats al control, el que coincideix al mateix temps amb les dades obtingudes sobre els valors de sucres fermentats i els residuals. Es confirma que les ciclodextrines milloren cinètica de fermentació amb respecte la condició control, el que permet fermentar la major part dels sucres i arribar a un grau alcohòlic més elevat.

## CONCLUSIONS

L'estudi dut a terme ha permès aprofundir en l'impacte de les ciclodextrines en la fermentació alcohòlica del most de cervesa, especialment en condicions de repicatge successiu, on els llevats es veuen sotmesos a estrès acumulat i a la presència de compostos potencialment tòxics com els àcids grassos de cadena mitjana (MCFA).

Els resultats obtinguts mostren clarament que la presència de MCFA afecta de manera negativa tant la cinètica fermentativa com el creixement cel·lular dels llevats. Aquest efecte es fa més evident a mesura que avancen els cicles de fermentació, com s'ha observat en la segona i tercera tanda, on els llevats exposats als MCFA presenten aturades fermentatives i una disminució significativa en la densitat, així com una reducció del recompte cel·lular. Aquests efectes negatius es confirmen mitjançant l'anàlisi de la composició química del producte final. En aquest anàlisi s'observa que l'aturada fermentativa provoca la presència de nivells alts de sucres en el medi, que resten allà sense ser hidrolitzats. La falta de capacitat d'hidròlisi d'aquests sucres es tradueix en uns nivells d'etanol significativament menors respecte els altres grups.

D'altra banda, la incorporació d'alfa-ciclodextrina en un medi fermentatiu ric en MCFA ha mostrat efectes positius notables. La capacitat d'encapsulació de les ciclodextrines sembla mitigar parcialment la toxicitat dels àcids grassos, permetent una recuperació parcial de l'activitat metabòlica dels llevats, evidenciada per una cinètica fermentativa més propera al grup control i una millora en la viabilitat cel·lular. Aquest efecte, però, no es manté de manera igualment efectiva al llarg dels cicles. Mentre que en la primera fermentació l'efecte protector és suficient per obtenir resultats similars al grup control, en la segona i especialment en la tercera fermentació, les diferències entre grups es fan més evidents, destacant l'impacte acumulatiu de l'estrès i els efectes perjudicials que reben els llevats. Això suggereix que, tot i el seu efecte protector, aquestes molècules no poden contrarestar totalment l'acumulació de danys cel·lulars provocats per la reutilització successiva del llevat i la toxicitat progressiva del medi. Això confirma els resultats químics obtinguts, on en el primer cicle, els nivells de sucres residuals són semblants al grup control. No obstant, en els últims cicles les capacitats metabòliques de les cèl·lules es veuen

compromeses provocant una aturada fermentativa encara que queden sucres dissolts en el medi. Finalment s'obtenen graus alcohòlics menors al control, però superiors al grup d'àcids grassos.

Pel que fa l'ús de les ciclodextrines en una fermentació alcohòlica de cervesa, s'ha observat que en el primer cicle, aquestes molècules no aporten cap avantatge respecte el control, mostrant una cinètica fermentativa i unes densitats semblants. No obstant, al llarg del segon i especialment en el tercer cicle, on els llevats han sigut reutilitzats i per tant el rendiment se'n veu afectat, l'ús de ciclodextrines sembla aportar una millora en la cinètica fermentativa, aconseguint portar la fermentació a uns nivells de densitat menor. Això reflexa que les ciclodextrines poden augmentar el rendiment metabòlic dels llevats en un medi on les condicions no són les òptimes. Aquesta millora en la cinètica no es correspon en una millora de la població, és a dir, l'ús de ciclodextrines no permet un augment en el creixement o divisió de les cèl·lules. Les poblacions en els dos grups són significativament iguals, però les ciclodextrines encapsulen substàncies nocives de forma que els llevats no es veuen tan afectats a nivell metabòlic i poden dur a terme fermentacions més completes i en un menor interval de temps. Aquesta millora en la cinètica fermentativa es correspon a uns nivells de sucres menors, donat que els llevats són més actius metabòlicament i encara tenen la capacitat d'hidrolitzar aquells sucres més complexos. Finalment s'obtenen nivells d'etanol més elevats que fins i tot el control.

En conjunt, aquest treball reforça la hipòtesi que les ciclodextrines poden actuar com a agents detoxificants útils en processos de fermentació alcohòlica on s'utilitza repicatge del llevat. Aquest efecte no ha estat present en la fermentació de vi, donat que en aquesta els llevats no es reutilitzen. Per lo tant, aquest estudi permet posar en evidència les possibles afectacions metabòliques que pateixen els llevats en les fermentacions successives. Tanmateix, els seus efectes tenen un límit, i caldria complementar el seu ús amb altres estratègies de control de qualitat microbiològica i bioquímica en fermentacions en sèrie.

