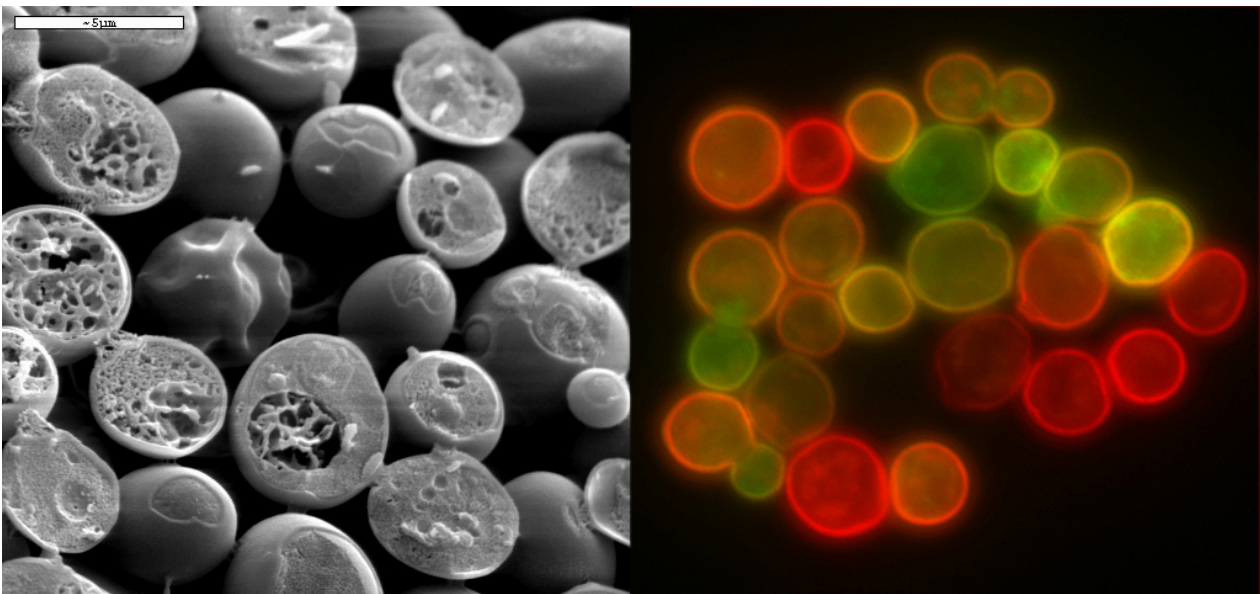


# ESTUDI DE LES FERMENTACIONS I ELS ORGANISMES IMPLICATS



# SUMARI

1.	Presentació del Treball.....	pàg. 3
2.	Introducció: Què són les Fermentacions?.....	pàg. 7
2.1.	Tipus de Fermentacions.....	pàg. 9
3.	Per què Serveixen les Fermentacions?.....	pàg. 11
3.1.	Les Fermentacions en la Indústria Alimentària.....	pàg. 11
3.2.	Les Fermentacions en l'Àmbit Científic i Tecnològic.....	pàg. 13
4.	La història de les Fermentacions.....	pàg. 15
4.1.	Descobriments de les Fermentacions.....	pàg. 16
4.2.	Controvèrsies del Descobriment.....	pàg. 17
4.3.	Primeres Referències Bibliogràfiques i Evolució.....	pàg. 18
4.4.	La Biotecnologia Moderna.....	pàg. 20
4.5.	Resum de l'Evolució de les Fermentacions.....	pàg. 23
5.	Material d'ús Microbiològic.....	pàg. 24
5.1.	Material d'ús general.....	pàg. 24
5.2.	Material Utilitzat en les Pràctiques de l'Institut.....	pàg. 31
6.	El Llevat i les Principals Rutes Metabòliques.....	pàg. 32
7.	Part Pràctica.....	pàg. 36
7.1.	Elaboració de Cervesa.....	pàg. 37
7.2.	Càlcul de la Resistència a l'Alcohol.....	pàg. 41
7.3.	Estudi de la Degradació de Sucres.....	pàg. 45
8.	Conclusions.....	pàg. 52
9.	Bibliografia.....	pàg. 53
10.	Agraïments.....	pàg. 55

# 1. Presentació del Treball

“Què és una fermentació i per què s'utilitza?” Segurament, la resposta de molts seria: “Un procés o una tècnica per fer begudes alcohòliques, pa i productes de pastisseria.” “Però què més? Per a què més s'utilitza?”, en l'inici d'aquest treball s'intentarà ajudar a respondre aquestes preguntes.

Aquest treball de recerca, tracta de les fermentacions en general, però tracta amb més èmfasi els temes relacionats amb les fermentacions alcohòliques, ja que en la part pràctica s'ha treballat sobretot amb llevat *Saccharomyces cerevisiae*.

El treball de recerca que he realitzat està relacionat amb la microbiologia, i va enfocat sobretot a estudiar les fermentacions, els organismes que utilitzen aquesta via per aconseguir energia, i també va enfocat a intentar que la gent que llegeixi el treball pugui aprendre i entendre'l, independentment del nivell que tingui. Aquest camp d'estudi és molt interessant, perquè les fermentacions són molt utilitzades en la societat actual, encara que la gran majoria de processos són desconeguts per a molta gent. A més, la tecnologia actual ha permès que la microbiologia avancés molt, innovant i millorant la precisió de les tècniques d'observació i anàlisi. La Bioinformàtica també ha ajudat molt en la millora de la microbiologia, ja que actualment es poden fer simulacions dels processos biològics i emmagatzemar gran quantitat de dades sobre els organismes a estudiar.

## **Per què un treball sobre fermentacions?**

A l'hora de elegir aquest tema pel treball de recerca, m'he basat en que tingués alguna relació en el món de la ciència, ja que sempre he estat interessat en aquest camp i, tinc pensat estudiar alguna carrera relacionada amb aquest món. A més, en la meva opinió, les fermentacions són un tema molt interessant i alhora molt poc valorat. Té moltes utilitats poc conegudes, fet per el qual, en la part teòrica, hi ha un apartat destinat a una breu divulgació de les utilitzacions d'aquest procés i dels organismes més comuns que s'utilitzen per a l'estudi fermentatiu.

Una altra raó per la qual vaig elegir aquest tema és el fet que, en el programa "Bojos per la Bioquímica", es tractava aquest tema tant teòricament com pràcticament.

Ja que les fermentacions són un tema molt ampli i engloba molts aspectes, no es pot parlar de un sol objectiu del treball, sinó de diversos, però tots igual d'importants.

## **Objectius**

Els objectius que m'he proposat assolir en aquest treball són:

- Aprofundir en el coneixement sobre les fermentacions, la microbiologia i la biotecnologia.
- Conèixer millor com es realitza una recerca científica, les parts de les quals consta, aprendre a treballar al laboratori i preparar-me per si al futur tingués ocasió de poder treballar en un laboratori.
- Entendre el fonament de la tècnica espectrofotomètrica i utilitzar-la per a poder veure la resistència que tenen diferents soques de llevats a l'etanol.
- Determinar com varia la degradació fermentativa de diferents substrats entre sí, i també la variació que hi ha en un sol tipus de substrat, variant la temperatura.

Per realitzar aquest treball de recerca he combinat dues metodologies diferents, una per cada part: una part teòrica, basada en la recerca bibliogràfica i la utilització de les dades obtingudes en els experiments, amb una part pràctica, basada en la experimentació, realitzada a la UB, a l'Institut Miquel Martí i Pol i a la cerveseria PilsTer.

