

**Oriol Lacambra Frias**

**Estudi de la influència climatològica en la microbiota  
d'inoculacions espontànies de cervesa**

**TREBALL DE FI DE MÀSTER**

**dirigit per Gemma Beltran Casellas**

**Màster en BEGUDES FERMENTADES**

**Facultat d'Enologia**



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

**Tarragona**

**Septembre de 2021**



## ÍNDEX

Índex.....	2
Agraïments .....	3
Dades del centre .....	4
Resum.....	5
Introducció .....	6
Objectius .....	9
Materials i mètodes .....	10
Elaboració del most .....	10
Plaques.....	12
pH.....	14
Densitat.....	14
Recompte cel·lular i viables .....	15
PCR-RFLP del rDNA.....	15
Observació microbiològica.....	16
Anàlisis finals: acidesa i grau alcohòlic .....	16
Resultats i discussió.....	18
pH.....	18
Densitat.....	20
Recompte cel·lular i viables .....	21
Creixement en plaques de cultiu .....	23
Resultats de la identificació molecular de microorganismes amb PCR .....	26
Observació microbiològica.....	28
Anàlisis finals: acidesa i grau alcohòlic .....	30
Conclusions .....	32
Valoració i direcció futura .....	33
Bibliografia .....	34
Annexos.....	36
Taules de seguiment .....	36
Taules de recompte cel·lular.....	38
Taules de valors d'acidesa i grau alcohòlic .....	39
Taula de valoració de PCR.....	39
Fitxa tècnica de l'agar universal cervesa .....	42

## AGRAÏMENTS

Aquesta tesi ha estat un projecte que requeria un to de dedicació, esforç i una gran quantitat d'hores. Com a tal, moltes persones m'han ajudat en el camí, guiant-me, ensenyant-me, o simplement donant-me el seu suport incondicional. Estic orgullós d'això i com a tal, volia destacar i agrair aquest fet en aquestes breus línies.

Primerament, agrair a Cerveses Segarreta i tot el seu personal per l'oportunitat de treballar amb ells i pel tracte de respecte i valoració de la feina fet que han tingut cap a mi, així com les cerveses compartides, els coneixements ensenyats i la experiència de treballar elaborant un producte que sempre havia admirat; a l'Oriol, per totes les lliçons sobre el dia a dia d'una cerveseria, al Gil, per treure'ns un somriure sempre, i sobretot, al Sergi, per la confiança que em va donar des del primeríssim dia i per fer sentir-me valorat i escoltat.

A la meva tutora acadèmica, la doctora Gemma Beltran Casellas, així com a la doctora María Jesús Torija Martínez per la seva atenció i els seus consells respecte la realització del treball en unes circumstàncies tant adverses i estranyes com les que ha configurat el COVID-19, per tots els coneixements que han aportat al treball, i per ajudar-me a trobar un rumb i una metodologia clars. També m'agradaria agrair de tot cor a la doctora Maria Isabel Araque Granados per tot el que m'ha ensenyat respecte a treballar en el laboratori, especialment en el camp de la microbiologia, i per tot el temps que m'ha dedicat.

Molt especialment, vull donar les gràcies a la meva família i amics, aquells que em van ajudar a seguir endavant i no llençar la tovallola: al Raul, el Jordi, el Martí, el Genís, la Leire, l'Anabel, la Paula, l'Àlicia, el David... Molt especialment, a l'Elisabet, per haver esdevingut el meu pilar i la meva llum, i convèncer-me que podia seguir aguantant sempre una mica més. Per sobre de tot, vull agrair-ho als meus pares per no haver dubtat mai de mi, fins i tot quan jo no creia en mi mateix. I per últim, a totes les persones a qui estimo i respecto amb tot el cor, tot i no haver estat aquí citades, doncs no ho podria haver fet sense vosaltres.

## DADES DEL CENTRE



Figura: 1 Cerveses Segarreta

De la pàgina web de la cerveseria:

*“Durant la Segona República, Santa Coloma de Queralt passà a anomenar-se Segarra de Gaià, i de la moneda d’una pesseta que encunyà l’ajuntament republicà en digueren “Segarreta”.*

*Nosaltres ens considerem fills de la Segarra i del Gaià. Fills del blat i l’ordi que es cultiva als camps*

*de la Segarra i del llúpol aromàtic que es troba a la llera del riu Gaià. Som la Segarreta, una cervesera artesanal ubicada a Santa Coloma de Queralt. Elaborem cerveses úniques i perfectament reconeixibles perquè tenen un marcat caràcter local. Som d’allà on la Segarra toca amb el riu Gaià. Som terra de cereal i terra de llúpol; aquest és el nostre paisatge i explica allò que som. Només utilitzem ingredients naturals seleccionats i ens obsessional la qualitat. Per això només fem produccions limitades i per això les nostres cerveses tenen tant a veure amb el lloc d’on venim. Cerveses 100% autèntiques, naturals i artesanals, sense additius, sense filtrar ni pasteuritzar.”*

Segarreta és una cerveseria artesana ubicada al Carrer Nostra Senyora de la Mercè, 25, 43420 Santa Coloma de Queralt, Tarragona. La plantilla compta amb dos treballadors, un dels quals és el Sergi Torres, propietari i cerveser en cap. La història de la cerveseria es remunta al 2007, on de forma homebrewer en Sergi inicia el viatge cerveser, tot i que és el 2011 que la empresa es professionalitza, sent en conjunt, una de les primeres cerveseries artesanals del nostre país. El 2016 es traslladen a les noves instal·lacions, una històrica nau de Santa Coloma, que els permet augmentar la seva producció (fins als 35.000 litres pre-COVID) i que a més, reflecteix la idea d’una cervesa local, basada en les tradicions i en l’entorn de la Segarra. Varen ser una de les primeres cerveseries catalanes a treballar amb fermentacions en barrica cerveses àcides i espontànies, una vessant que cada vegada els interessa més i que volen potenciar; aquesta és la que es tractarà al llarg d’aquest treball.

## RESUM

En aquest treball, s'estudia la possibilitat de ampliar el període anual disponible per a la elaboració de cerveses espontànies amb el mètode *coolship*. Es parteix de la hipòtesi que condicions climàtiques diferenciades, tals com sol i pluja, podrien alterar els microorganismes presents en l'ambient, i per tant aquells que són inoculats, resultant adequats per a la elaboració de cervesa espontània malgrat una temperatura superior a la òptima.

Per fer-ho, s'estudia l'estat de l'art, els antecedents, i es plantegen una sèrie d'experiments per a realitzar un seguiment en una cervesa espontània elaborada a la cerveseria Segarreta. Aquesta s'inocula en dos dies amb condicions climàtiques diferenciades, i se li fa un seguiment de pH, densitat, recompte cel·lular i inoculació en plaques de medi diferencial, per al seu estudi. Addicionalment, es realitza una PCR i proves microbiològiques com tinció de Gram o catalasa per a identificar-los, així com un estudi de condicions finals (acidesa i pH). Finalment, es postulen conclusions i s'ofereixen teories i rumb futur per a seguir amb l'estudi. S'estableix que hi ha diferències significatives i que no es recomana aquest tipus d'elaboració en dies plujosos, doncs es dona una parada fermentativa, hi ha mostres de contaminació fúngica, i la dimensió organolèptica és desagradable.

---

The present thesis studies the possibility of extending the annual period available for the brewing of spontaneous beers with the coolship method. It is assumed that differentiated climatic conditions, such as sunny and rain, could alter the microorganisms present in the environment, and therefore those that are inoculated, being suitable for brewing spontaneous beer despite a temperature above the optimum.

We evaluate the state of the art, the background, and proceed with a series of experiments in order to follow the fermentation of an spontaneous beer brewed at the Segarreta brewery. It is inoculated in two days with different climatic conditions, and is monitored for pH, density, cell count and inoculation in plates of differential medium. Additionally, PCR and microbiological tests such as Gram staining or catalase are performed to identify them, as well as an study of final conditions (acidity and pH). Finally, conclusions are postulated and theories and a future direction are offered to continue with the study. It is established that there are significant differences and that this type of production is not recommended on rainy days, as there is a fermentation stop, there are samples of fungal contamination, and the organoleptic dimension is unpleasant. .

## INTRODUCCIÓ

La cervesa ha estat un aliment clau per la humanitat des de fa quasi 6 mil·lennis (*Beer - World History Encyclopedia*, no date), amb mostres arqueològiques de la seva importància, tals com el “Poema a Ninkasi”, la deessa sumèria de la cervesa (Dyneley Prince, no date). Aquesta beguda ha canviat molt al llarg dels segles, des d’una pasta espessa que requeria ser beguda amb canyeta fins a la enorme varietat d’estils coneguts a l’actualitat. Actualment, la enorme majoria de cervesa produïda és inoculada pel cerveser amb llevat seleccionat (de Roos, Vandamme and de Vuyst, 2018), ja sigui en pols, líquid, a partir d’una massa mare, re-inoculant d’un altre fermentador, etc. Aquesta metodologia implica una gran reproductibilitat i control sobre el procés, resultant en una variada gamma d’estils de cervesa, establerts al llarg dels anys, sent la *lager* la més popular. *Saccharomyces cerevisiae* és el principal microorganisme fermentador en aquests processos, i és seleccionat degut a que el seu comportament fermentatiu està perfectament estudiat, a la seva alta producció d’alcohol, la alta taxa de atenuació i la àmplia gamma de sucres que pot fermentar (Estela-Escalante *et al.*, 2016).

Això, però, no ha estat la norma fins fa unes poques dècades (Tyakht *et al.*, 2021). Tradicionalment, i especialment abans del descobriment per part de Louis Pasteur dels llevats i el seu paper fermentatiu, la fermentació ha estat descontrolada a nivell microbiològic. Les inoculacions han estat tradicionalment donades pel propi ambient de la cerveseria, de forma espontània (de Roos *et al.*, 2018) o el material, tal com els barrils (de Roos, van der Veken and de Vuyst, 2019). Això permet que una enorme quantitat de microorganismes diferents colonitzin el medi, augmentant la gamma organolèptica de la cervesa (Estela-Escalante *et al.*, 2016) i les diferències en la bioquímica de la fermentació (Oevelen, de L’Escale and Verachtert, 1976; Spaepen, van Oevelen and Verachtert, 1978). Malgrat el mètode tradicional ha anat sent desplaçat, actualment aquest interès està revifant degut a l’auge de la cervesa artesana, portant a un retorn a la fermentació espontània (Estela-Escalante *et al.*, 2016; de Roos, Vandamme and de Vuyst, 2018; Tyakht *et al.*, 2021).

Les cerveses resultants són les sovint anomenades “cerveses salvatges” o “espontànies” (*Spontaneous Fermentation: Science, Not Sorcery*, no date; *Spontaneous Fermentation - Milk The Funk Wiki*, no date). Aquestes, generalment, solen ser àcides, i sovint tenen caràcters *funky*, terrosos o simplement poc comuns, degut a organismes fermentadors tals com *Brettanomyces bruxellensis*. L’acidesa caracteritza aquestes cerveses, i ajuda a compensar aspectes organolèptics altrament embafants, tals com la dolçor o amargor; el pH és menor que en molts

estils, al voltant 3, respecte el més comú 4-4'5 de la majoria de cerveses. Els microorganismes involucrats són in comptables, però hi ha certes espècies que representen referències clares. *Brettanomyces bruxellensis* (*Brettanomyces Bruxellensis - an overview | ScienceDirect Topics*, no date) és un dels més coneguts, ja que històricament s'ha considerat un contaminant en el vi, però és desitjat en certs estils; de creixement molt lent, amb una gran resistència a l'alcohol i capacitat fermentativa elevada, sol aparèixer en etapes tardanes de la fermentació i aporta aromes *funky*, a "quadra" o "cuir", degut principalment a fenols com el 4-vinilfenol, 4-etilfenol o 4-etilguaicol (Schifferdecker *et al.*, 2014), o àcids grassos com l'àcid caprílic (Spaepen, van Oevelen and Verachtert, 1978). Per altra banda, diversos bacteris com *Lactobacillus sp.*, *Pediococcus sp.* o *Acetobacter sp.* són encara més comuns, produint àcids orgànics tals com l'àcid làctic o l'acètic, responsables de gran part del caràcter àcid d'aquestes cerveses, i requisit indispensable per a molts estils (de Roos, van der Veken and de Vuyst, 2019).

Un dels tipus de cervesa més famosos en mantenir aquest tipus de fermentació són les Lambic belgues.

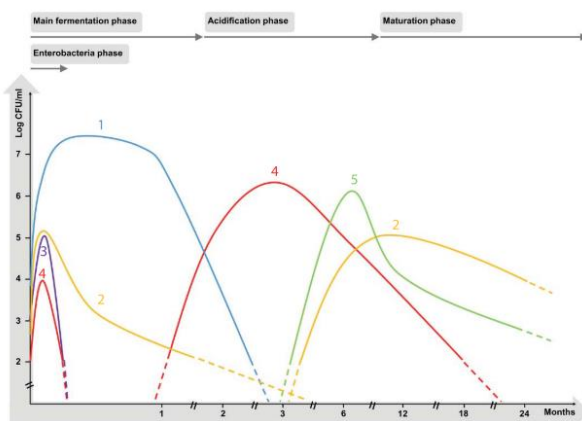


Fig 2 Microbial succession during a Lambic beer production process. Four phases can be distinguished, including (i) an enterobacterial and wild (oxidative) yeast phase, (ii) a main (alcoholic) fermentation phase, (iii) an acidification phase due to the growth of lactic acid bacteria (LAB) and acetic acid bacteria (AAB), and (iv) a maturation phase with the growth of *Brettanomyces* yeasts and LAB. Colours: blue (1), yeasts; orange (2), cycloheximide resistant yeasts; purple (3), Enterobacteriaceae; red (4), AAB; green (5), LAB

Figura: 2 Progressió microbiològica típica de les Lambic, segons descrit a (Bossaert *et al.*, 2019)

Aquestes són cerveses de fermentació espontània, les quals han de ser (segons la tradició) elaborades a la vall del Sena, a prop de Brussel·les (Spitaels *et al.*, 2014), a partir de microorganismes locals. Aquests segueixen una progressió molt ben estudiada (Oevelen, de L'Escaille and Verachtert, 1976; de Roos, Vandamme and de Vuyst, 2018), tal com es veu a la Figura 2: en les primeres setmanes,

*Kloeckera sp.* i *Enterobacteriae sp.* inicien la fermentació, rebaixant el pH, i obrint pas per *Saccharomyces cerevisiae* i *bayanus*, que passen a dominar la fermentació a partir de les 3 setmanes i s'encarreguen de la major part del procés. Un cop aquest s'ha completat, és seguit per bacteris àcids, tant làctics com acètics, tals com *Pediococcus sp.*, *Candida sp.*, *Pichia sp.* o *Acetobacter sp* (Bossaert *et al.*, 2019).