Encara que els resultats obtinguts són prometedors, s'ha de tenir en compte que en aquest estudi no s'ha treballat en condicions d'esterilitat extremes, el que pot repercutir en els resultats obtinguts. L'ús de volums petits i més presència

d'oxigen pot afavorir la contaminació del producte per part d'altres microorganismes com les bactèries. Per aquesta raó, en futurs estudis es recomana l'ús de volums més grans i un control estricte de l'esterilitat. A més, per falta de temps, en aquest treball no s'han avaluat moltes altres característiques químiques com poden ser l'àcid acètic i compostos volàtils. En futurs estudis es recomana fer un anàlisi complet de les característiques del producte final, per tal d'estudiar i entendre amb profunditat les afectacions que reben els llevats en aquest repicatge. Finalment, es recomanaria també l'oportunitat de fer més cicles fermentatius per veure si aquest efecte protector de les ciclodextrines s'estén en el temps, o si finalment aquest efecte es va perdent a mesura que els llevats enfronten més estrès i possibles mutacions al llarg de les fermentacions.

Aquest treball obre la porta a noves aplicacions de les ciclodextrines en l'àmbit de la biotecnologia alimentària, sobretot en la indústria de begudes alcohòlica, aportant una eina potencial per millorar l'eficiència i estabilitat dels processos fermentatius.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bühligen F, Rüdinger P, Fetzer I, Stahl F, Scheper T, Harms H, et al. Sustainability of industrial yeast serial *repitching* practice studied by gene expression and correlation analysis. *J Biotechnol* [Internet]. 2013 Dec 1 [cited 2025 Apr 29];168(4):718–28. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168165613003994>
2. Zumárraga Parra RH. Estudio para la reutilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* procedente de un proceso de fermentación en la elaboración de cerveza artesanal. [Internet]. Quito: UCE; 2023 [cited 2025 Apr 29]. Available from: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/30724>
3. Kordialik-Bogacka E, Diowksz A. Physiological state of reused brewing yeast. *Czech J Food Sci* [Internet]. 2013 [cited 2025 Apr 29];31(3):264–9. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/288218209\\_Physiological\\_State\\_of\\_Reused\\_Brewing\\_Yeast](https://www.researchgate.net/publication/288218209_Physiological_State_of_Reused_Brewing_Yeast)
4. Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A. *Handbook of Enology Volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications*. 2nd ed. [cited 2025 Apr 29]; Available from: [www.wiley.com](http://www.wiley.com)
5. Walker GM, Walker RSK. Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations. *Adv Appl Microbiol* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2025 Apr 29];105:87–129. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30342724/>
6. Walker GM, Stewart GG. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages* [Internet]. 2016 Nov 17 [cited 2025 May 21];2(4):30. Available from: <https://www.mdpi.com/2306-5710/2/4/30/htm>
7. Borrull A, López-Martínez G, Poblet M, Cordero-Otero R, Rozès N. New insights into the toxicity mechanism of octanoic and decanoic acids on *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2025 Apr 29];32(5):451–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25773463/>
8. Viegas CA, Rosa MF, Correia IS, Novais JM. Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1989 [cited 2025 Apr 29];55(1):21–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16347826/>
9. Lea AGH, Piggott JR. *Fermented beverage production*. 2003;423.
10. Velázquez-Contreras F, Zamora-Ledezma C, López-González I, Meseguer-Olmo L, Núñez-Delicado E, Gabaldón JA. Cyclodextrins in Polymer-Based Active Food Packaging: A Fresh Look at Nontoxic, Biodegradable, and Sustainable Technology Trends. *Polymers* [Internet]. 2021 Dec 28 [cited 2025 Apr 30];14(1):104. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4360/14/1/104/htm>