## **Metodologia**

- Cercar informació sobre les fermentacions i les seves utilitats, els organismes més coneguts que s'utilitzen en l'estudi de les fermentacions, les diferents aplicacions de les fermentacions i les diferents vies metabòliques que permeten realitzar aquests processos.
- Elaborar la part teòrica del treball utilitzant la informació trobada.
- Realitzar la part pràctica per poder obtenir resultats.
- Comparar i avaluar els resultats obtinguts.
- Observar, comparant amb dades de Bases de Dades electròniques, si els resultats obtinguts són plausibles o, d'altra banda, els resultats no poden ser reals i s'ha de repetir l'experiment, fet que pot estar provocat tant per causes de contaminació dels cultius, com per utilitzar un mètode erroni o, errar a l'hora de apuntar els resultats.
- També he valorat la possibilitat de poder realitzar un mètode analític que normalment no s'utilitza a les classes de batxillerat, el mètode espectrofotomètric per poder observar el creixement de diversos cultius de llevat amb diferents concentracions d'etanol, calculant així la resistència a l'alcohol que tenen diferents soques de llevats.
- Extreure conclusions dels resultats obtinguts experimentalment.

## 2. QUÈ SÓN LES FERMENTACIONS?

Segons diversos diccionaris de llengua, es poden trobar definicions com les següents:



Institut  
d'Estudis  
Catalans

**DIEC2**  
Diccionari de la llengua catalana. Segona edició

### fermentació

- 1 f. [LC] [QU] [BI] Procés anaeròbic de producció energètica per al creixement, que consisteix en la degradació parcial d'un substrat orgànic produït pels enzims de llevats, bacteris o fongs.
- 2 [QU] [BI] **fermentació alcohòlica** Fermentació en què el producte més important és l'alcohol.
- 3 [QU] **fermentació amíllica** Fermentació que dona naixença a l'alcohol amíllic.

Institut d'Estudis Catalans  
C. del Carme, 47. 08001 Barcelona  
Telèfon +34 932 701 620 / Fax +34 932 701 180  
[oficines.lexicografiques@iec.cat](mailto:oficines.lexicografiques@iec.cat)



REAL ACADEMIA ESPAÑOLA

### fermentar.

(Del lat. *fermentāre*).

1. intr. Dicho de los hidratos de carbono: Degradarse por acción enzimática, dando lugar a productos sencillos, como el alcohol etílico.
2. intr. Dicho de los ánimos: Agitarse o alterarse.
3. tr. Hacer o producir la fermentación.

Real Academia Española © Todos los derechos reservados

Aquestes definicions estan bé, però només fins a cert punt, ja que els diccionaris convencionals no poden donar una definició exacta i àmplia de totes les paraules, sobretot paraules d'àmbit científic i, a més, contenen acepcions que no estan relacionades amb l'àmbit científic. Per aquest motiu, per aconseguir una definició millor, cal recórrer a altres fonts d'informació més especialitzades en l'àmbit científic o biològic, ja que cal una explicació bastant extensa per explicar-ho.

Una definició més científica seria:

Les fermentacions són processos catabòlics d'oxidació incompleta realitzats per enzims que permeten als éssers vius aconseguir energia en forma d'ATP en un medi anaeròbic, i té com a producte un compost orgànic. Això significa que els electrons del NADH produït durant la glucòlisis no seran acceptats per l'oxigen com en el cas de la respiració, sinó que serà un compost orgànic el que rebrà els electrons, reduint-se per poder tornar a oxidar el NADH a  $\text{NAD}^+$ . Normalment, el compost que es redueix és l'acetaldehid o el piruvat, derivats de sucres que ha consumit l'organisme.

Encara que no és gaire eficaç comparat amb la respiració aeròbica (es pot aconseguir unes 18-19 vegades menys d'ATP), és un procés que va permetre als primers éssers vius sobreviure en un planeta on no hi havia oxigen en l'atmosfera, i per tant, va ésser molt important. Aquest procés, a més, es caracteritza perquè no necessita la intervenció de mitocondris ni de la cadena respiratòria.

A més, gairebé tots els éssers vius, poden fermentar: fongs, bacteris, protoctists, animals... Sí, encara que no ho sembli, els humans també podem fermentar. Ja sigui perquè algunes cèl·lules del nostre cos no tenen mitocondris i es veuen obligades a fermentar per poder obtenir energia, com és el cas dels eritròcits (popularment coneguts com a glòbuls vermells), com també es pot donar el cas que el teixit muscular hagi de fermentar per poder aconseguir més energia, si l'oxigen que arriba a les cèl·lules musculars per a realitzar la respiració no és suficient en un determinat cas.



## 2.1 TIPUS DE FERMENTACIONS

Hi ha 9 vies fermentatives principals:

- **Fermentació Alcohòlica:** És un procés fermentatiu que es duu a terme en plena absència d'aire, originat per microorganismes capaços de degradar nutrients, generalment sucres, per arribar a aconseguir etanol, diòxid de carboni i ATP. Els microorganismes més coneguts que poden realitzar aquest procés són els llevats anomenats *Saccharomyces cerevisiae*.
- **Fermentació Homolàctica (Fermentació Làctica):** En aquest tipus de fermentació, els microorganismes oxiden els nutrients fins aconseguir àcid làctic i ATP. Aquest procés és molt comú, i el poden realitzar molts bacteris, fongs, protozous i, fins i tot, els nostres teixits, provocant-nos fatiga muscular i els eritròcits. Tot i així, els organismes més coneguts són els bacteris del gènere *Lactobacillus* i *Lactococcus*.
- **Fermentació Heterolàctica:** procés semblant a l'anterior però en que es produeixen simultàniament lactat, etanol i diòxid de carboni. El microorganisme model d'aquesta fermentació és el gènere de bacteris de l'àcid làctic *Leuconostoc*.
- **Fermentació de l'àcid propiònic:** fermentació pròpia del gènere *Propionibacterium*, en aquest tipus de fermentació a partir del sucres es sintetitza propionat, acetat i diòxid de carboni.
- **Fermentació àcid mixta:** consisteix en la conversió dels sucres en etanol, lactat, acetat, succinat i formiat amb coproducció d'hidrogen i diòxid de carboni. El gènere *Escherichia* porta a terme aquest tipus de fermentació.

- **Fermentació del 2,3-butanodiol:** aquest tipus de fermentació la realitza el gènere *Enterobacter* i consisteix en la transformació dels sucres en etanol, butanodiol, lactat i formiat amb coproducció d'hidrogen i diòxid de carboni.
- **Fermentació Butírica:** Consisteix en la conversió de glúcids, bàsicament lactosa, en àcid butíric i gas. Els bacteris de l'espècie *Clostridium butyricum* són un exemple de microorganismes que poden realitzar aquest tipus de fermentació.
- **Fermentació de l'acetona-butanol:** com l'anterior la porta a terme el gènere *Clostridium*, en aquest tipus de fermentacions els sucres es converteixen en butanol i acetona amb producció dels gasos hidrogen i diòxid de carboni.
- **Fermentació Acètica:** És un tipus de fermentació una mica especial, fins i tot es pot considerar que no és una fermentació, ja que és un procés aeròbic. Consisteix en utilitzar l'etanol per aconseguir energia, trencar-ne els enllaços i formant àcid acètic. Aquest procés el poden realitzar els bacteris del gènere *Acetobacter*.