Això, però, només es dona en els mesos d'hivern (Spitaels *et al.*, 2014; de Roos, van der Veken and de Vuyst, 2019), ja que les condicions climatològiques retarden el creixement d'espècies amb menor capacitat de colonització, que solen ser indesitjades o directament perjudicials. Això limita molt el període d'elaboració, dificultant la producció a gran escala d'aquestes cerveses,

especialment si s'elaboren en una zona amb una climatologia més càlida. Aquest seria el cas d'algunes ACA (American Coolship Ale) (Bokulich, Bamforth and Mills, 2012), que són aquelles cerveses elaborades a Estats Units imitant la metodologia Lambic, i que busquen obtenir una cervesa amb baix pH, alt contingut d'etanol i d'èsters aromàtics, fenols volàtils, i altres compostos resultat de la activitat metabòlica combinada de diverses poblacions de microorganismes. Una anterior estudiant del màster, la Ariadna Garreta Guijarro, va estudiar en cursos anteriors l'efecte de les barriques en la elaboració de cerveses àcides en la pròpia cerveseria Segarreta (Garreta Guijarro, 2019), on també vàrem desenvolupar l'actual estudi que ens ocupa. Conèixer la població de cadascuna de les diferents barriques de que es disposa per treballar és una gran referència pel cerveser a la hora d'elaborar *blends* i de saber quant temps i quina proporció requerirà per cada barrica, per cada cervesa. Aquest coneixement aporta una eina de control no-directe de la fermentació, mitjançant la qual es pot regular les poblacions presents en el most i "estimar" un resultat per la cervesa final. Això, juntament amb l'actual estudi, creiem que pot arribar a un coneixement i, per tant, nivell de control de fermentacions espontànies totalment inèdit amb anterioritat i personalitzat per a cada cerveseria.

En certes zones, tant d'Amèrica com, en el cas que ens ocupa, de Catalunya, el clima és molt diferent al belga, tenint hiverns més suaus i primaveres més càlides, cosa que limita encara més el període disponible per a elaborar aquestes begudes. A més, respecte el clima, en una visió general, ha estat estudiat el seu efecte en la fermentació, especialment la temperatura a la que aquesta s'ha de donar; això no obstant, no ens consta la existència d'estudis complets sobre la influència d'altres factors climàtics més puntuals, tals com vent, humitat, baixes pressions o pluja. De la mateixa manera que el fred permet inocular cervesa de forma espontània, mantenint un control de seguretat i de fermentació, la hipòtesis d'aquest treball és que altres condicions climàtiques, tals com pluja i/o alta humitat, vent, calor molt elevada... poden afectar d'altres formes a la inoculació. Si s'estudiés en profunditat l'efecte de la climatologia, es podria valorar ampliar el període d'elaboració per a cerveses espontànies, permetent amb això augmentar la producció i vendre'n més. A partir d'aquesta hipòtesi, vam estudiar-ho en el context de Cervesa Segarreta, de Santa Coloma de Queralt, on tenen una dilatada experiència en la elaboració de cerveses àcides i, més recentment, espontànies. Per tal experiment, s'utilitzà el mètode *coolship* de refredament i inoculació, seguint la tradició Lambic, i decidirem estudiar en profunditat la influència de les condicions plujoses i d'alta humitat, al considerar-ho l'exemple més representatiu i que, plausiblement, podia aportar una major diferència en la fermentació.



## OBJECTIUS

L'objectiu d'aquest treball és estudiar la influència que diferents condicions climàtiques tenen en les poblacions microbiològiques inoculades espontàniament a una cervesa mitjançant el mètode *coolship*. Es busca aplicar aquestes dades a la producció d'aquesta cervesa durant èpoques més avançades de l'any, normalment restringit, sota condicions climatològiques determinades.

Per a avaluar-ho, es farà una inoculació sota dues condicions climàtiques, assolellades i plujoses, i es farà un seguiment complet de les mostres, tant físico-químic com microbiològic. Les dades recollides s'analitzaran per tal de comparar les evolucions de les diferents mostres.

## MATERIALS I MÈTODES

Al llarg d'aquest estudi, s'han utilitzat una sèrie de tècniques per a l'anàlisi de l'evolució d'una cervesa d'inoculació espontània. Per a fer-ho, però, primer s'hagué de decidir com es realitzaria, conservant la reproductibilitat del mètode. Es va decidir conservar mostres congelades de most no-inoculat del mateix lot del que es faria cervesa en *coolship*, per a posteriorment descongelar-ho en dies en que la climatologia fos adequada als paràmetres fixats i inocular-ho ambientalment.

### Elaboració del most

La cervesa base, seguint la tradició belga, fou una cervesa de blat amb un 50% d'aquest cereal no-maltejat, per tal de deixar polisacàrids no fermentables per *Saccharomyces* al most per a les



*Figura: 3 Vista de l'obrador amb ambdues olles connectades a través de la bomba*

posteriorment espècies. L'equip de la cerveseria (Figura 3) consta d'una cuina de 500 litres, escalfada per gas propà. La cuina compta amb tres recipients: el primer és un pulmó d'aigua calenta, d'uns 250 litres de capacitat aproximadament, el qual s'omple amb aigua osmotitzada el dia anterior a l'elaboració, i s'escalfa inicialment amb flama de propà, per posteriorment mantenir-se amb una resistència interna a la temperatura desitjada. Aquest pulmó es troba elevat respecte la olla de macerat, de tal manera que cau per gravetat sense necessitat de bomba. El següent pas és la olla de macerat, la qual és un recipient de 500 L de capacitat, amb una camisa d'aigua exterior, i sense filtre incorporat. En aquest recipient és on es posa el malt i es dona el procés de macerat. Primerament, s'introdueix l'aigua del pulmó a 75°C, alhora que progressivament s'afegeix el malt, per evitar que es formin cúmuls. Això provoca una disminució de la temperatura fins uns 64°C, temperatura a la que està durant aproximadament una hora per a maximitzar l'extracció de sucres fermentables. Posteriorment, s'escalfa fins arribar a aquests 74-75°C de nou per realitzar la parada enzimàtica, que dura aproximadament mitja hora. Llavors, s'inicia el transvasament a la olla de cocció. Per a fer-ho, es connecten ambdues olles mitjançant mànegues resistents a la temperatura, i amb l'ajut d'una bomba, es transvasa d'una olla a l'altra. Per evitar que el malt passi, a la sortida de la olla de macerat es connecta un filtre fabricat pel propi cerveser, consistent en tubs connectats amb fenedures a la part interior, que permeten el pas del líquid però no del sòlid. Així doncs, en la pròpia olla de macerat es dona

la filtració, ja que el malt forma un llit filtrant que ha de ser travessat; aquesta resulta considerablement llarga en aquesta recepta degut als problemes de filtració associats al blat. A més, a mesura que es va buidant l'olla de macerat, es realitza l'aspersió (*sparging*), en el qual l'aigua del pulmó es va fent caure de forma progressiva, amb l'ajut d'un dosificador per a fer-ho caure en dutxa sobre tota la superfície del malt, així extraient el màxim de sucres fermentables possibles.

Un cop el transvasament està prou avançat, es comença a escalfar el most amb els cremadors de propà, els quals escalfen la camisa de la olla. Així, s'eleva la temperatura fins arribar a l'ebullició, quan es procedirà a les respectives addicions de llúpols i *Irish Moss*, en funció de la recepta. A més, es comprova la densitat del most (Figura 4), per tal de determinar si hem obtingut el producte desitjat; això es realitza mitjançant un densímetre manual i una proveta.

Per tal d'accelerar lleugerament el procés, a la cerveseria es fa passar el most per un



Figura: 4 Comprovació de la densitat al final de la el-laboració

intercanviador de plaques, re-tornant-ho a l'olla, per a assolir una temperatura inferior a la de ebullició i així garantir el refredament al *coolship*. També s'acidifica el most un cop al *coolship*, per tal de exercir un cert i limitat control microbiològic; això però no ens afecta a nosaltres, degut a que les mostres no s'agafen del *coolship* en si. És posteriorment al refredament, però abans de ser abocat al *coolship* que nosaltres prenguérem les mostres, conservant-les en ampolles de

plàstic el màxim d'estèrils possibles i congelant-ho immediatament per tal d'inhibir qualsevol tipus de possible microorganisme present, que en aquest punt es consideraria una contaminació, ja que l'equip al complet fou sotmès a un intensiu procés de neteja i desinfecció. Quan es van donar les condicions climatològiques desitjades, es va descongelar el most i es va posar a inocular en el mateix lloc on es posà el *coolship*, en recipients que es mesuraren per comprovar que mantenien una relació superfície-profunditat similars al *coolship* de Segarreta, per intentar replicar al màxim les característiques del mateix, com es veu a la Figura 5.



Figura: 5 Coolship i inoculació de les mostres

Un cop les mostres foren inoculades durant un període d'unes 24 hores (al llarg d'una nit), es dugueren immediatament al laboratori de la universitat, per tal de ser analitzades i poder fer un seguiment de fermentació en un entorn de condicions controlades, especialment important pel que respecta a una temperatura estable, d'entre 20-25°C, la qual és la que es sol emmagatzemar



Figura: 6 Fermentadors de les diferents mostres al final del seguiment de fermentació

la Lambic (Spitaels *et al.*, 2014). Es posaren les mostres en fermentadors de vidre de 500mL, prèviament autoclavats (Figura 6), i es tapà la obertura amb cotó fluix i paper d'alumini per a evitar contaminació. Per cada condició, es feu un seguiment per duplicat, per tal de poder tenir una rèplica sobre la que comparar resultats (Sol 1-2 i Pluja 1-2, d'aquí en endavant). Sempre que s'hagueren de manipular, es va treballar al costat d'una flama per a garantir la esterilitat. A

la hora de prendre mesures, s'agafava una mostra, que era presa en un vas de precipitats, per evitar possibles contaminacions del fermentador al realitzar els anàlisis.

A continuació, es resumirà de forma breu la metodologia utilitzada per als diferents mètodes dels que s'ha compostat l'estudi. Els resultats seran discutits en profunditat al següent apartat, i els valors i dades completes poden ser trobats als Annexos.

## Plaques

La primera part del seguiment microbiològic es plantejà a través de sembrat en plaques de Petri amb medi selectiu per a diferents tipus de microorganismes. El primer pas fou determinar quins microorganismes volíem aïllar; es decidí que la selecció que podia aportar-nos més informació a partir dels estudis que havíem revisat en la bibliografia era llevats, bacteris, llevats no *Saccharomyces* i un medi que ens permetés la determinació de *Brettanomyces*, com una espècie de gran interès per a les Lambic.



Figura: 7 Preparació de l'Universal Beer Agar

Es va decidir fer servir Universal Beer Agar de la casa Scharlau (Scharlau, 2017), doncs estudis anteriors han comprovat la seva efectivitat a la hora de fer créixer microorganismes propis de la cervesa (Oevelen, de L'Escaille and Verachtert, 1976), comportament que hem comprovat a la universitat. Es seguí el protocol especificat en la fitxa tècnica de la casa, afegint 65g del medi en pols en 750 mL d'aigua

destil·lada i 250 mL de cervesa comercial estil Pilsen, prèviament desgasificada, com s'observa a la Figura 6. A aquest medi, se li afegien antibiòtics o antifúngics per inhibir el creixement de forma selectiva. Ens decidirem per a cloramfenicol per al creixement de llevats, natamicina per al creixement de bacteris, cicloheximida i cloramfenicol per a certs tipus de llevats concrets que resisteixen el cloramfenicol (Spitaels *et al.*, 2014), notablement, *Hanseniaspora sp.* i *Brettanomyces bruxellensis*. Aquests s'administraren en una concentració de 100 mg/L, seguint la bibliografia. Per altra banda, es va fer servir un medi d'agar Lisina per a la selecció de llevats no-*Saccharomyces*. Aquest conté 11.75 g de "Yeast Carbon", un suplement alimentari per al desenvolupament de llevats, 2.5 g de Lisina HCl i 20 g d'agar bacteriològic per a 1L d'aigua destil·lada, els reactius es poden veure a la Figura 7. Tots els medis foren autoclavats per a garantir la esterilitat dels mateixos; a més, aquest pas permet estalviar-se bullir el medi abans per a dissoldre l'agar, doncs ja es dona naturalment en el procés.



Figura: 8 Reactius per a la preparació d'agar Lisina

Altres alternatives que es van valorar foren estreptomycinina per a llevats o acididona per a Brett, medis amb deficiència de fonts de N, agents inhibidors com el sorbats o benzoats, o fonts selectives de C com l'etanol (Benito *et al.*, 2012).

Al llarg de l'estudi, sorgiren diverses complicacions, dubtes i procediments que no havíem considerat a l'inici, i es realitzaren modificacions i comprovacions en el procediment per tal d'adaptar-nos. Una d'aquestes circumstàncies fou quan, a la 3a setmana de seguiment, obtinguérem una estranya contaminació, que ens costà identificar però que, a partir de la bibliografia consultada (April | 2012 | Eureka Brewing, no date; Why sequence Dekkera (*Brettanomyces*) *bruxellensis*? - DOE Joint Genome Institute, no date; Lázaro, Soler and Cubillos, 2007), sospitàrem que fou degut a *Brettanomyces* o, més possiblement, *Schizosaccharomyces pombe*. Havíem tingut un problema durant la preparació d'aquestes plaques amb l'agar, pel que vam realitzar proves de contaminació, posant plaques no inoculades a l'estufa per a comprovar

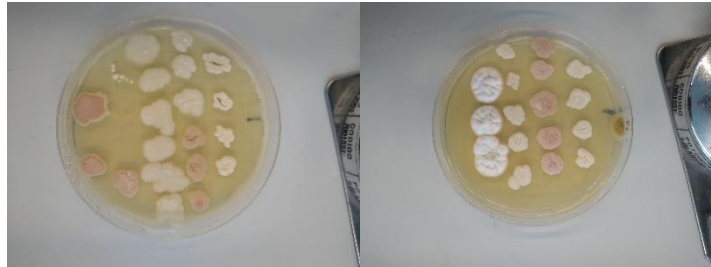


Figura: 9 Fotografies de les plaques contaminades

si hi havia contaminació en el propi medi. Tot i que això no resultà així, sí que observàrem que el medi no s'havia format correctament, pel que la consistència no era la correcta

pel seu ús; això va causar un “forat” en algunes de les nostres dades de seguiment, com es comprovarà en la secció de resultats.