11. Christaki S, Spanidi E, Panagiotidou E, Athanasopoulou S, Kyriakoudi A, Mourtzinou I, et al. Cyclodextrins for the Delivery of Bioactive Compounds from Natural Sources: Medicinal, Food and Cosmetics Applications. *Pharmaceuticals* [Internet]. 2023 Sep 8 [cited 2025 Apr 30];16(9):1274. Available from: <https://www.mdpi.com/1424-8247/16/9/1274/html>
12. Puebla-Duarte AL, Santos-Sauceda I, Rodríguez-Félix F, Iturralde-García RD, Fernández-Quiroz D, Pérez-Cabral ID, et al. Active and Intelligent Packaging: A Review of the Possible Application of Cyclodextrins in Food Storage and Safety Indicators. *Polymers* [Internet]. 2023 Nov 3 [cited 2025 Apr 30];15(21):4317. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4360/15/21/4317/html>
13. Botelho G, Valiau C, Moreira da Silva A. Effect of cyclodextrins on off-odours removal of red wine: an innovative approach. *Ciênc Téc Vitiviníc* [Internet]. 2011 [cited 2025 Apr 30];26(2):63–8. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3822507&info=resumen&idoma=ENG>
14. Use of cyclodextrins to improve grape must fermentability thanks to their sequestering effect on medium-chain fatty acids • IVES [Internet]. [cited 2025 May 28]. Available from: <https://ives-openscience.eu/49687/>
15. Bamforth CW. *Food, Fermentation and Micro-organisms*. [Internet]. 2007 Nov 16 [cited 2025 May 1];1–216. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9780470995273>
16. Zijlmans MJJM, Visser JWM, Kleiverda K, Kluin PM, Willemze R, Fibbe WE. Modification of rhodamine staining allows identification of hematopoietic stem cells with preferential short-term or long-term bone marrow-repopulating ability. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1995 Sep 12 [cited 2025 May 28];92(19):8901–5. Available from: [/doi/pdf/10.1073/pnas.92.19.8901?download=true](https://doi.org/10.1073/pnas.92.19.8901?download=true)
17. Freeman GG, Donald GMS. Fermentation Processes Leading to Glycerol II. Studies on the Effect of Sulfites on Viability, Growth, and Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. 2025 [cited 2025 May 28]; Available from: <https://journals.asm.org/journal/am>
18. Nisha M, Shankar M, Krishnan N, Saleena LM, Rajesh M, Vairamani M. Direct estimation of ethanol as a negative peak from alcoholic beverages and fermentation broths by reversed phase-HPLC. *Anal Methods* [Internet]. 2016 Jun 9 [cited 2025 May 28];8(23):4762–70. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/ay/c6ay01075j>

## AUTOAVALUACIÓ

Aquest Treball de Fi de Grau ha estat una experiència clau tant en el meu creixement acadèmic com personal. Des de l'inici, les meves expectatives estaven centrades en aprofundir en el camp de la biotecnologia aplicada al sector alimentari, i més concretament en els processos fermentatius. Em feia especial il·lusió poder integrar coneixements de microbiologia, bioquímica i tecnologia d'aliments en un projecte experimental real, i puc afirmar que aquestes expectatives s'han complert amb escreix.

El desenvolupament del TFG m'ha permès enfrontar-me a un repte experimental complex, amb múltiples variables i condicionants que no sempre es poden controlar. Aquesta situació m'ha ajudat a entendre com funciona la ciència "de veritat": amb imprevistos, incerteses i la necessitat constant d'adaptació. He après a planificar amb rigor, a interpretar dades amb esperit crític i a relacionar resultats amb coneixement teòric previ.

Un dels aspectes més enriquidors ha estat poder aplicar tècniques reals de laboratori, com el seguiment fermentatiu mitjançant densímetre, el comptatge cel·lular amb cambra de Neubauer, i l'ús de rodamina B com a marcador de viabilitat, l'ús de HPLC per l'anàlisi químic de les mostres, entre d'altres. Aquestes tècniques, que sovint es treballen de manera teòrica a la universitat, han esdevingut eines pràctiques que ara entenc i domino molt millor. A més, el treball amb mostres reals en un context de recerca aplicada, m'ha ajudat a visualitzar com es poden traslladar les eines biotecnològiques al món industrial.

En l'àmbit personal, aquest treball m'ha ajudat a guanyar seguretat, autonomia i sentit de responsabilitat. He après a gestionar millor el temps, a organitzar tasques amb objectius clars i a persistir quan els resultats no eren els esperats. També he entès la importància de la col·laboració amb l'equip de recerca, de fer preguntes quan cal, i d'escoltar l'experiència dels investigadors que m'han acompanyat durant tot el procés.

Finalment, aquest projecte m'ha confirmat que vull continuar vinculada a l'àmbit de la investigació o el desenvolupament tecnològic. Ha estat una experiència molt valuosa que m'ha permès consolidar coneixements, adquirir habilitats pràctiques i créixer com a futura biotecnòloga.

## AGRAÏMENTS

Finalment, voldria expressar el meu més sincer agraïment a la cervesera Les Clandestines per haver-me facilitat el most de cervesa necessari per dur a terme aquest treball. La seva col·laboració ha estat clau per al desenvolupament experimental del projecte.

També voldria agrair al meu tutor, el Dr. Fernando Zamora, pel seu guiatge constant, la seva dedicació i els seus valuosos consells al llarg de tot aquest procés. La seva orientació m'ha ajudat a créixer tant acadèmicament com personalment.

Un agraïment especial a Jordi Gombau pel seu suport i la seva ajuda durant les pràctiques de laboratori, sempre disposat a resoldre dubtes i aportar coneixement tècnic.

Finalment, vull donar les gràcies a tot el grup de recerca, especialment a la Nadia, l'Antoni i l'Arnau, per la seva col·laboració, paciència i per fer d'aquesta experiència una etapa molt enriquidora.