## 3. PER QUÈ SERVEIXEN LES FERMENTACIONS?

Les fermentacions estan per tot arreu. Des de productes normals com la cervesa, el vi, els iogurts, la salsa de soja... fins a bioreactors i fabricació de medicaments, enzims . Les fermentacions tenen un abast molt ampli i actualment s'utilitzen en àmbits molt diversos, però la indústria alimentaria és l'àmbit més conegut.

### 3.1 LES FERMENTACIONS EN LA INDÚSTRIA ALIMENTARIA

Anteriorment, ja s'ha exposat la divisió de les fermentacions en quatre grups, però la indústria alimentaria es centra sobretot en els tres grups següents:

- **Fermentació làctica:** per produir productes làctics (crema agre, formatge, iogurt, kéfir...), verdures, productes càrnics i derivats del peix.
- **Fermentació alcohòlica:** per produir xocolata, pa, vi, cervesa i altres begudes alcohòliques. cigarrets
- **Fermentació acètica:** destaca la producció de vinagre.

Tot i que els exemples anteriors són aliments molt comuns com la xocolata, molta gent no sap que, per exemple, durant el procés per aconseguir-la cal que el cacau fermenti per desenvolupar els sabors i aromes, a més de impossibilitar-ne la germinació.

La salsa de soja, les olives, alguns tipus de té i de cafè també són productes molt coneguts que, durant el procés industrial per obtenir-los, s'han utilitzat fermentacions.

Un cop explicats els aliments que fermenten, també cal citar alguns usos de diferents microorganismes que ens ajuden molt a l'hora de produir aliments.

Alguns d'aquests organismes i els seus respectius processos són:

- Els llevats del gènere *Saccharomyces*, que són utilitzats per “fer pujar” les masses en la producció de pa i també per fermentar el most de malta en cervesa, els suc de poma en sidra i els suc del raïm en vi.
- Els *estreptococs* i els *Lactobacillus* s'utilitzen per convertir la llet en iogurt o formatge.
- Els *acetobàcters* i alguns bacteris del gènere *Erwinia* s'utilitzen per la producció de té i cafè fermentats.
- Els *Lactobacillus* poden convertir herbes verdes en farratge pels animals.
- Producció d'àcids orgànics, com l'àcid cítric, de gran importància com conservant, o l'àcid làctic, produïts per *Aspergillus niger* i els lactobacteris com els *Lactobacillus* respectivament.

I encara que aquests són els més importants, n'hi ha moltíssims més, fet que afavoreix a les indústries alimentaries, perquè encara no s'han trobat tots els processos possibles, i per tant, encara els queda negoci per molts anys.

## 3.2 LES FERMENTACIONS EN L'ÀMBIT CIENTÍFIC I TECNOLÒGIC

Actualment, aquest és un tema que s'està desenvolupant molt ràpidament, sobretot perquè pot ajudar molt a la societat actual.

Amb els coneixements actuals d'enginyeria genètica, es poden modificar organismes com fongs o bacteris per aconseguir una àmplia varietat de productes molt apreciats com per exemple:

- L'obtenció de dissolvents orgànics com l'etanol o l'acetona, de gran importància industrial, que són produïts per *Saccharomyces cerevisiae* i també pels bacteris *Clostridium acetobutylicum*.
- Producció de polisacàrids com el dextrà, produït per *Leucocostoc mesenteroides*.
- Aminoàcids com l'àcid glutàmic (*Corynebacterium glutamicum*) o la lisina (*Brevibacterium flavum*).
- Nucleòsids i nucleòtids com el 5'IMP o el 5'GMP, per el *Bacillus subtilis* i *Brevibacterium ammoniagenes*.
- Vitamines com la vitamina B<sub>12</sub> (*Propionibacterium*) o, la vitamina C per les espècies d'acetobactèris.
- Antibiòtics com els  $\beta$ -lactàmics (*Penicillium chrysogenum*) o la tetraciclina (*Streptomyces spp.*)
- Enzims per la indústria química y per detergents com la lipasa produïda pels *Aspergillus spp.*
- Hormones peptídiques i asteroïdees com la 11-hidroxi-progesterona (*Rhizopus nigricans*) o la insulina humana, produïda per *Escherichia coli* modificades genèticament.

A més de tots aquests processos, les fermentacions també s'estan estudiant perquè alguns organismes poden produir alcaloides, com és el cas dels *Claviceps spp.*, que poden servir en un futur bastant proper de medicament.

Però no només això, actualment també hi ha estudis que plategen modificar organismes per poder netejar el planeta o, per poder obtenir combustibles o energia utilitzant microorganismes fermentatius. Per això és molt important que es continuïn estudiant les fermentacions i els microorganismes, no sols per optimitzar els processos que coneixem actualment, sinó que també perquè aquest àmbit pot generar una gran quantitat de noves tecnologies i nous processos, encara desconeguts.

Recentment, s'han començat estudis innovadors de biologia sintètica com el que es duu a terme en el centre per la Innovació de la Diabetis Infantil-San Joan de Déu (CIDI) i la Universitat Pompeu Fabra (UPF), en el qual es treballa per aconseguir cèl·lules de llevat ( *Saccharomyces cerevisiae* ) modificades genèticament, sensor de la concentració alta o baixa de la glucosa de l'organisme, i capaces de secretar insulina i glucagó depenent de la situació.

## 4. HISTÒRIA DE LES FERMENTACIONS

Encara que el descobriment de les fermentacions comença amb l'inici de la humanitat, l'impacte social i econòmic que va adquirir aquest tema amb la revolució biotecnològica del segle XX, a vegades, fa oblidar a la gent que en realitat, durant milers i milers d'anys s'ha elaborat cervesa, vi i altres begudes alcohòliques, s'ha fermentat pa, s'ha convertit la llet en iogurt i en formatge, s'han conservat aliments en adob. Tots aquests processos, encara que no se sabia, estaven fets per microorganismes. Fongs, llevats, bacteris..., necessaris per la humanitat durant milers i milers d'anys, invisibles però alhora presents a tot arreu, sorprenentment versàtils i impressionantment abundants en la Terra, han estat treballant anònimament per la humanitat. Fins i tot quan era impensable que una cosa tant petita pogués existir, aquests microorganismes estaven elaborant productes de gran importància per a tots nosaltres, sols a canvi d'aliment per a ells.

Resumint:

Els microorganismes van ésser, seran i són essencials per la humanitat.

## 4.1 DESCOBRIMENT DE LES FERMENTACIONS

Les vies metabòliques fermentatives van sorgir fa milions d'anys, ja que van ésser les primeres vies metabòliques per aconseguir energia que van existir. Quan encara no hi havia oxigen lliure a l'atmosfera i els rajos de sol no arribaven a la superfície terrestre, l'única forma de poder aconseguir energia era mitjançant la via fermentativa. En canvi, fa relativament poc temps que els humans vam descobrir aquests processos, i encara són més recents les teories que expliquen qui realitza els processos i com es poden transformar sucres en productes diversos.