Per altra banda, la incorporació tardana de la proposta de realitzar PCRs, així com el desig de conservar unes mostres viables, ens dugueren al manteniment i re-sembat de colònies seleccionades de tots els fenotips visibles, per tal de poder ser analitzats en un punt de viabilitat màxima.



*Figura: 10 Plaques de re-sembat de colònies seleccionades per a la seva conservació*

## pH

Les mesures de pH es realitzaren mitjançant un pHímetre digital pH-Meter BASIC 20+ CRISON, amb una resolució de 0,01 pH, prèviament calibrat. Cada mesura es realitzà 3 cops, per tal de ser estadísticament significatiu, i entre cadascuna d’elles es netejà l’aparell amb aigua destil·lada. Les mostres foren prèviament desgasificades mitjançant un agitador magnètic, per tal d’evitar interferències en les mesures. Aquest seguiment es realitzà durant 5 setmanes sobre el fermentador, i també es realitzà la mesura a l’arribada de la mostra.

## Densitat

Les mesures de densitat es realitzaren mitjançant un densímetre digital Mettler Toledo Densímetre Densito 30PX que funciona segons el principi de tub oscil·lant. Els resultats es calculen automàticament en g/cm<sup>3</sup>. La resolució és de 0,0001 g/cm<sup>3</sup> i fou prèviament calibrat. Cada mesura es realitzà 3 cops, per tal de ser estadísticament significatiu, i entre cadascuna d’elles es netejà l’aparell amb aigua destil·lada. Les mostres foren prèviament desgasificades mitjançant un agitador magnètic, per tal d’evitar interferències en les mesures. Aquest seguiment es realitzà durant 5 setmanes sobre el fermentador, i també es realitzà la mesura a l’arribada de la mostra.

## Recompte cel·lular i viables

El recompte cel·lular es realitzà mitjançant una càmera de Neubauer i un microscopi òptic, seguint les tècniques estàndards de microbiologia, tal com s'observa a la Figura 11. Es realitzaren dilucions en els casos necessaris, i es comptà el nombre de cèl·lules, realitzant els càlculs adequats per a escalar-ho a concentració de número de cèl·lules per unitat de volum.

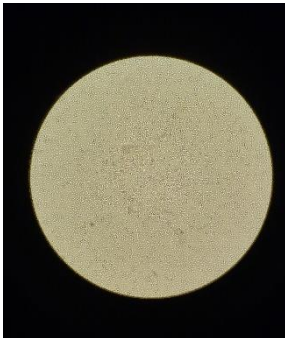


Figura: 11 Observació i recompte de llevats al microscopi òptic

En les últimes setmanes, a més, es va realitzar un recompte de viables mitjançant una tinció amb blau de bromotimol, el qual tenyeix les cèl·lules, per ser metabolitzat en aquelles sanes. Així, podem determinar el percentatge de viabilitat a partir del recompte de cèl·lules tenyides i no tenyides. Es va intentar realitzar des de les primeres setmanes, però els resultats de la mostra recent inoculada foren d'una viabilitat molt baixa, que dificultava el recompte; això no obstant, posteriorment la fermentació va avançar segons lo desitjable.

## PCR-RFLP del rDNA

Les colònies aïllades es varen identificar nivell d'espècie mitjançant la tècnica RFLP de l'ADN ribosomal descrita per Esteve-Zarzoso et al. (Belloch, Uruburu and Querol, 1999), article en el qual s'expandeix enormement la taula en referència a la Taula 5, inclosa als Annexos. La tècnica es basa en una amplificació mitjançant una PCR de la regió que abasta l'ITS1, l'ITS2 i el gen de l'ARNr 5.8S (regió 5.8S-ITS) i el subseqüent anàlisi de restricció amb diferents endonucleases. La mix de la PCR es va preparar amb Reaction Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> [3 mM], primer ITS1 [0,2µM], (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), primer ITS4 [0,2µM] (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), dNTPs [0,8 mM] i Taq Polimerasa [0,01 U/µl]. Per a l'amplificació es va seguir el protocol observable a

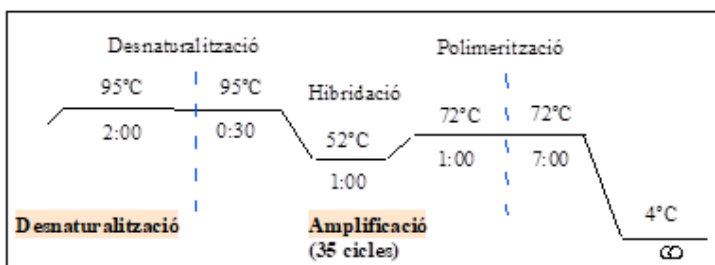


Figura: 12 Protocol d'amplificació, URV

encebadors a 52°C durant 1 minut i extensió a 72°C durant 1 minut i finalment un cicle d'elongació final a 72°C durant 7 minuts. A continuació es va realitzar una electroforesi en un gel a l'1,2% d'agarosa en tampó TBE 1X (Tris 0,089 M; Àcid Bòric 0,089 M; EDTA 0,002 M, pH 8), usant RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (20000X) com

agent intercalant (Labotaq, Sevilla, Espanya) i HyperLadder™ 100bp com a marcador de pes molecular (Bioline, Londres, Regne Unit).

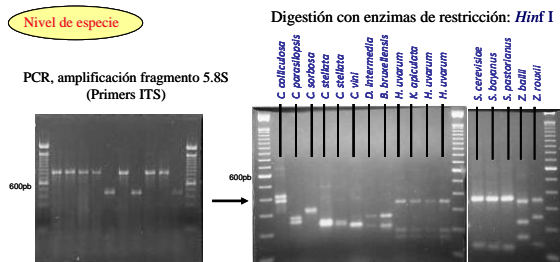


Figura: 13 Exemple de resultats per diferents espècies de la digestió amb enzim *Hinf I*

Els productes de la PCR varen ser digerits mitjançant diferents enzims de restricció *Hinf I*, (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EUA). Les mostres, un cop digerides, es varen separar mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa al 3% en tampó TBE 1X (Tris 0,089 M; Àcid Bòric 0,089 M; EDTA 0,002 M, pH 8),

usant RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (20000X) com agent intercalant (Labotaq, Sevilla, Espanya) i HyperLadder™ 100bp com a marcador de pes molecular (Bioline, Londres, Regne Unit). Els resultats s'observen tal com es veu a la Figura 13.

Els resultats, doncs, es comparen amb l'estudi prèviament citat, però també, com a eina per a comprovar i ampliar el catàleg disponible, a través d'una base de dades online per a la identificació d'espècies de llevat a partir de RFLPs (*Yeast-id.org | Database for rapid identification of yeasts*, sense data).

## Observació microbiològica

En les mostres en que es detectaren importants presències bacterianes, es realitzà una tinció de Gram i una prova de catalasa. Aquestes proves, tradicionals del camp de la microbiologia, són indicadors que ens poden encaminar força cap a la identificació de les espècies presents. Així, sabem que la majoria de bacteris acètics són bacils, gram negatius i catalasa positius, aeròbiques, mentre que els bacteris productors d'àcid làctic solen ser cocs gram positiu, catalasa negatiu, anaeròbiques (Oevelen, de L'Escaille and Verachtert, 1976).

## Anàlisis finals: acidesa i grau alcohòlic

Per la mesura del grau alcohòlic final de la cervesa al final del seguiment, vam fer servir un ebuliòmetre. Aquest mètode és aproximat, però permet obtenir una referència senzilla del grau alcohòlic. L'ebuliòmetre GAB és un matràs amb escalfador i un refrigerador incorporat, en el que es bull el líquid a analitzar fins que assoleix una temperatura equilibrada. A partir de la calibració feta amb aigua destil·lada (que sabem que té un grau alcohòlic de 0º) i una roda de calibració GAB corresponent, podem obtenir un valor de grau alcohòlic, amb una sensibilitat de 0'1%. Això ens resulta útil com a paràmetre final per valorar el procés de fermentació i de

l'atenuació; juntament amb la producció d'àcids ens permet fer a la idea de quin tipus de fermentacions s'hi ha donat i quin rendiment han tingut aquestes.

L'àcidesa total mesura la quantitat d'una base determinada (en el nostre cas hidròxid de sodi, NaOH, 0,1M) neutralitza l'àcid (làctic, fosfòric, etc.) en un volum de líquid, estimant així tant els ions d'hidrogen lliures com els ions d'hidrogen que estan units als àcids febles que poden reaccionar amb la base forta i neutralitzar-se. Les unitats de TA es poden citar en g / L, o dit d'una altra manera, tants grams (d'un àcid específic) en tant de substrat (cervesa) porten el pH d'aquest substrat a un pH predeterminat (per exemple, un pH de 7 o 8.2).

L'àcidesa total no s'orienta a un àcid específic del líquid que mesurem. La cervesa es compon d'àcid làctic, però també d'àcid fosfòric, àcid acètic, etc. Tot i que aquests últims són en quantitats mínimes, encara afecten el resultat final. Als nostres propòsits (i convenció), suposem àcid làctic 100% a la mostra per a la nostra valoració, i apliquem la fórmula de la Figura 14. Per a analitzar-ho, es va realitzar una volumetria amb hidròxid de sodi i fenoftaleïna com a indicador de pH.

$$TA(\text{as lactic acid}) = \frac{\text{mL } 0.1\text{M NaOH} \times 0.9}{\text{mL beer} \times \text{specific grav of beer}}$$

Figura: 14 Fórmula per a calcular l'àcidesa total

L'àcidesa volàtil està constituïda per àcids grassos que pertanyen a la sèrie acètica. El mètode utilitzat implica una destil·lació parcial dels àcids grassos i una valoració amb NaOH, prenent fenolftaleïna com a indicador. Cal tenir present la fracció d'àcidesa volàtil que no es destil·la. Es posa 11 ml de mostra cervesa al matràs del destil·lador (equip GAB), s'afegeix una mica de pedra tosca i s'inicia la destil·lació, escalfant el matràs amb el calefactor de l'equip. El destil·lat es recull amb provetes de graduació especial. Primer amb una de 5,1 ml i després amb una de 3.2 ml. Quan el destil·lat arriba a la marca de la proveta gran es retira i, immediatament se substitueix per la proveta petita. Un cop el destil·lat arriba a la marca d'aquesta es dona per acaba la destil·lació. Per la valoració, el contingut de la proveta petita es posa en un erlenmeyer, s'afegeix un ml d'aigua bullida i unes gotes de solució de fenolftaleïna a l'1% en alcohol neutre de 96% vol i posteriorment es valora amb solució 0.0204 M de NaOH, sent n els mil·lilitre de NaOH consumits. S'ha de tenir en compte que només s'ha destil·lat 1/3 del total.

## RESULTATS I DISCUSSIÓ

En el present apartat, s'analitzaran els resultats obtinguts. Degut a les limitacions d'espai, les dades i resultats no es desenvolupen aquí per complet; aquestes es troben en les taules dels Annexos. Gràficament, els resultats es troben compilats en gràfics que reflecteixen la evolució al llarg del seguiment, separant les dues característiques climàtiques estudiades: sol i pluja. Quan als gràfics es fa referència a "Mostra", aquesta fa referència a la mostra no inoculada, la base de les altres fermentacions. Aquesta va ser mesurada únicament el dia d'arribada, al considerar-se que no havia de evolucionar més enllà. Aquest valor de referència s'inclou a les gràfiques amb l'objectiu de valorar millor la evolució i efectivitat.

Com a apunt, es feren observacions visuals i olfactivas de les mostres per a valorar la dimensió organolèptica i macroscòpica. Les mostres "Sol" evolucionaren de forma totalment òptima, obtenint característiques primerenques que recorden fins cert punt a cerveses espontànies de Segarra, com la recent "Wild Wind", amb un *blend* de fins a 5 anys en barrica. Presenten un color més intens i uns aromes equilibrats, amb tocs àcids però també maltosos i d'èsters afruitats. Pel contrari, les mostres "Pluja" han desenvolupat un tel considerable, característic de moltes cerveses àcides però que es desenvolupa de forma més tardana, com a conseqüència de espècies com *Candida* o *Pichia* (entre d'altres) (Oevelen, DE L'Escaille i Verachtert, 1976), així com filaments blanquinosos que suggereixen fongs. També els aromes són molt desagradables, recordant a l'àcid caprílic, així com una important fortor acètica. En conjunt, organolèpticament parlant, podem afirmar que les mostres "Pluja" no resulten satisfactòries.

### pH

Els resultats es resumeixen a la Figura 15. El pH inicial d'aquesta mostra fou de 4,5, que es troba dintre del rang desitjat per a la elaboració de cervesa, tal qual es veu en la "Mostra", que és el most base. Podem observar que, en les mostres "Sol", es segueix una progressió comparable amb la de la Figura 16, provinent d'un estudi sobre el paper de les bacteries productores d'àcid acètic en barrils de fermentació espontània (de Roos *et al.*, 2018), si tenim en compte el període de 5 setmanes.