El descobriment de les fermentacions es remunta a la prehistòria, com a mínim 8000 anys enrere, encara que hi ha investigadors que pensen que el descobriment casual de productes emmagatzemats fermentats es pot remuntar fins i tot als antecessors de l'*Homo sapiens*. El més probable és que el primer rastre d'aliments fermentats descoberts fossin fruits recol·lectats i emmagatzemats en coves, on la humitat i la temperatura eren idònies per al creixement de microorganismes. En alguns d'aquests fruits rics en glúcids, ocasionalment, hi podrien haver crescut microorganismes com els llevats, capaços de fermentar i, per tant, s'hauria pogut obtenir un líquid semblant a la sidra o al most, el qual els podria haver aportat sensació de calor i energia durant èpoques d'hivern.

Posteriorment, amb el descobriment dels recipients rudimentaris, que eren pensats i fabricats amb el fi d'aconseguir fermentar fruits, juntament amb el procés de selecció de les fruites que es creien més adequades per afavorir els processos fermentatius, es van anar millorant les tècniques empíriques per aconseguir els productes fermentats. En aquest punt, ja seria més raonable anomenar biotecnologia a aquestes activitats, ja que raonaven sobre la manera d'aconseguir els productes i utilitzaven també diferents tècniques, com la construcció de recipients, per fermentar fruits.



## 4.2 CONTROVÈRSIES DEL DISCOBRIMENT

Aquest important descobriment, segons molts historiadors i moltes fonts diverses, va suposar l'inici de la biotecnologia, encara que hi ha un debat en aquest suposat inici. Encara que està molt implementada en la societat l'idea que qualsevol procés biològic del qual l'ésser humà n'extreu benefici és biotecnologia, es pot argumentar que els processos empírics fermentatius que es realitzaven en les activitats artesanals de les cultures antigues, ja que desconeixien tant l'existència dels microorganismes i els enzims responsables, com del procés que es duia a terme per obtenir el producte, i per tant; com que en el sentit estricte, el mot tecnologia implica la coneixença de les bases científiques del procés que es duu a terme, no es podria anomenar tecnologia, sinó que era merament una activitat artesanal.

Una altra forma de pensar es troba en J. D. Bu'Lock, que considera que el control dels processos biològics és l'essència de la biotecnologia; per tant, d'acord amb la seva definició, les fermentacions tradicionals es poden considerar biotecnologia només a partir del moment en el qual es comencen a seleccionar els microorganismes.

També es pot argumentar filològicament que, ja que la paraula biotecnologia conté els mots grecs λόγος (lògos) i τέχνη (téchne), les activitats que es duien a terme sense tenir coneixements sobre els processos que feien que els sucres es transformessin en alcohol, no es poden anomenar biotecnologia.

Però encara que no es pugui anomenar biotecnologia als processos antics, si que seria bastant correcte anomenar "antecessors de la biotecnologia o predecessors de la biotecnologia" a aquests esdeveniments anteriorment esmentats.

## 4.3 PRIMERES REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES I EVOLUCIÓ

Encara que es creu que fa més de 100 segles que es coneixen les fermentacions, no és fins l'època de les civilitzacions antigues que es pot assegurar que els humans tenien en la dieta productes fermentats.

Les primeres referències bibliogràfiques que s'han trobat podrien ser els sànscrius anomenats "Vedes", de la Índia, on es descriu un producte similar al iogurt o bé els gravats d'una tomba de la cinquena dinastia egípcia, on es descriu la fermentació alcohòlica i la panificació de forma empírica ( aproximadament 2400 a.C. ). Aquestes referències tant antigues, trobades en llocs tant importants, mostren que les cultures antigues consideraven que era un tema important i que s'havia de deixar constància de com s'havia de fer per aconseguir els apreciats productes fermentats.

Més endavant, es desenvoluparien begudes basades en la fermentació de llavors i fruits cuits. Aquests processos, bastant sofisticats però encara empírics, van servir per confeccionar la cervesa, el sake i moltes altres begudes alcohòliques. Aquestes begudes es diferenciaven en el cereal de partida utilitzat, i és molt interessant el fet que, un determinat tipus de beguda era pròpia i característica d'una determinada cultura, i això significa que no va ésser una sola cultura la que va descobrir les fermentacions, sinó que cada cultura ho va descobrir per separat i, va utilitzar els productes que tenien més a mà per aconseguir les seves begudes alcohòliques.

A partir d'aquest moment i fins al segle XX, es va continuar millorant la tècnica, encara empírica, per aconseguir elaborar begudes alcohòliques i altres productes fermentats de forma més eficient i, sense saber-ho, es va començar també a seleccionar els microorganismes. Uns exemples molt clars són; el formatge Roquefort, que des del descobriment fins a l'actualitat, sols es pot produir si es deixa madurar a les coves de Cambalou, seleccionant així el *Penicillium roqueforti*; les fleques també seleccionaven microorganismes, ja que quan una massa quedava perfecte perquè contenia una bona soca de *Saccharomyces cerevisiae*, el flequer guardava una mica de massa, anomenada massa mare, pensant que si l'endemà hi afegia més massa, aquesta nova massa agafaria la textura de la massa mare i, per tant, encara que el raonament era erroni, funcionava perquè en realitat era la soca de llevat de la massa mare que es barrejava amb la nova massa i, s'havia tornat a utilitzar la soca que tant bon pa havia produït el dia anterior. A més d'aquests dos exemples, al llarg de la història hi ha hagut moltes altres formes de selecció de microorganismes, però la gran revolució, tant per el procés de selecció com per la biotecnologia va produir-se al segle XX.

## 4.4 LA BIOTECNOLOGIA MODERNA

Al segle XX, amb els avanços tecnològics que hi va haver i la consolidació de disciplines com la microbiologia, la bioquímica i la enginyeria química, es va propiciar un gran desenvolupament en els camps de la bioquímica, la biotecnologia i la biologia alimentària. Els estudis de molts científics de l'època, Louis Pasteur entre ells, van tenir un impacte immediat en la indústria alimentària: es van aconseguir entendre els mecanismes de fermentació que intervenen en la producció de cervesa, vi, vinagre, etc. També es van implementar tècniques d'aïllament i conservació de cultius purs, tècniques molt utilitzades a partir de llavors en la indústria alimentària per aconseguir resultats semblants en tots els productes. Sobretot la indústria làctica es va veure molt revolucionada amb els estudis de microbiòlegs, entre ells Louis Pasteur i Илья Ильич Мечников (Iliá I. Méchnikov), tant per els descobriments de tècniques de conservació de productes làctics, com la pasteurització, com per les tècniques d'aïllament i l'inici de la taxonomia de bacteris, que va servir per aconseguir fermentacions de millor qualitat i moltes menys contaminacions gràcies als tractaments que es donava a la llet per eliminar els bacteris parasitaris.

El descobriment dels enzims i el seu paper de catalitzadors biològics va contribuir molt, sobretot en la indústria. Un dels primers processos industrials i probablement la primera patent establida sobre un procés amb enzims exògens, va ésser l'ús de la papaïna com a procés per clarificar la cervesa. Gràcies a aquest descobriment també es van poder tornar més eficients i controlables els processos empírics antics com la coagulació de la llet per obtenir formatge o la sacarificació del midó en gra per elaborar begudes alcohòliques.

Es pot resumir una mica els avenços de la tecnologia de les fermentacions del segle XX tenint en compte els següents descobriments i situacions:

- La descoberta per part de Louis Pasteur del fet que la fermentació era un procés biològic, al revés del que pensaven alguns contemporanis com el cèlebre químic Justus von Liebig, que insistien en la hipòtesi que formulava que la fermentació era un procés químic. Quan Pasteur va descobrir que la fermentació era un procés biològic, i a més es duia a terme sense aire (descrita per ell mateix com: *La vie sans l'air*), va ajudar a comprendre com es va poder originar la vida en una atmosfera sense oxigen.

Una gran frase de Louis Pasteur que defineix bastant el que va trobar és: <<El vi és un mar d'organismes. Gràcies a alguns viu, gràcies a altres es descompon.>>

- El brollar d'una nova disciplina durant els anys 40, la enginyeria bioquímica, a partir de la necessitat de la població de antibiòtics a gran escala, que gràcies a l'aplicació dels principis de la enginyeria química als processos fermentatius, es va aconseguir sintetitzar a gran escala antibiòtics molt diversos. A més, aquesta evolució cap a la síntesi de nous elements utilitzant microorganismes fermentatius, va fer més eficient la producció de productes fermentats, però també va permetre sintetitzar una gran quantitat de nous productes; entre ells, els aminoàcids, els biopolímers i els enzims, més disponibles i barats que els enzims d'origen vegetal o animal.

- El desenvolupament de la placa de Petri i els medis de cultiu, tant sòlids com líquids, van propiciar que una gran quantitat de científics poguessin experimentar amb microorganismes. Al tenir medis en els quals es podien recrear diverses situacions, tant atmosfèriques com de escassetat o abundància d'aliment, va permetre que hi hagués un gran interès en voler utilitzar OMG (Organismes Modificats Genèticament) que puguin fermentar productes nocius, ja que es podia provar en un medi controlat abans de provar-ho en la natura.

## 4.5 RESUM DE L'EVOLUCIÓ AL LLARG DEL TEMPS

Per fer més visual aquest apartat es pot utilitzar una taula on es mostra l'evolució al llarg del temps de dos processos fermentatius bastant coneguts.

Etapa	Elaboració de Formatge	Elaboració de Cervesa
Període Pre-Pasteur	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ús empíric dels bacteris làctics.</li> <li>• Ús empíric de la quimosina.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ús empíric de llevats.</li> <li>• Procés empíric de maltatge.</li> </ul>
Era de Pasteur	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aïllament i ús de bacteris làctics.</li> <li>• Extracció, purificació i caracterització de la quimosina.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ús de cultius purs de llevat.</li> <li>• Maltatge tractat com a procés enzimàtic.</li> <li>• Ús de la papaïna per clarificar cervesa en fred.</li> </ul>
Era dels Antibiòtics	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Propagació massiva de bacteris làctics.</li> <li>• Selecció de cultius làctics millorats</li> <li>• Substitució de la quimosina per proteases microbianes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Millora en el control de la fermentació.</li> <li>• Fermentació continua.</li> <li>• Producció i ús d'amilases microbianes.</li> <li>• Ús de enzims per produir cerveses lleugeres.</li> </ul>
Nova Biotecnologia	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tecnologia de l'ADN recombinant per la producció de quimosina i millora dels bacteris làctics.</li> <li>• Utilització òptima dels enzims i microorganismes per madurar més ràpid i generar més sabors.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enginyeria genètica per obtenir llevats amilolítics.</li> <li>• Enginyeria genètica i cultiu de teixits per millorar els productes primaris.</li> <li>• Processos amb microorganismes i enzims immobilitzats.</li> </ul>

## 5. MATERIAL D'ÚS MICROBIOLÒGIC

### 5.1 Material d'ús general utilitzat en un laboratori de microbiologia:

- Instruments de inoculació:
  - Nanses de sembra:
- Nansa bacteriològica, nansa de Kolle.

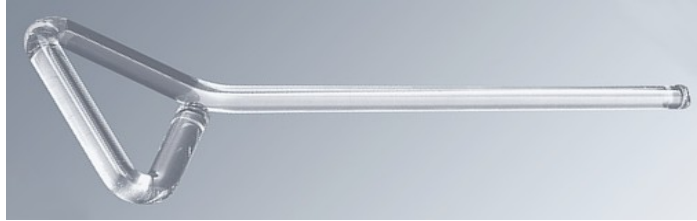


És una nansa formada per un mànec de metall (platí, acer, alumini...) i un filament de nicrom, tungstè o platí. S'utilitza essencialment per a obtenir petites mostres de cultius, esterilitzant amb foc la nansa prèviament per evitar contaminar les mostres obtingudes. S'utilitza per inocular organismes en petites colònies, així com també per realitzar "Frotis". És la més utilitzada, ja que permet fer un càlcul estimat de la quantitat de cultiu que s'inocula, determinat per l'aro del final del filament, que està calibrat per aquest fi.

La nansa de picadura és una modificació de la nansa de Kolle, on el filament no té un acabament en forma d'anella, sinó que és un filament recte.



- Nansa de Drigalsky.



És una vareta de vidre, amb la part final doblada en forma de L o de triangle equilàter. S'utilitza sobretot per inocular una gran quantitat d'organismes des de un medi líquid a una placa de Petri, sense tocar les parets de la placa. La forma característica d'aquesta nansa permet que durant la inoculació del cultiu es redueixi al màxim la possibilitat de que el medi sòlid de la placa es pugui trencar.

- Altre material utilitzat per inocular:

- Hisop o escovilló:



És una vareta de fusta, plàstic o alumini, amb una porció de cotó o raió en un dels seus extrems. És molt utilitzada per efectuar la primera part de la sembra, la descàrrega, i sobretot per transferir organismes de cultius líquids a plaques, o per a la inoculació de grans quantitats d'organismes a les plaques a partir de colònies aïllades.

- **Medis i agars de cultiu:**
  - Plaques de cultiu sòlid, plaques de Petri, *Petri dishes*.



Els medis de cultiu més utilitzats per a llevats contenen una gran quantitat de sucres, no solen tenir una concentració de sucres menor a 20 g/l i serveixen per a crear un medi apte per a cultivar microorganismes dins dels laboratoris.

Els següents medis són els més usuals per a cultivar llevats:

**Agar Dextrosa Sabouraud:** Medi de cultiu utilitzat sobretot per cultivar fongs filamentosos i llevats.

**Agar de Malta Mitjà i Agar Extracte de Malta Mitjà:** Utilitzat sobretot per detectar, aïllar i enumerar llevats i floridures.

**Agar Patata-Dextrosa:** Utilitzat sobretot per cultivar y enumerar llevats i floridures.

**Agar de Czapek-Dox (Modificat):** Utilitzat sobretot per cultivar fongs i bacteris capaços d'utilitzar nitrat de sodi com a única font de nitrogen.

**Agar Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD):** Utilitzat sobretot per cultivar fongs i bacteris, però és utilitzat sobretot per cultivar llevat. Conté extracte de llevat, peptona i dextrosa.

- Brous de cultiu (medis líquids), *culture broths*.



En molts casos, els brous de cultiu són medis de cultiu però sense l'agar-agar, aconseguint així un medi que permet que els microorganismes puguin sobreviure, però alhora que hi hagi una mobilitat total per la dissolució.

- Agitador vibrador, tube agitator.



És un instrument utilitzat per agitar tubs, desfer el sediment que es pot haver acumulat al fons i tornar a dissoldre del tot la dissolució.

- Espectrofotòmetre, spectrophotometer.



És un instrument utilitzat per l'anàlisi química. Mesura la longitud d'ona, projectant un feix de llum monocromàtica, que prové de làmpades de tungstè, xenó o deuteri, i calculant la quantitat de llum absorbida per la substància a analitzar. Es pot utilitzar per quantificar substàncies i microorganismes. A més, també es pot utilitzar per determinar la naturalesa d'una substància o, determinar la concentració d'una substància determinada en una dissolució.