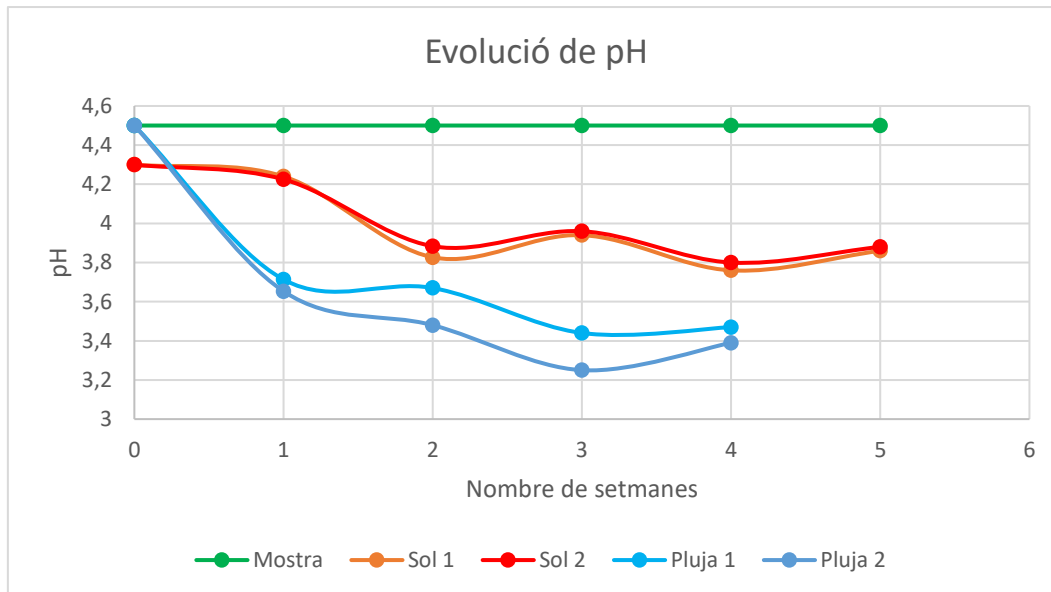


Figura: 15 Evolució del pH en les 4 mostres al llarg de 5 setmanes, partint del pH del most inicial

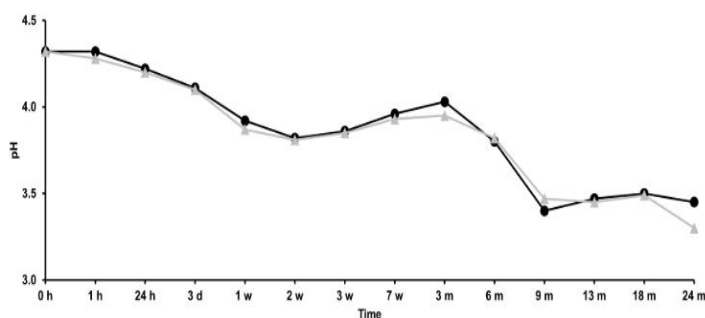


Figura: 16 Evolució del pH amb valor referencial, segons l'estudi (de Roos, Vandamme and de Vuyst, 2018).

Les mostres "Sol" denoten un comportament correcte i esperable d'aquest tipus de fermentacions. Cal mencionar que, malgrat només passaren 24 hores de diferència des

de la inoculació fins a l'anàlisi al laboratori, el pH descendí de 4'5 a 4'3 respecte el most. La primera setmana es dona una petita baixada del pH, duent-ho de 4'3 a 4'2, un pH ideal per a *Enterobacteria* i, més importantment, *Saccharomyces cerevisiae*. L'inici de la fermentació, considerant des del temps 0 fins a la setmana 1, fou lenta, degut probablement (com comentarem en posteriors apartats) a la baixa viabilitat dels llevats inoculats en primer terme, o, possiblement, a que, com s'explica en articles sobre aquest tipus de cervesa, la primera fase, generalment dominada per *Kloeckera* o *Enterobacteria*, és lenta i breu (Oevelen, DE L'Escaille i Verachtert, 1976; De Roos, Vandamme i De Vuyst, 2018). En la segona setmana, la fermentació podem observar que s'inicia de forma més important, ja que es dona una baixada de pH típica dels microorganismes fermentadors com *Saccharomyces c.* (de forma paral·lela al descens de pH) fins a un pH de 3'8 aproximadament, el qual és un rang baix per a la majoria de cerveses, però és acceptable en aquest estil. Podem observar, curiosament, com a la tercera setmana hi ha un repunt de pH fins al voltant de 4, per tornar a baixar a continuació. No està clar si això fou

degut a alguna interferència amb la presa de dades o realment hi hagué aquest canvi fisicoquímic en el most, però degut a les tres repeticions mesurades en dues mostres independents, cal considerar-ho correcte. En conjunt, podem afirmar que les mostres “Sol” van seguir una acidificació correcta per l’estil de cervesa, assolint un valor més o menys estable a partir de la 3a setmana d’aproximadament 3’8. Ambdues mostres tenen un comportament quasi idèntic, amb poca o cap diferència entre elles. Probablement, si es deixés fermentar aquesta cervesa durant un període llarg (especialment amb una maduració en barrica on, com alguns estudis han demostrat, és on s’inocula una important varietat d’espècies, tals com *Pediococcus* o *Brettanomyces* (De Roos, Van der Veken i De Vuyst, 2019)) el pH acabaria sent considerablement inferior.

Un cas menys estàndard el trobem en les mostres de “Pluja”, essent auguri d’algun tipus d’interferència amb la fermentació. En la primera setmana, el descens fou de 4’5 (en aquestes no hi hagué cap diferència entre el most no inoculat i la mostra a temps 0) fins a 3’65, un descens formidable en tant poc temps. Aquest valor es mantingué similar fins la segona setmana, però és a partir de la tercera que cau molt, fins a 3’4 en “Pluja 1” i fins a 3’25 a “Pluja 2”. Aquests valors són extremadament àcids, i no són habituals a un punt tant primerenc de la fermentació, si seguís un procés similar a una Lambic (tal qual es descriu en la Introducció). Són indicadors de que hi ha hagut algun problema en la fermentació, alguna contaminació. Cal mencionar que la mostra “Pluja 2”, es pogué observar a partir de la 2a setmana fongs en el tap, el qual es canvià setmanalment a partir d’allò. Això no obstant, la dimensió organolèptica de la mostra es veié altament deteriorada, pel que podem parlar de contaminació fúngica. Degut a la atenció posada a mantenir la esterilitat a la hora de treballar amb les mostres, i la llibertat oferta a la hora de la inoculació, és lògic proposar que aquests organismes eren presents en la mostra quan aquesta fou inoculada.

## Densitat

Com podem observar a la Figura 17, l’evolució de les densitats ens dóna un relat més clar de la situació. La densitat original al final de la elaboració fou de 1033, i en les mostres de “Sol”, va disminuir ràpidament, en unes 2 setmanes, fins a 1008, arribant a estabilitzar-se a 1005 a la 3a setmana, però és entre la primera i segona setmana que la fermentació es veu més accelerada. De nou, com s’ha comentat a l’apartat anterior, aquesta densitat podria baixar més amb el temps, però la alta concentració de llevat en plaques i el descens bruscat i posterior estabilització de la densitat final a 1005 implica una fermentació correcta per part de llevats, tant *Saccharomyces* com d’altres tipus.

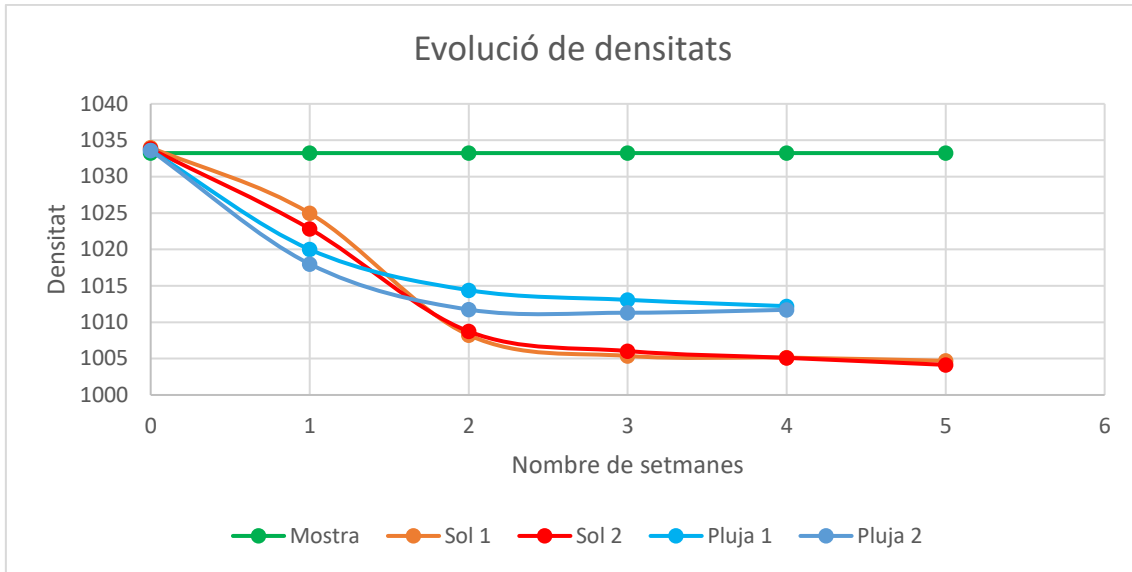


Figura: 17 Evolució de la densitat a través del seguiment. S'observa una clara parada fermentativa a les mostres "Pluja"

Per altra banda, podem observar com en les mostres "Pluja", no es dona una atenuació completa, veient-se reflectit en una parada fermentativa a partir de la 2a setmana. L'inici fou, de per si, més lent, i podem veure com la fermentació es queda aturada a 1011 de densitat, el qual és un valor molt més alt de l'esperat. Això, junt amb la resta de proves, indica una atenuació incompleta i a una generació d'àcid molt gran amb respecte a alcohol, com es veurà a la anàlisi de paràmetres finals.

## Recompte cel·lular i viables

Els recomptes en càmera de Neubauer es realitzaren de forma periòdica durant el conjunt del seguiment, i es resumeixen a la Figura 18. Podem observar com el nivell base, el most "no inoculat" té una presència considerable de microorganismes. Això pot ser degut a una contaminació en l'intercanviador de plaques (poc probable, ja que se li va fer el protocol de neteja i desinfecció complert abans d'elaborar la cervesa) o en la olla de cocció (altament improbable degut a les altes temperatures que s'hi dona). La proposta més plausible, doncs, és que provingui de l'ampolla d'aigua que vam utilitzar per al transport, la qual era nova i per tant, teòricament estèril, però que no aconseguíem un bon aïllament, que permetria la entrada de microorganismes per l'aire. Tot i així, la concentració és elevada, de quasi un milió de cèl·lules per mL. Val la pena mencionar que la viabilitat d'aquests en aquest temps resultà baixíssima, tant que no ho vam considerar valorable degut a la petita mida dels llevats salvatges.

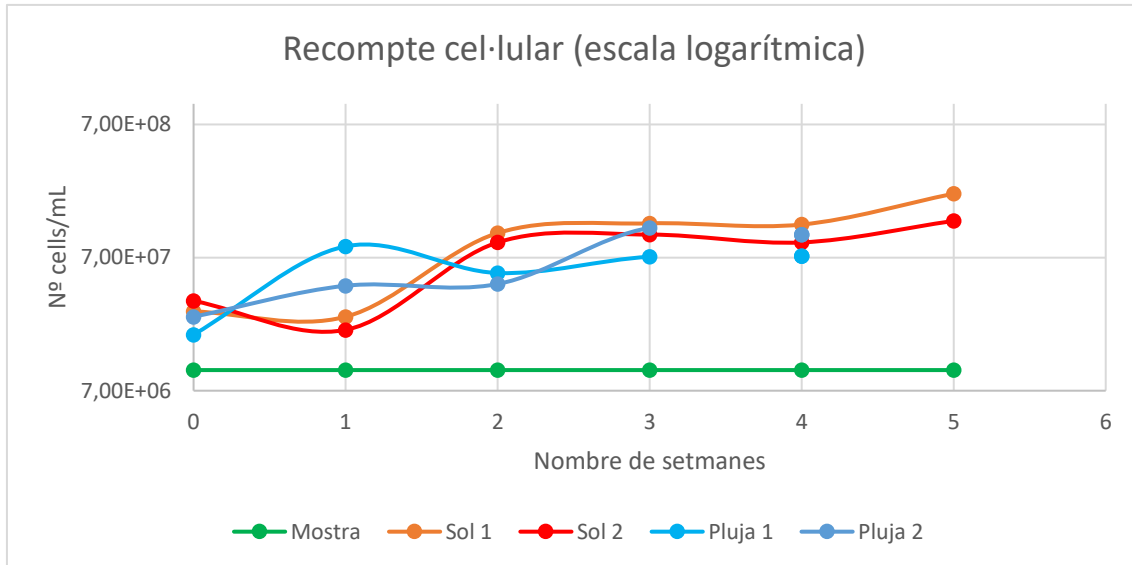


Figura: 18 Recompte de cèl·lules totals en càmara de Neubauer

Les mostres inoculades, però, dupliquen i tripliquen aquesta taxa, arribant a concentracions òptimes per a un inici de fermentació. En les mostres “Sol”, tot i un aparent primer descens (causat sens dubte per la baixa viabilitat inicial), el nombre de cèl·lules augmentà enormement, arribant en la mostra 1 fins a una escala de  $10^8$  UFC/mL i mantenint-se estable a partir de llavors, indicant que el llevat es troba en fase estacionària, on s’ha donat ja la primera etapa de fermentació.

Tot i que les mostres “Pluja” sembla que inicien abans el creixement cel·lular, i que aquest és menys lineal o estable. A partir de la tercera setmana, el nombre de cèl·lules/mL sembla igualar-se amb l’altra condició, però tot i així, mai s’arriba a la mateixa concentració ni, com veurem en breus, a la mateixa viabilitat.