- Altres materials d'ús general:
  - Autoclau, *autoclave*.
  - Cabines de seguretat, *Safety cabinets*.
  - Matràs o flascó Erlenmeyer, *conical flask*, *Erlenmeyer flask*.
  - Embut, *funnel*.
  - Portaobjectes i cobreobjectes, microscope slide and cover slip.
  - Cambres de recompte, Cell counting Chambers.
  - Microscopi, microscope.

## 5.2 Material Utilitzat en les Pràctiques de l'Institut:

- Sacarímetre d'Eihörn.



És un recipient de vidre de forma peculiar que permet que els gasos que es formen dins s'emmagatzemin en el tub. Serveix per mesurar el volum de  $\text{CO}_2$  si s'introdueix dins un medi amb organismes que puguin fermentar, ja que el gas queda emmagatzemat en el tub, que està calibrat per calcular el volum.

## 6. ELS LLEVATS I LES SEVES PRINCIPALS RUTES METABÒLIQUES FERMENTATIVES

Els llevats són organismes anaeròbics facultatius, ja que poden sobreviure en un medi sense oxigen, encara que també poden sobreviure en un medi oxigenat.

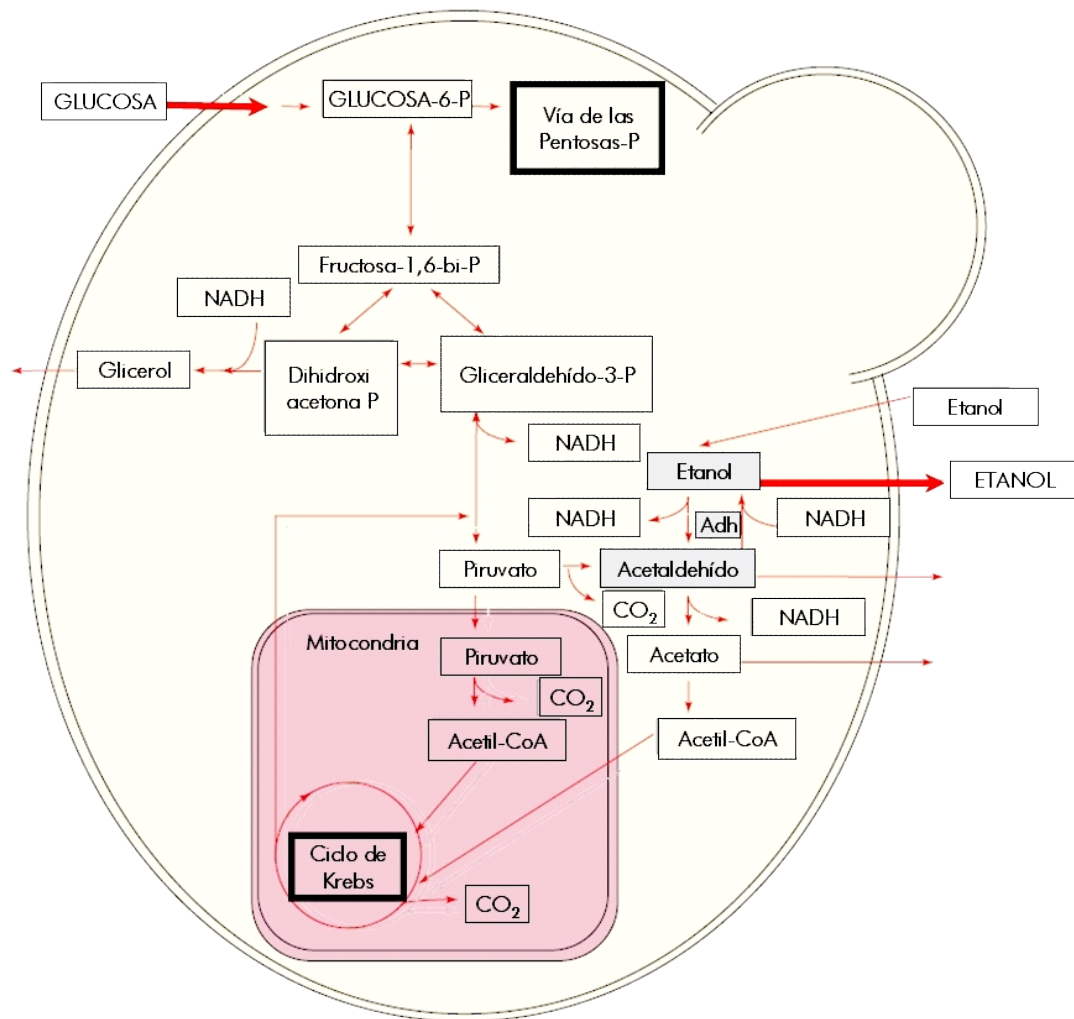
Quan hi ha oxigen, l'utilitzen per realitzar la respiració aeròbica, oxidant completament la glucosa per obtenir ATP.

En condicions d'anaerobiosis, les soques de llevat *Saccharomyces cerevisiae* y altres espècies de llevats, poden transformar la glucosa en àcid pirúvic, a través de les reaccions de la glucòlisi. Encara que aquest procés és comú en la majoria d'éssers vius, els llevats poden continuar la degradació de l'àcid pirúvic fins a aconseguir etanol seguint procés anomenat Glucòlisi, explicat en la següent pàgina.