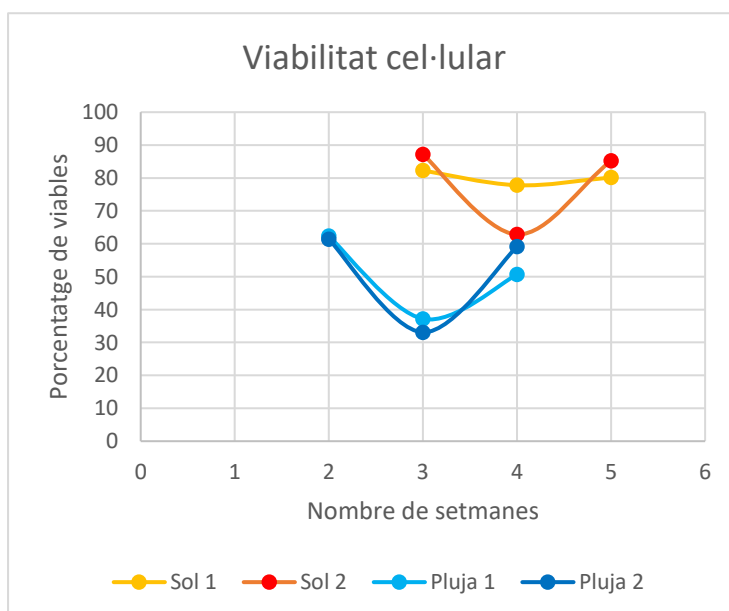


Figura: 19 Viabilitat cel·lular de les diferents mostres en etapes tardanes del seguiment

La viabilitat cel·lular en les primeres setmanes resultava difícil d’avaluar, degut en part a una manca de temps i, especialment a la alta inviabilitat que observàrem a temps 0. Això no obstant, les últimes setmanes es feu el seguiment, per veure la viabilitat dels microorganismes presents, el

resultat es troba a la Figura 19. Tot i que ambdues condicions presenten una curiosa “baixada”, aquesta fou presa a la mateixa data cronològica per ambdues (degut a que la mostra “Pluja” seguia un retràs d’una setmana respecte l’altra. La viabilitat general, però, es manté del voltant del 60% un cop recuperada en el cas de “Pluja”, arribant a mínims de 40%. Per altra banda, en “Sol”, això oscil·la entre 80% fins 60%. Podem veure que aquesta condició afavoreix el creixement i, especialment, el manteniment de la viabilitat al llarg de la fermentació, mentre que les mostres preses en condicions d’alta humitat tenen un percentatge de cèl·lules mortes molt superior; de fet, comparable a l’altra condició en el moment de més disminució.

### Creixement en plaques de cultiu

El gruix més important de la feina de laboratori resultà ser la preparació, sembra, incubació i anàlisi de les plaques dels 4 medis diferents amb que treballarem. La considerable quantitat de dades obtingudes arrel d’això es troben resumides a la Taula 3 dels Annexos. En ella, es presenten els resultats en UFC/mL, havent desfet la dilució present en cada cas. Ara, analitzarem els resultats entre les 2 condicions estudiades. Els resultats es presenten en escala logarítmica, per tal de facilitar la comprensió dels resultats, degut a que estem treballant en concentracions de l’escala de  $10^8$  UFC/mL. Un exemple de les plaques es pot observar a la Figura 20.



*Figura: 20 Exemples fotogràfic de creixement de colònies en placa*

Les mostres “Sol” presenten, des de l’inici, elevades quantitats de llevats, tant *Saccharomyces* com no-*Saccharomyces*. La taxa de inoculació fou altíssima, per bé que la viabilitat, no tant, cosa que permeté un inici de fermentació ràpid i correcte. Podem observar, de fet, que al llarg del procés, malgrat existir variacions, en la mostra “Sol 1” (Figura 21), la concentració de UFC es manté quasi estable, en l’escala de  $10^7$ - $10^8$  UFC/mL. En la mostra “Sol 2” (Figura 22), curiosament, la població de llevat no-*Saccharomyces* a l’inici és molt baixa (comparativament), però en el transcurs d’una setmana, s’equipara a la de llevat total, seguint una progressió quasi paral·lela. No tenim dades de les plaques de cloramfenicol de la setmana 5, degut a un problema

amb el medi, però cal suposar que aquesta similitud seguirà durant un període, fins a acabar imposant-se uns sobre els altres. En ambdós casos, no tenim una població constant en les plaques de natamicina ni cicloheximida; això pot indicar tant un problema metodològic (un cop acabat l'experiment, vam plantejar que s'hauria pogut conservar un fermentador en condicions anaeròbiques per a potenciar el creixement, per exemple, de bacteries làctiques) com variacions i substitucions entre les diferents espècies. Quan es detecta presència bacteriana, però, sol ser en baixes concentracions; i les colònies apareixen de forma encara més esporàdica a cicloheximida, suggerint potser la presència de *Brettanomyces* o *Hanseniaspora*. En "Sol 2", la presència bacteriana és més present en les primeres setmanes de fermentació, en canvi, a "Sol 1", apareix a mitjans de fermentació; la última dada (setmana 5) de cicloheximida indica una concentració comparable amb la de llevats, cosa molt curiosa.

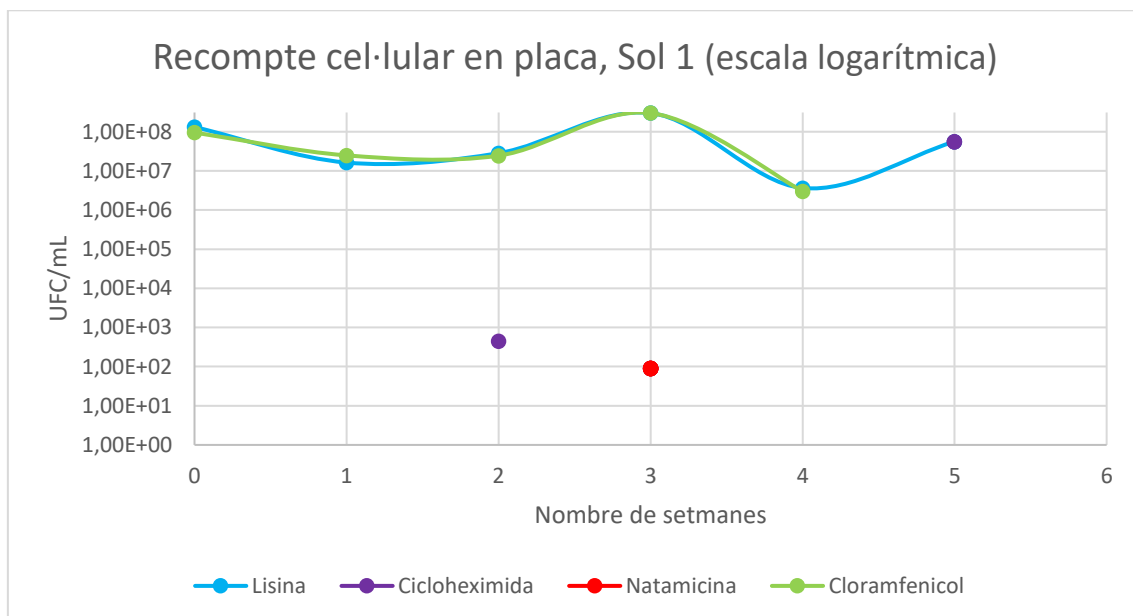


Figura: 21 Gràfic de l'evolució de les diferents plaques en les mostres Sol 1, en escala logarítmica

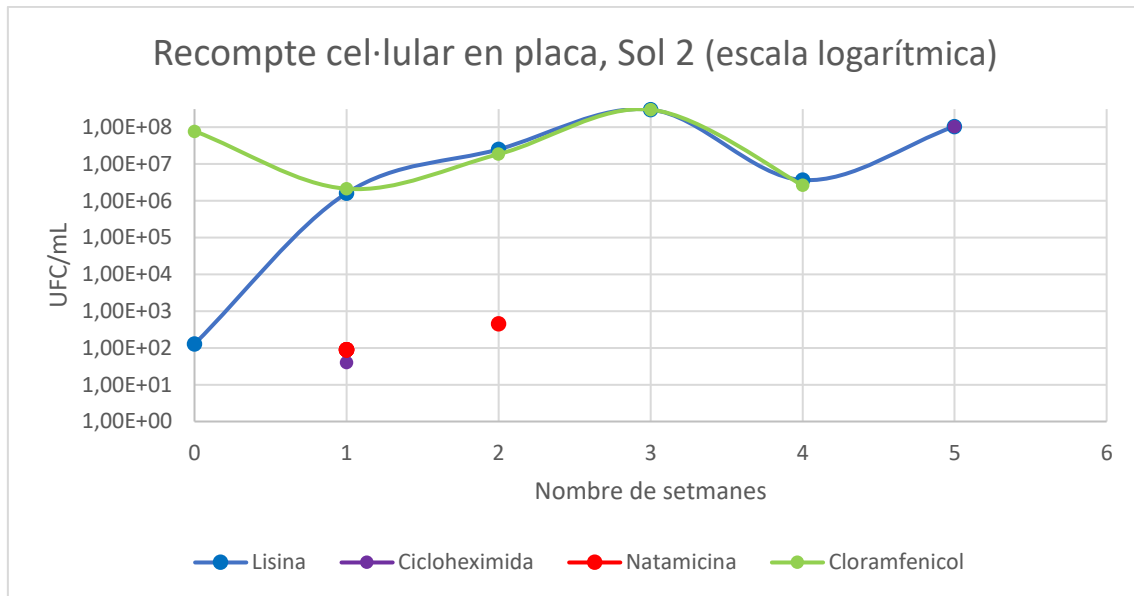


Figura: 22 Gràfic de l'evolució de les diferents plaques en les mostres Sol 2, en escala logarítmica

La comparativa entre les mostres de “Sol” i “Pluja” és certament reveladora, fins i tot consultant únicament la escala, com s’observa a les Figures 23 i 24. La magnitud en el moment de la inoculació es compta pels milers, no els milions, i no arriba fins a  $10^7$  fins passades unes 2 setmanes, mentre que a les mostres “Sol”, excedia aquest valor ja en el moment de la inoculació. La concentració màxima, a més, amb prou feines supera el milió en el seu zenit, pel que en les mostres “Pluja”, la quantitat de llevat és molt menor. A més, i malgrat no resulta constant pels possibles problemes comentats amb anterioritat, a la última setmana, en ambdues plaques, la concentració bacteriana és tant o més elevada que la de llevats, podent reflectir la “contaminació” de la qual hem descrit l’efecte en apartats anteriors.

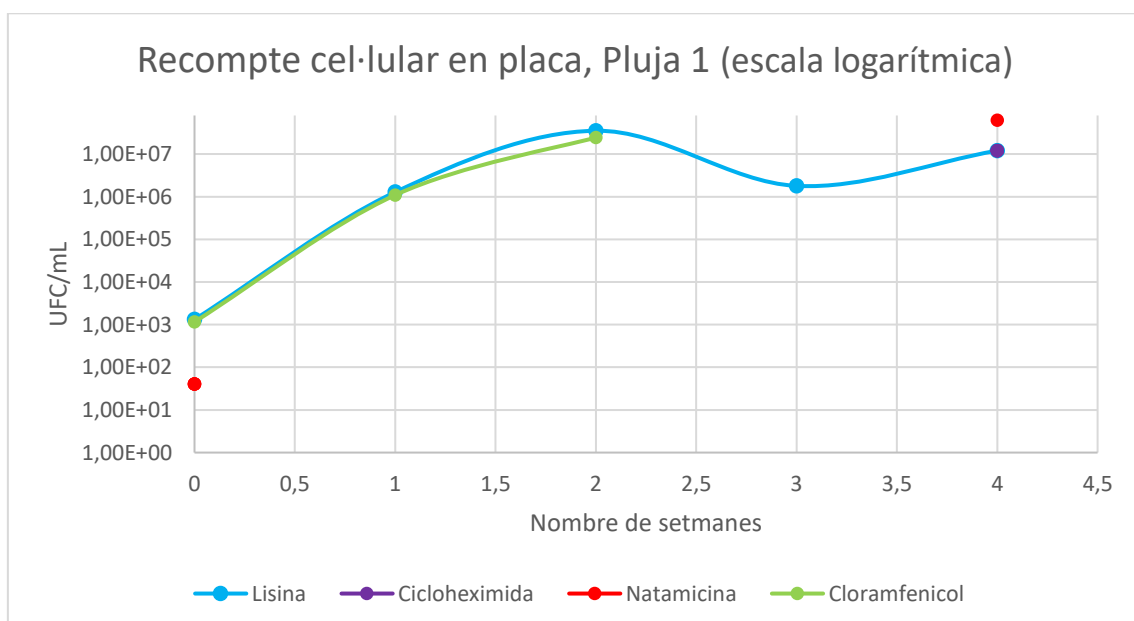


Figura: 23 Gràfic de l'evolució de les diferents plaques en les mostres Pluja 1, en escala logarítmica

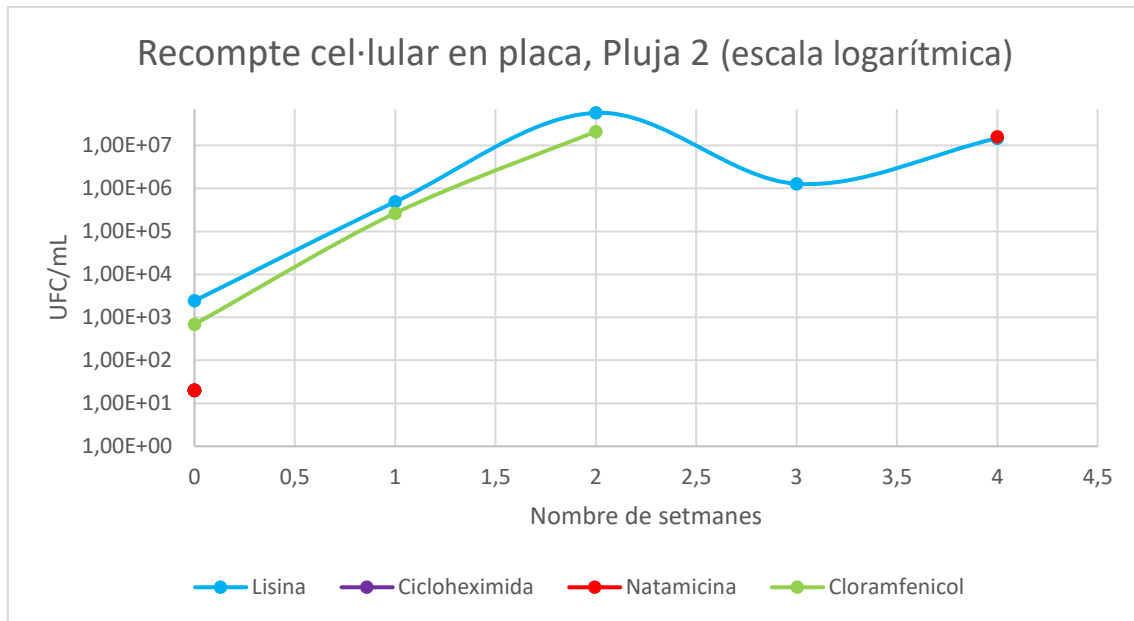


Figura: 24 Gràfic de l'evolució de les diferents plaques en les mostres Pluja 2, en escala logarítmica

En conjunt, observem un comportament similar entre les repeticions, però una clara diferència entre condicions. En "Sol", la concentració de llevat és molt superior, i es manté estable, a més la concentració de bacteris, quan apareix, és considerablement inferior. Per altra banda, a "Pluja", la concentració d'inoculació és baixíssima, i tarda 2 setmanes a augmentar fins a un rang vàlid per a una fermentació òptima; aquest inici lent causat per això podria ser una de les causes del resultat final, no satisfactori. Per altra banda, la població bacteriana acaba sent tant elevada com la de llevat, al contrari que a les altres condicions. Podem concloure que existeixen diferències significatives, i que per tant és indispensable estar atent a les condicions climàtiques a la hora de fer una inoculació espontània en *coolship*.

## Resultats de la identificació molecular de microorganismes amb PCR

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) és una tècnica que permet amplificar fragments de DNA presents en una mostra, augmentant-ne exponencialment el nombre de mostres. Això permet identificar amb certesa les espècies microbiològiques presents a la mostra, detectar poblacions de mínima presència, si es realitza correctament. A més, a partir de la partició en fragments a partir d'enzims de restricció d'actuació coneguda, és possible arribar a nivells de discerniments molt importants. L'ús de PCR és important ja que al inocular-se espontàniament, no estem segurs de què pot ser-hi present i és important detectar certs microorganismes per un tema de evitar contaminacions indesitjades. Certes espècies, com la pròpia *Brettanomyces*,

resulten difícils de detectar amb mètodes tradicionals com plaques, i ofereixen millors resultats mitjançant PCR (Benito *et al.*, 2012).

En aquest treball, es va plantejar la PCR com a un pas futur que permetria ampliar els resultats obtinguts i definir de forma molt més exacta quins microorganismes teníem presents en el most. Només es pogué realitzar una restricció amb enzim de restricció HinfI; això va aportar resultats preliminars però ni molt menys definitius, pel que seria interessant utilitzar una major gamma d'enzims per a poder centrar més la cerca.

Les mostres que foren analitzades mitjançant la seva amplificació de la zona XXX i posterior digestió amb enzim de restricció HinfI (PCR-RFLP del rDNA). Els resultats de bandes obtingudes estan resumides resumits a la Taula 6, a Annexos. En ella es detalla de quina de les plaques de repicat prové, quin número de colònia dins de la placa representa, el medi del que es va aïllar, si era en mostres de Sol o Pluja, la setmana a la que sorgí, el tamany aproximat de la amplificació i el dels fragments de restricció, i una proposta d'espècie, a partir de les referències de (*Yeast-id.org | Database for rapid identification of yeasts*, sense data; Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

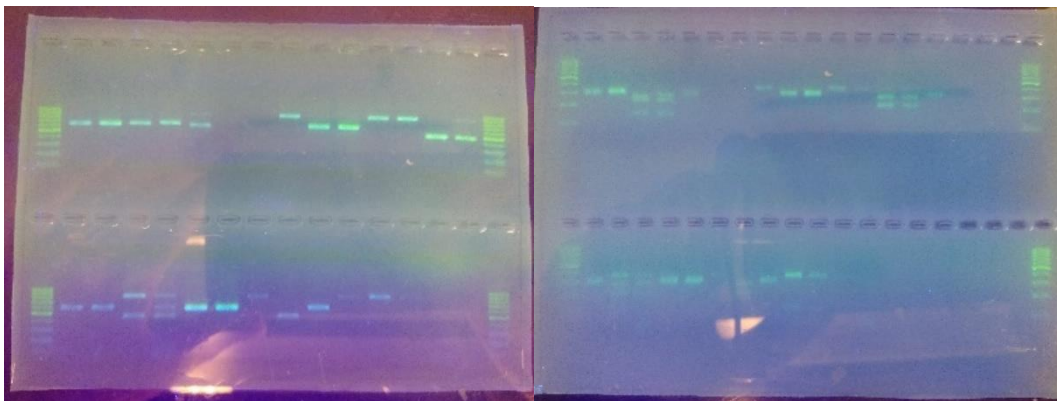


Figura: 25 Fotografies de l'amplificació (esquerra) i restricció de fragments (dreta)

En la Figura 25 podem observar que, en la majoria de casos, la PCR funcionà segons el que seria esperable, i que en general, hi va haver poca heterogeneïtat entre les diferents mostres, suggerint que moltes d'elles són la mateixa espècie, o si més no, molt similars. Degut a les clares diferències morfològiques apreciables a simple vista, resulta difícil de creure això, pel que és lògic suposar que es tracta de diferents espècies. Això es veu recolzat pel fet que les mides de fragments disponibles resulten en una important varietat d'opcions (moltes del mateix gènere) per a cada mostra; aquest és un dels motius pels que ens referim com a *spp.* i no com a la espècie típicament associada al llarg del treball.

Les principals hipòtesis apunten a la presència de *Candida spp.*, *Hanseniaspora spp.*, *Zygosaccharomyces spp.*, *Picchia spp.*, *Saccharomyces spp.* i *Brettanomyces spp.* Això no obstant, caldria repetir-ho amb les mateixes mostres i altres enzims de restricció per tal de reforçar aquesta teoria, doncs els resultats no són concloents. Per altra banda, caldria realitzar aquest procediment amb el conjunt de colònies, no només amb la selecció que vam poder tractar. En conjunt, però, podem dir que aquest procediment ens ha atorgat una informació valuosa per a visualitzar la possible procedència d'espècies que resulten claus en el procés d'elaboració d'una cervesa espontània.

### Observació microbiològica

Es varen observar algunes de les mostres provinents de les plaques de natamicina d'ambdues condicions, amb l'objectiu d'estudiar quin tipus de bacteris podria haver-hi presents. Es decidí analitzar les mostres de la tercera setmana, un període mig-avançat de la fermentació, al considerar-ho més representatiu. La metodologia es descriu en l'apartat anterior.

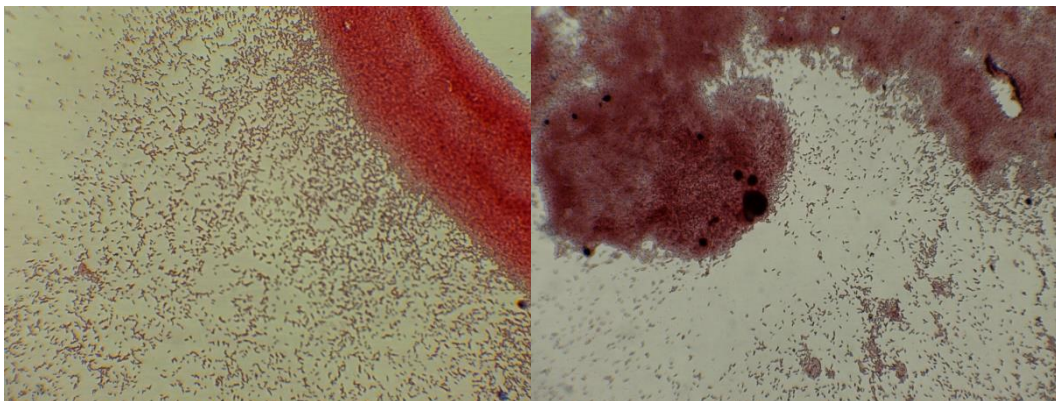
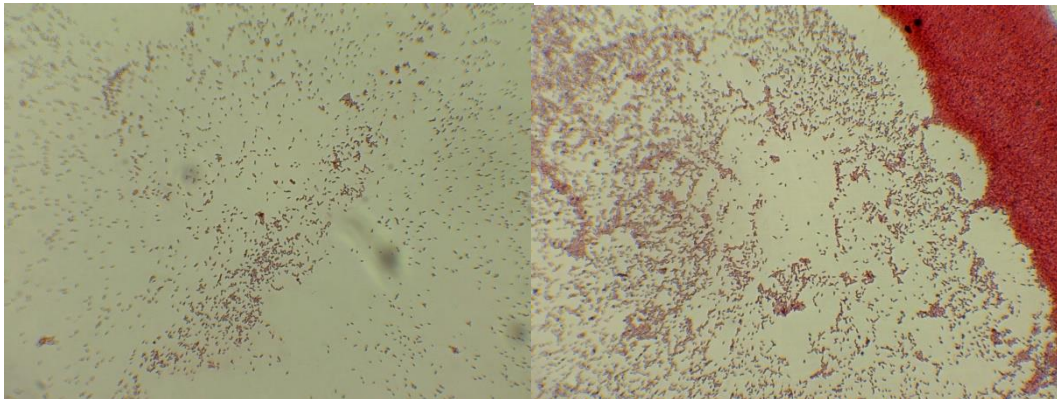


Figura: 26 Fotografies de les observacions de les mostres "Sol"

Com es veu a la Figura 26, la enorme majoria són bacteris catalasa positiu, gram negatiu, i bacils, cosa que indica, generalment, bacteries acètiques. Això té sentit ja que les condicions de fermentació no han estat anaeròbiques, com sí es dona (parcialment) en els fons d'alguns barrils (De Roos, Van der Veken i De Vuyst, 2019); a més, les bacteries acètiques solen ser predominants en el primer any de les fermentacions àcides, i les làctiques, a partir d'aquest període (De Roos, Vandamme i De Vuyst, 2018).

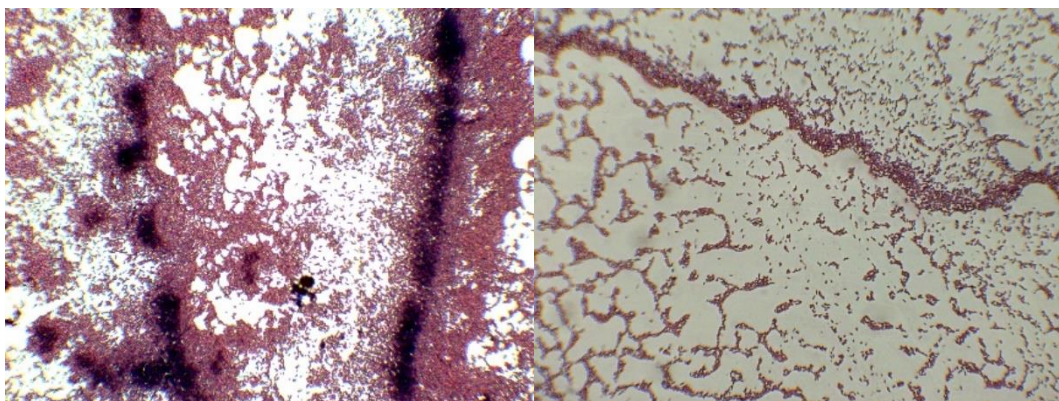
Els bacils de les mostres varien de mida i mobilitat (una mobilitat alta és característica de les bacteries acètiques), però en general són força allargades. En la mostra "Pluja 2" (Figura 27) (la més altament "contaminada" es van detectar també cocs en parella, catalasa positius i gram

positius, cosa que indicaria que es tracten, possiblement, de bacteris làctics (Oevelen, DE L'Escaille i Verachtert, 1976).



*Figura: 27 Fotografies de les mostres "Pluja"*

El que s'ha descrit són els resultats majoritaris, aquells que per enorme diferència dominaven les mostres, però es pogueren observar algunes diferències en certs casos. En les mostres de la Figura 28, extretes de "Sol 1", es poden observar bacils més curts, catalasa positius i gram positius, que no encaixen amb la descripció clàssica de acètiques/làctiques, i que són un exemple de la varietat de microorganismes que poden habitar el most en una cervesa espontània. Caldria un estudi més profund per a discernir amb claredat de què es tracten, però hem pogut observar que en les nostres mostres hi ha una gran varietat, no només en llevats sinó també en bacteris.



*Figura: 28 Bacils gram positius, aïllats a partir de mostres de "Sol 1"*

## Anàlisis finals: acidesa i grau alcohòlic

Un cop donguérem per acabat el seguiment de la fermentació, vam decidir realitzar anàlisis de la acidesa i grau alcohòlic, ja que aquests ens indiquen no tant l'estat de la fermentació, sinó els resultats obtinguts d'aquesta. En concret, la interacció entre àcids i etanol és interessant, ja que aquest actua de substrat per a molts organismes productors d'àcid, pel que un augment

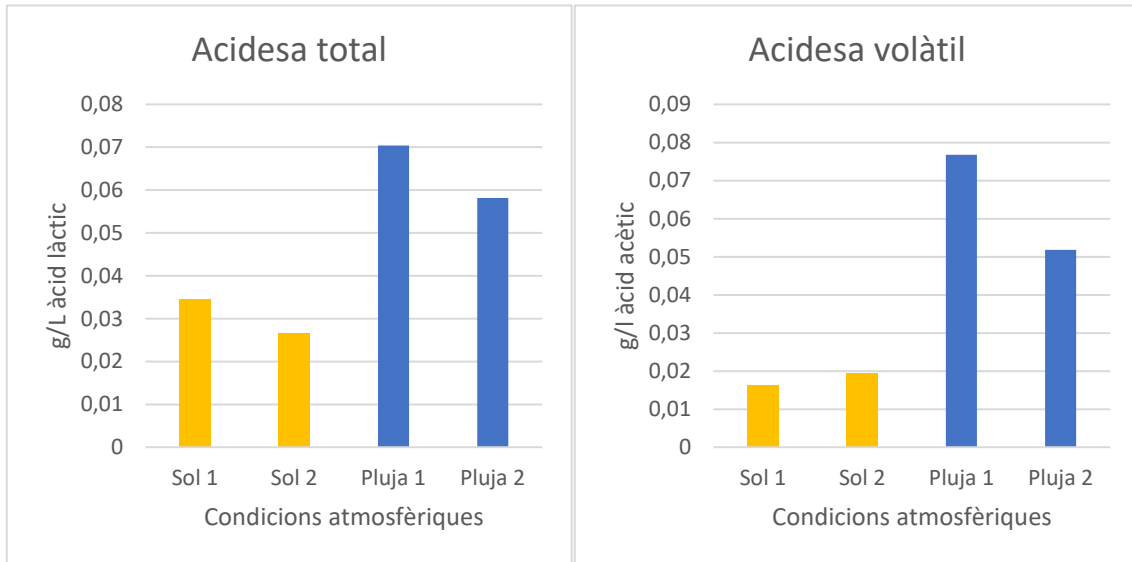


Figura: 29 Concentració dels diferents àcids en el medi estudiat al final del seguiment

d'aquests sol dur a una menor concentració d'etanol. Podem observar en la Figura 29 com les mostres "Pluja" tenen una quantitat molt superior d'àcids en respecte a les mostres de sol, d'entre 2 i 4 vegades superior.