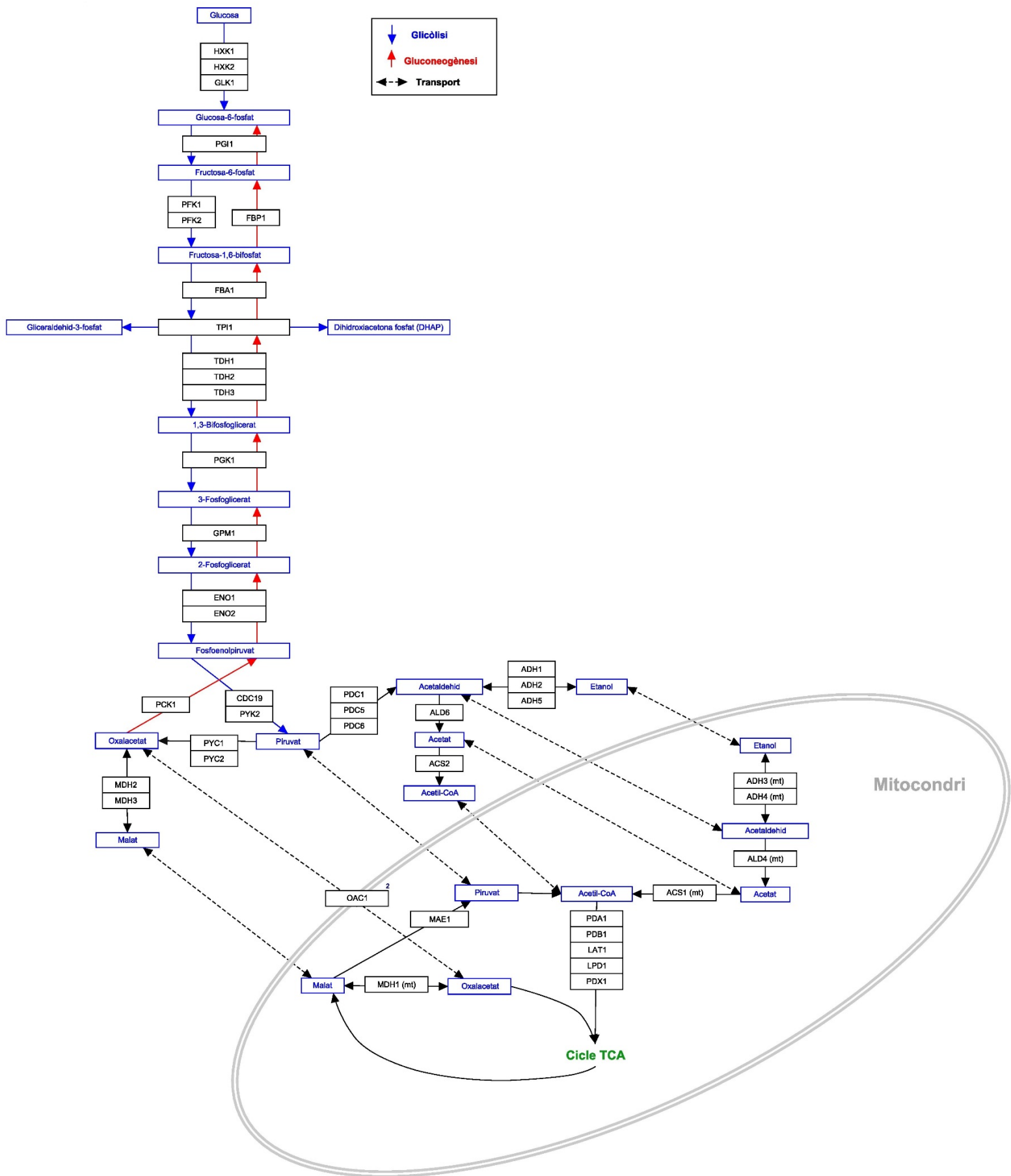
Aquest procés aporta un gran avantatge adaptatiu per als llevats, ja que els permet sobreviure en anaerobiosis, encara que sols utilitzen el mètode fermentatiu com a via metabòlica secundària, quan no hi ha suficient oxigen al medi, ja que el rendiment de la fermentació alcohòlica és molt menor al rendiment de la degradació oxidativa total de la glucosa.

En els diagrames de la pàgines següents, es mostra el procés de la glucòlisi i la gluconeogènesi. El primer més visual i el segon, en forma de via metabòlica.





En aquest diagrama gràfic es mostra com, a partir de la glucosa que entra dins la cèl·lula es pot aconseguir expulsar a l'exterior etanol, passant per diferents canvis durant el procés de la glucòlisi.

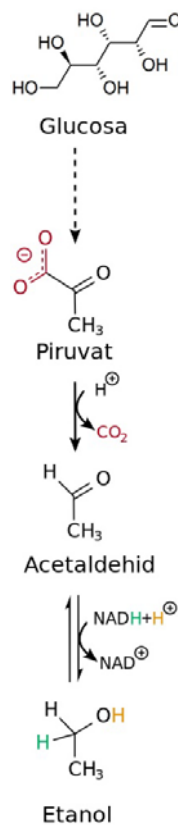


En aquest diagrama s'exposa sols la part més important de la Glucòlisi, que permet explicar com es va transformant la glucosa fins poder obtenir etanol, encara que anteriorment a aquest procés, hi ha diverses vies metabòliques alienes que permeten als llevats transformar diversos sucres per aconseguir glucosa.

Aquest procés comença amb l'obtenció de glucosa, ja sigui a partir de glucosa extracel·lular, com mitjançant altres vies metabòliques per obtenir glucosa a partir d'altres sucres. Continua amb la fosforilació de la glucosa intracel·lular, per evitar que, per diferència de concentracions, la glucosa tendeixi a sortir cap a l'exterior de la cèl·lula. Llavors, la glucosa anteriorment fosforilada s'isomeritza a fructosa, la qual es torna a fosforilar, obtenint així fructosa 1,6-bifosfat.

A partir de la fructosa 1,6-bifosfat, es va seguint la via metabòlica de la glucòlisi fins a arribar a obtenir acetaldehid. Un cop transformada de glucosa en acetaldehid, es pot transformar finalment en etanol, i així poder aconseguir energia en forma d'ATP en un medi anaeròbic, on la respiració cel·lular aeròbica no es pot efectuar.

Resumit visualment seria:



## 7. PART PRÀCTICA

La part pràctica d'aquest treball consta de diversos experiments explicats posteriorment, realitzats a l'INS Miquel Martí i Pol, a la UB i a la cerveseria PilsTer.

## 7.1 ELABORACIÓ DE CERVESA

Aprofitant que la cervesa és un dels processos biotecnològics més antics i populars, una part de la part pràctica va consistir en anar a PilsTer per elaborar cervesa lager artesanalment. Aquesta és la primera pràctica.

### ➤ Material Utilitzat:

- Barreja de maltes trossejades
  - Llevat *Saccharomyces cerevisiae* (Saflager s-23)
  - Barreja de llúpols ( per l'amargor, el gust i l'aroma )
  - Aigua
- 
- Tanc de cocció
  - Tanc de fermentació
  - Tanc de maceració
  - Escalfador d'aigua / Caldera
  - Recipient per el cultiu de llevats
  - Incubadora amb oxigenador
  - Filtre
  - CO<sub>2</sub>
  - Refredador

## ➤ Procés:

L'elaboració de cervesa comença introduint la malta ja trossejada en un tanc de cocció. Un cop la malta està dins, s'introdueix aigua a 65°C, temperatura ideal per propiciar que la majoria de sucres es liquïn i es dissolguin amb l'aigua calenta, formant així el most. Aquest procés dura aproximadament 2 hores macerant, fins que no s'acaben d'extreure tots els sucres de la malta.

Paral·lelament a aquest procés, es pot omplir el recipient de la imatge del costat amb una dissolució de glucosa en aigua d'una densitat de 1.045 g/ml. A aquesta dissolució se li inocula el llevat i es deixa en la incubadora a 36°C perquè es vagi reproduint aproximadament unes 6 o 8 hores (3 o 4 cicles) . En aquest procés, es pot canviar la dissolució de glucosa en aigua per el most un cop ha bullit, però aquesta última opció fa que es perdi molt de temps.



Un cop acabada de maceració, el most s'ha de fer bullir per esterilitzar-lo. Es deixa que el most vagi escalfant-se i, quan comenci a bullir vigorosament, s'ha de introduir la primera barreja de llúpul, corresponent a l'amargor que es vulgui per a la cervesa en qüestió, i s'ha de tancar el tanc de cocció. Després d'uns 75 minuts d'ebullició, s'ha d'afegir la segona barreja de llúpul, corresponent al sabor. Finalment, 15 minuts després, als 90 minuts de cocció s'apaga l'escalfador i s'afegeix la última barreja de llúpul, corresponent a l'aroma. El llúpul s'ha de introduir d'aquesta manera i amb aquest ordre perquè si es deixa molt de temps bullint, el sabor i l'aroma que proporciona el llúpul, s'acabaria evaporant.

Un cop ha parat de bullir, la dissolució té una densitat aproximada de 1.044-1045 g/ml i, s'ha de refredar fins uns 12-15°C utilitzant un refredador d'aigua, que consta de una mànega interna i una externa. Per la interna passa el most i per l'externa passa l'aigua que serveix per refredar el most. Un cop refredat, s'ha de traslladar al tanc de fermentació.