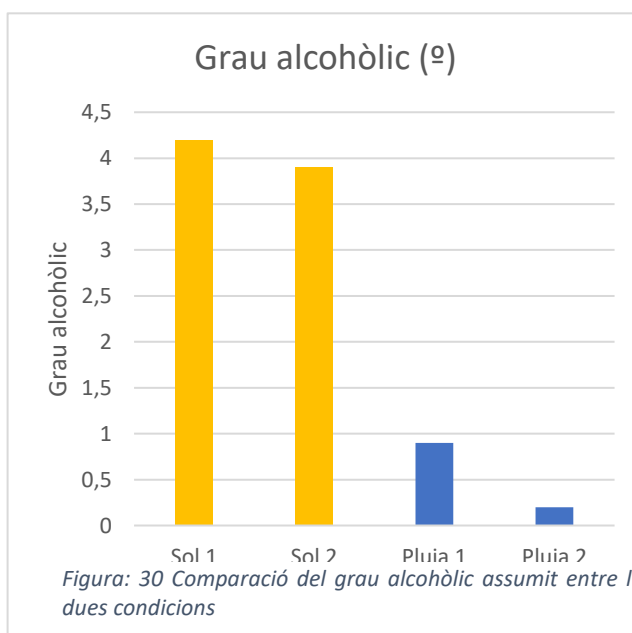


Figura: 30 Comparació del grau alcohòlic assumit entre les dues condicions

Per altra banda, com es veu a la Figura 30, el grau alcohòlic és molt superior en les mostres "Sol", com correspon a la disminució de la densitat, que en "Pluja" sabem que ha tingut una parada fermentativa important. Els 4<sup>o</sup> finals per a "Sol" estan dintre del rang desitjat per l'estil i la cerveseria, tot i que faria falta una llarga maduració per a acabar de fermentar tots els sucres disponibles, com els polisacàrids provinents del blat no-maltejat, cosa que permetria pujar el

contingut alcohòlic. Cal tenir en compte, però, que certs microorganismes utilitzen l'etanol com a substrat per a fermentacions làctiques o acètiques, especialment les darreres, disminuint la concentració d'aquest en el procés (*Spontaneous Fermentation - Milk The Funk Wiki*, sense data). A més, les bacteries acètiques poden condensar àcid acètic i etanol per a sintetitzar acetat d'etil, el qual pot ser desitjat o indesitjats en funció de la concentració (Bossaert *et al.*, 2019). A partir de la informació recopilada a partir dels anàlisis d'acidesa i densitat, podem afirmar que en les mostres "Pluja" es va donar una parada fermentativa, i que el poc etanol que s'hagués produït es feu servir per a fermentacions secundàries (principalment, àcid acètic), cosa que explica els alts nivells d'àcid en les mostres "Pluja" en comparació a les "Sol", i els baixíssims nivells d'alcohol, que amb prou feines arriben a 1º a "Pluja 1" i són quasi inexistent a "Pluja 2", la mostra més contaminada.

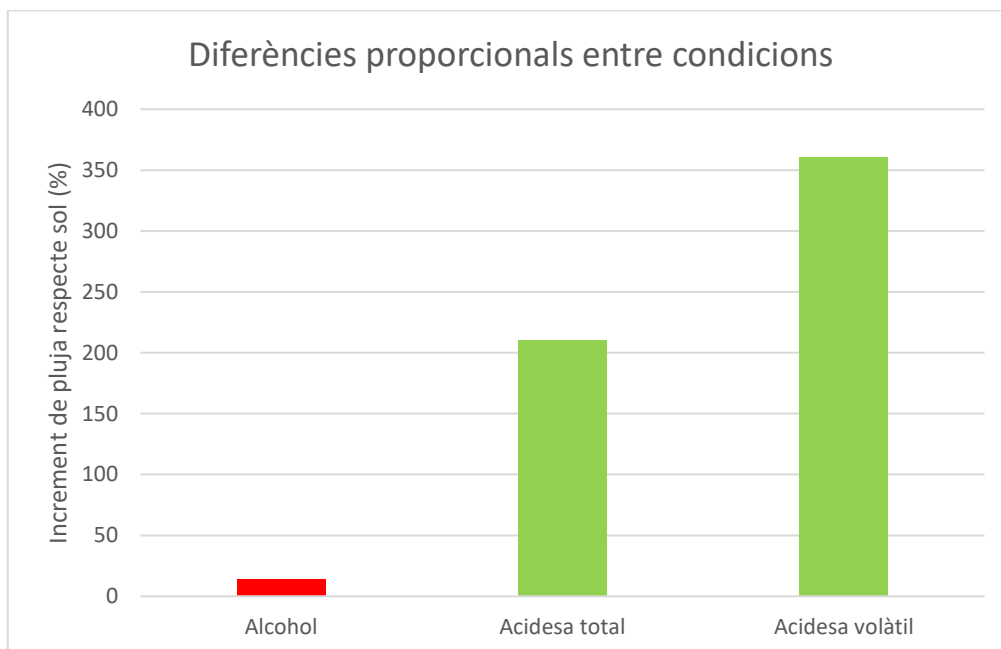


Figura: 31 Percentatges d'augment de les condicions finals de pluja respecte el sol, on l'acidesa total representa l'àcid làctic i la volàtil, l'acètic

Com a últim punt, hem considerat important calcular quin percentatge de canvi implica aquest augment en les mostres "Pluja" respecte les mostres "Sol", i els resultats (Figura 31) han estat extremadament reveladors. Les mostres "Pluja" només van acabar generant un 13% de l'alcohol que van generar les mostres "Sol", però pel contrari, van acabar amb un 210% de l'àcid làctic i un 360% de l'àcid acètic. Aquests resultats són claríssims, i reforcen les conclusions que s'han anat presentant al llarg del present apartat en tant que es va donar una parada fermentativa, i una contaminació que dugué a una importantíssima fermentació àcida.

## CONCLUSIONS

Els resultats obtinguts són satisfactoris, clars i significatius. Es buscava determinar si la climatologia del moment de la inoculació espontània de cervesa influïa o no en el resultat final, ampliant el període d'elaboració tradicional de mesos freds (Spitaels *et al.*, 2014) si les condicions atmosfèriques es mostressin favorables. En aquest estudi, només s'ha valorat la influència de la pluja i la humitat respecte un temps anticiclònic, ambdós a inicis de primavera en un entorn força rural. Les conclusions són altament desfavorables per a la elaboració en condicions d'alta humitat, doncs han resultat en una parada fermentativa, una sobre-acidificació i característiques organolèptiques no desitjades, arrel probablement de la gran quantitat de fongs i bacteries acètiques que hi hem detectat. Aquests resultats s'han contrastat per múltiples mètodes: cultius en placa, seguiment de fermentació, controls de diversos paràmetres i una primera PCR, amb diverses mostres i repeticions, pel que podem afirmar la validesa dels resultats.

Malgrat els resultats no són els que esperàvem obtenir a nivell d'aplicació, sí que resulten claus, i interpretats al revés, serveixen com a un avís sobre quan no fer una inoculació espontània. Gran part de la "màgia" d'aquest tipus de cervesa rau en la seva manca de control humà (si més no pel que respecta a les espècies fermentadores), però això no vol dir que un control dels paràmetres ambientals no pugui permetre una certa modulació per part del cerveser, amb l'objectiu d'assolir el producte desitjat. Creiem que una continuació d'aquest tipus d'estudis podria condensar-se en una guia de referència sobre les condicions climatològiques de gran utilitat per les cerveseries que treballen amb aquesta delicada i complexa varietat de cervesa.

## VALORACIÓ I DIRECCIÓ FUTURA

Aquest treball sorgeix de les pràctiques realitzades a Cerveses Segarreta, de Santa Coloma de Queralt, en el transcurs de l'assignatura de Pràctiques Curriculars. Vaig decidir sol·licitar aquesta estada degut, en primer lloc, a que l'experiència prèvia amb les seves cerveses havia estat molt plaent, i a la percepció que el plantejament i mentalitat de l'empresa s'alineaven amb els meus; la elaboració en barrica i les fermentacions espontànies i àcides, a més, crec que proporcionen un important tret diferencial que desitjava explorar. D'altra banda, la possibilitat de participar en el dia a dia d'una cerveseria artesana i veure tots els passos, fins i tot els no relacionats amb la cervesa en si, com la gestió de magatzem o el repartiment, crec que era una experiència necessària per a consolidar els estudis realitzats.

Respecte al treball en si, considero que la feina de seguiment de fermentació ha estat molt exhaustiva, cosa que ens permet assegurar la qualitat dels resultats, que són significatius i reveladors. La hipòtesi és rellevant en el sector a dia d'avui, i uns resultats positius haguessin obert una interessant finestra d'oportunitat. Hagués estat interessant disposar de més temps per a fer un seguiment a llarg termini, menys periòdic, i de temps i enzims per a realitzar més restriccions per a PCR, per tal de concretar amb major detall les espècies presents. Tot i això, considerem que la informació atorgada és considerable, i que permet extraure conclusions vàlides. D'altra banda, ampliar el nombre de condicions climàtiques seria ideal, però és una càrrega de feina força elevada i no es va poder realitzar.

Allò que valoro més positiu del conjunt ha estat l'aprenentatge, les hores dedicades a elaborar cervesa, la gent que he conegut, els matisos sobre la cervesa que he descobert, i sobretot, la oportunitat de participar a l'InnBrew presentant aquest estudi. M'he sentit recolzat, escoltat i valorat tant pels meus tutors com per la cerveseria, i agraeixo les experiències de tot cor.

## BIBLIOGRAFIA

1. April | 2012 | Eureka Brewing (no date). Available at: <https://eurekabrewing.wordpress.com/2012/04/> (Accessed: June 9, 2021).
2. Beer - World History Encyclopedia (no date). Available at: <https://www.worldhistory.org/Beer/> (Accessed: August 21, 2021).
3. Belloch, C., Uruburu, F. and Querol, A. (1999) "Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers," pp. 329–337.
4. Benito, S. et al. (2012) "Identifying yeasts belonging to the *Brettanomyces*/*Dekkera* genera through the use of selective-differential media," *African Journal of Microbiology Research*, 6(34), pp. 6348–6357. doi: 10.5897/AJMR12.440.
5. Bokulich, N. A., Bamforth, C. W. and Mills, D. A. (2012) "Brewhouse-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American coolship ale," *PLoS ONE*, 7(4). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0035507/.
6. *Brettanomyces Bruxellensis* - an overview | ScienceDirect Topics (no date). Available at: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/brettanomyces-bruxellensis> (Accessed: June 9, 2021).
7. Dyneley Prince, J. (no date) "A HYMN TO NINKASI."
8. Estela-Escalante, W. D. et al. (2016) "Evaluation of the fermentative potential of *Candida zemplinina* yeasts for craft beer fermentation," *Journal of the Institute of Brewing*, 122(3), pp. 530–535. doi: 10.1002/JIB.354.
9. Garreta, A. G. (2019) UTILITZACIÓ DE BARRIQUES EN UNA CERVESERIA ARTESANA PER L'ELABORACIÓ DE CERVESES ÀCIDES., Màster URV.
10. Lázaro, R. M., Soler, S. F. and Cubillos, I. P. (2007) "Detección e identificación de *Brettanomyces*/*Dekkera* en vinos por técnicas moleculares," *Avances en ciencias y técnicas enológicas: transferencia de tecnología de la red GIENOL al sector vitivinícola*, pp. 149–150.
11. Oevelen, D. van, de L'Escaille, F. and Verachtert, H. (1976) "SYNTHESIS OF AROMA COMPONENTS DURING THE SPONTANEOUS FERMENTATION OF LAMBIC AND GUEUZE," *Journal of the Institute of Brewing*, 82(6), pp. 322–326. doi: 10.1002/J.2050-0416.1975.TB06953.X/ABSTRACT.
12. de Roos, J. et al. (2018) "Temporal and Spatial Distribution of the Acetic Acid Bacterium Communities throughout the Wooden Casks Used for the Fermentation and Maturation of Lambic Beer Underlines Their Functional Role FOOD MICROBIOLOGY crossm," *aem.asm.org 1 Applied and Environmental Microbiology*, 84, pp. 2846–2863. doi: 10.1128/AEM.02846-17.
13. de Roos, J., Vandamme, P. and de Vuyst, L. (2018) "Wort substrate consumption and metabolite production during lambic beer fermentation and maturation explain the successive growth of specific bacterial and yeast species," *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV). doi: 10.3389/FMICB.2018.02763.
14. de Roos, J., van der Veken, D. and de Vuyst, L. (2019) "The interior surfaces of wooden barrels are an additional microbial inoculation source for lambic beer production," *Applied and Environmental Microbiology*, 85(1). doi: 10.1128/AEM.02226-18.

15. Scharlau (2017) "Scharlau Microbiology -Ficha de Datos Técnicos Agar Universal Cerveza," pp. 4–5. Available at: <https://www.scharlab.com/catalogo-productos-detalle-referencia.php?r=01-487-500&dw=Bacillus-cereus-Selectivo-Agar-PEMBA-#infotec>.
16. Schifferdecker, A. J. et al. (2014) "The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*." doi: 10.1002/yea.3023.
17. Spaepen, M., van Oevelen, D. and Verachtert, H. (1978) "FATTY ACIDS AND ESTERS PRODUCED DURING THE SPONTANEOUS FERMENTATION OF LAMBIC AND GUEUZE," *Journal of the Institute of Brewing*, 84(5), pp. 278–282. doi: 10.1002/J.2050-0416.1978.TB03888.X/ABSTRACT.
18. Spitaels, F. et al. (2014) "The Microbial Diversity of Traditional Spontaneously Fermented Lambic Beer," *PLoS ONE*, 9(4), p. 95384. doi: 10.1371/journal.pone.0095384.
19. Spontaneous Fermentation - Milk The Funk Wiki (no date). Available at: [http://www.milkthefunk.com/wiki/Spontaneous\\_Fermentation](http://www.milkthefunk.com/wiki/Spontaneous_Fermentation) (Accessed: August 1, 2021).
20. Spontaneous Fermentation: Science, Not Sorcery (no date). Available at: <https://www.craftbeer.com/craft-beer-muses/immaculate-fermentation-science-not-sorcery> (Accessed: August 1, 2021).
21. Tyakht, A. et al. (2021) "Characteristics of bacterial and yeast microbiomes in spontaneous and mixed-fermentation beer and cider," *Food Microbiology*, 94, p. 103658. doi: 10.1016/J.FM.2020.103658.
22. Why sequence *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*? - DOE Joint Genome Institute (no date). Available at: <https://jgi.doe.gov/why-sequence-dekkera-brettanomyces-bruxellensis/> (Accessed: June 9, 2021).

## ANNEXOS

### Taules de seguiment

Taula 1 Taula de seguiment de pH, densitat i recompte cel·lular

Data d'inici	pH	Temps 0	1 Setmana	2 setmanes	3 setmanes	4Setmanes	5 setmanes
7/5/2021	Mostra	4,5					
7/5/2021	Sol 1	4,3	4,22	3,83	3,94	3,76	3,88
			4,26	3,82			3,86
				3,83			3,84
	Sol 2	4,3	4,22	3,87	3,96	3,8	3,87
			4,23	3,91			3,89
			3,87				
12/5/2021	Pluja 1	4,5	3,72	3,67	3,44	3,47	
			3,71				
			3,71				
	Pluja 2	4,5	3,65	3,48	3,25	3,39	
			3,65				
		3,66					
Data d'inici	Densitat	Temps 0	1 Setmana	2 setmanes	3 setmanes	4Setmanes	5 setmanes
7/5/2021	Mostra	1033,1					
		1033,3					
		1033,3					
7/5/2021	Sol 1	1034,2	1024,9	1008,2	1005,4	1005,1	1004,8
		1034,2	1025	1008,3	1005,5	1005,2	1004,7
		1033,6	1025	1008,2	1005,2	1005,1	1004,6
	Sol 2	1033,3	1022,7	1008,7	1006	1004,9	1004
		1034	1022,9	1008,8	1005,8	1005,1	1004,2
		1034,1	1022,9	1008,7	1006,3	1005,3	1004,2
12/5/2021	Pluja 1	1033,5	1020	1014,4	1013,1	1012,3	
		1033,6	1020	1014,4	1013	1012,2	
		1033,7	1020	1014,4	1013,1	1012,1	
	Pluja 2	1033,4	1017,9	1011,7	1011,5	1011,8	
		1033,7	1018,1	1011,8	1011,1	1011,6	
		1033,7	1018	1011,7	1011,3	1011,7	

Data d'inici	Recompte cel·lular	Temps 0	1 Setmana	2 setmanes	3 setmanes	4Setmanes	5 setmanes
7/5/2021	Mostra	200					
7/5/2021	Sol 1	552	503	2140	2530	2480	4230
	Sol 2	662	401	1820	2084	1820	2640
12/5/2021	Pluja 1	369	1700	1072	1420	1440	
	Pluja 2	503	860	886	2340	2080	

Taula 2 Viabilitat cel·lular, en percentatges de viables vs total

Data d'inici	Viabilitat cel·lular	Temps 0	1 Setmana	2 setmanes	3 setmanes	4Setmanes	5 Setmanes
7/5/2021	Mostra						
7/5/2021	Sol 1				82,29	77,8	80,14
	Sol 2				87,21	62,84	85,22
12/5/2021	Pluja 1			62,31	37,18	50,64	
	Pluja 2			61,39	33,1	59,13	

## Taules de recompte cel·lular

Taula 3 Recompte de UFC en els diferents medis i mostres al llarg del temps, en UFC/mL

Sol 1				
Medi				
Nº Setmanes	Lisina	Cicloheximida	Natamicina	Cloramfenicol
0	1,32E+08	0,00E+00	0,00E+00	9,50E+07
1	1,63E+07	0,00E+00	0,00E+00	2,49E+07
2	2,83E+07	4,50E+02	0,00E+00	2,45E+07
3	3,00E+08	9,00E+01	0,00E+00	3,00E+08
4	3,65E+06	0,00E+00	0,00E+00	3,00E+06
5	5,60E+07	0,00E+00	0,00E+00	
Sol 2				
Medi				
Nº Setmanes	Lisina	Cicloheximida	Natamicina	Cloramfenicol
0	1,28E+02	0,00E+00	0,00E+00	7,80E+07
1	1,61E+06	4,00E+01	9,00E+01	2,12E+06
2	2,50E+07	4,60E+02	0,00E+00	1,85E+07
3	3,00E+08	0,00E+00	0,00E+00	3,00E+08
4	3,65E+06	0,00E+00	0,00E+00	2,65E+06
5	1,05E+08	0,00E+00	0,00E+00	
Pluja 1				
Medi				
Nº Setmanes	Lisina	Cicloheximida	Natamicina	Cloramfenicol
0	1,32E+03	-	4,00E+01	1,16E+03
1	1,28E+06	-	-	1,09E+06
2	3,51E+07	-	-	2,44E+07
3	1,79E+06	-	-	
4	1,20E+07	-	6,20E+07	
Pluja 2				
Medi				
Nº Setmanes	Lisina	Cicloheximida	Natamicina	Cloramfenicol
0	2,43E+03	2,00E+01	-	6,90E+02
1	4,87E+05	-	-	2,66E+05
2	5,72E+07	-	-	2,09E+07
3	1,28E+06	-	-	
4	1,47E+07	-	1,59E+07	

## Taules de valors d'acidesa i grau alcohòlic

Taula 4 Valors finals d'acidesa i grau alcohòlic

Grau alcohòlic (º)		Mitjana
Sol 1	4,2	4,05
Sol 2	3,9	
Pluja 1	0,9	0,55
Pluja 2	0,2	
<b>Increment pluja respecte sol</b>	13,5802469	
Acidesa total (mL NaOH consumit)		Mitjana
Sol 1	0,03456	0,030625
Sol 2	0,02669	
Pluja 1	0,0704	0,06429
Pluja 2	0,05818	
<b>Increment pluja respecte sol</b>	210	
Acidesa volàtil (mL NaOH consumit)		Mitjana
Sol 1	0,0161568	0,0178092
Sol 2	0,0194616	
Pluja 1	0,0767448	0,06426
Pluja 2	0,0517752	
<b>Increment pluja respecte sol</b>	360,824742	

## Taula de valoració de PCR

Taula 5: Taula de referència (reduïda) per a la identificació d'espècies amb HinfI

Espècies	Fragmentos ITS	CfoI	HaeIII	HinfI
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	880	385+365	320+230+180+150	365+365+155
<i>Candida zemplinina / Starmelera bacillaris</i>	475	215+110+80+60		475 235+235
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	750	320+310+105		750 350+200+180
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	400	205+100+95	280+100	200+190
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	800	330+220+150+100		800 410+380
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	485	255+140+90	375+95	270+215
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	790	320+270+95+95	690+90	340+225+160+55

<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1050	600+400	1050	600+450
<i>Lachancea thermotolerans</i>	700	315 +285+95	310+215+90+90	355+345
<i>Hanseniaspora vineae</i>	750	275+185+150+95	460+120+90+80	375+375

Taula 6 Origen de les colònies repicades i possibles propostes d'espècies, a partir de la PCR

Proposta d'espècie	Tamany de digestió	Tamany aproximant	Descripció al replicat	Temps	Condició	Medi	Número	Placa	Número
Candida/Zygosaccharomyces fermentati/Candida	325+325	650	Blanquina	0	Sol	Lys	1	7	1
Candida/Zygosaccharomyces/Picchia	325+326	650	Blanquina	0	Sol	Lys	1	7	1
Candida/pichia	150+220+240	650	Grogós amb tocs salmó	0	Sol	Lys	8	7	8
Candida/pichia	150+220+240	650	Grogós amb tocs salmó	0	Sol	Lys	9	7	9
Candida/Zygosaccharomyces/Picchia	300+300	650	Blanc, forma poc definida	1	Sol	Ciclo	3	5	3
	-	-	Taronjós	2	Pluja 2	Clor	7	5	7
	-	-	Crema, amb una protuberància central	2	Sol 2	Clor	1	3	1
Saccharomyces cerevisiae	400+400	850	Crema, amb una protuberància central	2	Sol 3	Clor	2	3	2
Hanseniaspora vineae	320+320	700	Blanques, llises i petites	2	Sol 2	Clor	1	3	1
Hanseniaspora vineae	320+320	700	Blanques, llises i petites	2	Sol 2	Clor	2	3	2
Saccharomyces cerevisiae	400+400	850	Blanc cremós	1	Pluja 1	Clor	1	4	1
Saccharomyces cerevisiae	400+400	850	Blanc cremós	1	Pluja 1	Clor	2	4	2

13	4	8	Clo r	Plu ja 1	1	Rosades peludes	550	300+250	Candida sp
14	4	9	Clo r	Plu ja 1	1	Rosades peludes	550	300+250	Candida spp
15	11	3	Clo r	Sol 1	3	Blanc mate	600	320+320	Candida spp
16	11	4	Clo r	Sol 2	3	Blanc mate	600	300+300	Candida spp
17	11	8	Clo r	Plu ja	3	Colònia rosada	500+750	420+300 +200	
18	11	9	Clo r	Plu ja	3	Rosada	650+500 +650	420+300 +200	
19	11	14	Lys	Sol 1	3	Blanques petites	650	320+320	Candida spp
20	11	15	Lys	Sol 1	3	Blanques petites	650	320+320	Candida spp
21	13	4	Lys	Plu ja 2	3	Blanc petit	850	-	
22	13	9	Lys	Plu ja 2	3	Rosa petit	550	300+250	Candida spp/Brettanomyces bruxellensis
23	13	15	Lys	Sol 2	4	Blanc	650	320+320	Candida spp
24	Placa "TF"			Sol		1 Colònia	900	350+350	Saccharomyces cerevisae
25	Placa "TF"			Sol			900	350+350	Saccharomyces cerevisae
26	Placa "TF"			Plu ja		Colònia Saccharo myces	900	-	
27	Placa "TF"			Plu ja		Colònia fong	-	-	

## Fitxa tècnica de l'agar universal cervesa



Referència : 01-781 **Scharlau Microbiology - Ficha de Datos Técnicos**  
 Producto  
**AGAR UNIVERSAL PARA CERVEZA**

### Especificación

Medio basal que, con la adición de cerveza, se usa para el cultivo de microorganismos significativos en la industria cervecera.

### Fórmula \* en g/L

Leche peptonizada (Peptona).....	15,000	Sulfato de manganeso.....	0,006
D (+) Glucosa.....	16,100	Sulfato férrico.....	0,008
Suplemento de Tomate.....	12,200	Cloruro sódico.....	0,008
Extracto de levadura.....	6,100	Agar.....	15,000
Fosfato dipotásico.....	0,310		
Fosfato monopotásico.....	0,310	pH final a 25°C	6,1± 0,2
Sulfato magnésico.....	0,120		

\*Fórmula ajustada y/o suplementada según necesidades para cumplir los criterios de recuperación

### Reconstitución

Suspender 65 g del polvo en 750 ml de agua destilada y llevar a ebullición con agitación constante hasta la disolución completa. Añadir 250 ml de cerveza y homogeneizar suavemente para desgasificar. Distribuir en recipientes adecuados y esterilizar a la autoclave a 121°C durante 10 minutos.

NOTA: El medio puede hacerse selectivo para detectar contaminantes bacterianos añadiendo 1mg/litro de cicloheximida que inhibe el crecimiento de las levaduras. Si además quiere hacerse diferencial para las colonias productoras de ácido se puede añadir 20 mg/litro de Verde de Bromocresol o 3 g/litro de yeso en polvo que permitirán ver los halos de viraje de color o clareamiento alrededor de las colonias.

### Descripción

Este medio, con la adición de la cerveza que aporta el alcohol y el lúpulo, crea un ambiente muy favorable para el crecimiento de los microorganismos contaminantes de la cerveza.

La leche peptonizada, el extracto de levadura y el suero de tomate suministran el nitrógeno, vitaminas y factores de crecimiento. La fuente de carbono y energía la suministra la glucosa y los fosfatos tamponan el medio. El cloruro sódico y las otras sales minerales mantienen el equilibrio osmótico. La cerveza aumenta la acción selectiva y estimulante, ya que tanto el alcohol como los componentes del lúpulo eliminan la mayoría de los contaminantes del aire, pero permiten el crecimiento de los organismos adaptados a la cerveza.

Este medio soporta el crecimiento de *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Acetobacter*, *Zymomonas* y las levaduras propias del mosto y cerveza, incluso las cepas salvajes y las contaminantes, pero no es recomendable para el cultivo de *Megasphaera* o *Pectinatus*.

### Técnica

Las muestras se inoculan en la superficie o en masa del medio y se incuban en aerobiosis para detectar la presencia de *Acetobacter* o en anaerobiosis o atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub> para permitir el crecimiento de *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Zymomonas*. Se recomienda una incubación a 28-30 °C durante 3-5 días y exámenes diarios.

### Control de calidad

Temperatura de incubación: 28-30°C **Tiempo de incubación : 3-5 días**  
 Inóculo: 10-100 UFC. Método de siembra en espiral.

Microorganismo	Crecimiento	Observaciones
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	Productividad > 0.70	Condiciones micro- aerofilas
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338	Productividad > 0.70	Condiciones micro- aerofilas
<i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042	Productividad > 0.70	Condiciones micro- aerofilas
<i>Acetobacter acet/</i> ATCC 15973	Productividad > 0.70	Condiciones aeróbicas

Figura: 32 Fitxa tècnica de l'agar universal cervesa