Un cop el most refredat està al tanc de fermentació, s'ha d'afegir el llevat prèviament cultivat. Un cop comença la fermentació, s'ha de deixar 7 dies dins al tanc fins aconseguir una densitat de 1.007 g/ml. Un cop s'ha acabat de fermentar, es posa a macerar en un altre tanc durant 3 setmanes i, un cop passades les 3 setmanes, es filtra, es pasteuritza, s'embarrella i s'hi introdueix el CO<sub>2</sub> que es perd quan es filtra.

Densitat als 3 dies de fermentació:

Uns 1030 g/ml



Densitat als 6 dies de fermentació:

Uns 1011 g/ml







## 7.2 CÀLCUL DE LA RESISTÈNCIA A L'ALCOHOL DE DIFERENTS SOQUES DE LLEVAT

Durant els dies que vaig anar a la UB, vaig tenir la oportunitat de poder observar la resistència a l'alcohol que tenien diferents soques de llevats.

### ➤ Material Utilitzat:

- Llevat *Saccharomyces cerevisiae* (Saflager s-23)
  - Llevat *Saccharomyces cerevisiae* (Safale s-04)
  - Llevat *Saccharomyces cerevisiae* (Sabrew WB-06)
  - Glucosa, 20 g/l
  - Peptona 20 g/l
  - Extracte de llevat 10 g/l
  - Aigua Destil·lada (1 litre)
- 
- Espectrofotòmetre
  - Pipeta automàtica
  - Erlenmeyer

➤ **Hipòtesi:** Els llevats que facin una cervesa menys amarga, aguantaran més l'alcohol, però canviaran menys el pH.

➤ **Procediment:**

Cultivar en tres Erlenmeyers els diferents llevats en un medi amb ampicil·lina (20 ml/L d'un estoc amb concentració de 100 mg/mL) per aconseguir un cultiu pur.

Preparar un brou YPD 2x, amb 20 grams de glucosa, 20 grams de peptona i 10 grams de extracte de llevat, dissolt en aigua destil·lada.

Preparar 27 tubs (9 per cada soca) amb un volum total de 10 mL , amb 5 mL de brou 2x, etanol a diferents concentracions, aigua destil·lada fins a arribar als 10 mL. Aquests tubs van ser d'una concentració d'etanol de : 0%, 5%, 7%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, i 14%.

Es va incubar durant 72 hores i es va mesurar amb l'ajuda d'un espectrofotòmetre l'absorbància del cultiu.

També es va mesurar el pH de la dissolució de 14% d'etanol i de 0% d'etanol.

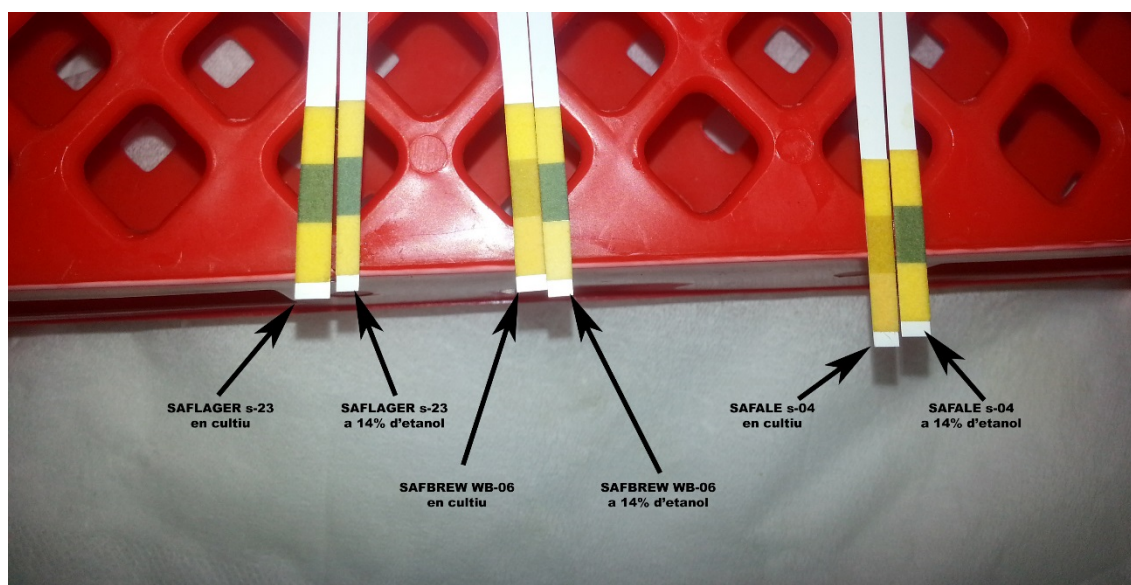
Les dades obtingudes des de l'espectrofotòmetre són les següents:

Quantitat d'etanol	Saflager S-23	Safbrew WB-06	Safale S-04
0%	0,7046	0,7662	0,3018
5%	0,5182	0,4775	0,1525
7%	0,5195	0,5259	0,0844
9%	0,4604	0,2223	0,1893
10%	0,3994	0,2262	0,0192
11%	0,4312	0,2932	0,0496
12%	0,4253	0,2406	0,0464
13%	0,3732	0,298	0,0315
14%	0,3553	0,2611	0,0297
BLANC	0,4786	0,2195	0,1893

Si a les dades anteriors se li resta el blanc (cultiu sense alcohol) s'obtenen les següents dades:

Quantitat d'etanol	Saflager S-23	Safbrew WB-06	Safale S-04
0%	0,23	0,55	0,11
5%	0,04	0,26	-0,04
7%	0,04	0,31	-0,10
9%	-0,02	0,00	0,00
10%	-0,08	0,01	-0,17
11%	-0,05	0,07	-0,14
12%	-0,05	0,02	-0,14
13%	-0,11	0,08	-0,16
14%	-0,12	0,04	-0,16
BLANC	0,4786	0,2195	0,1893

El canvi de pH va ésser el següent:



- **Conclusions:** A partir de les dades obtingudes de la resistència a l'alcohol es pot veure que, El llevat Saflager s-23 i Safbrew WB-06 tenen un creixement positiu fins a una concentració d'etanol del 9%. En canvi, el llevat Safale s-04 sols presenta un augment de població per sota del 5% d'etanol.

En la imatge, es pot veure com el llevat Saflager s-23 gairebé no canvia el pH del medi, mentre que el Safale s-04 presenta un canvi del medi cap a àcid bastant brusc i, el llevat Safbrew WB-06 també acidifica la solució, encara que en menor mesura.

La hipòtesi era encertada, ja que els llevats que aguanten més l'alcohol són els que produeixen cerveses menys amargues i, per tant, no canvien el pH tant bruscament.

## 7.3 ESTUDI DE LA DEGRADACIÓ DE SUCRES DEL LLEVAT

➤ Hipòtesi: La glucosa, al ser un monosacàrid, serà el substrat que més ràpid es degradarà, seguit de la maltosa i la sacarosa, que són disacàrids. El glicerol gairebé no es degradarà.

➤ Material utilitzat:

- Sacarosa
- Maltosa
- Glucosa
- Glicerina
- Llevat Saflager S-23
- Aigua Desionitzada
- Urea
  
- Sacarímetres
- Bàscula
- Espàtula

➤ Procediment:

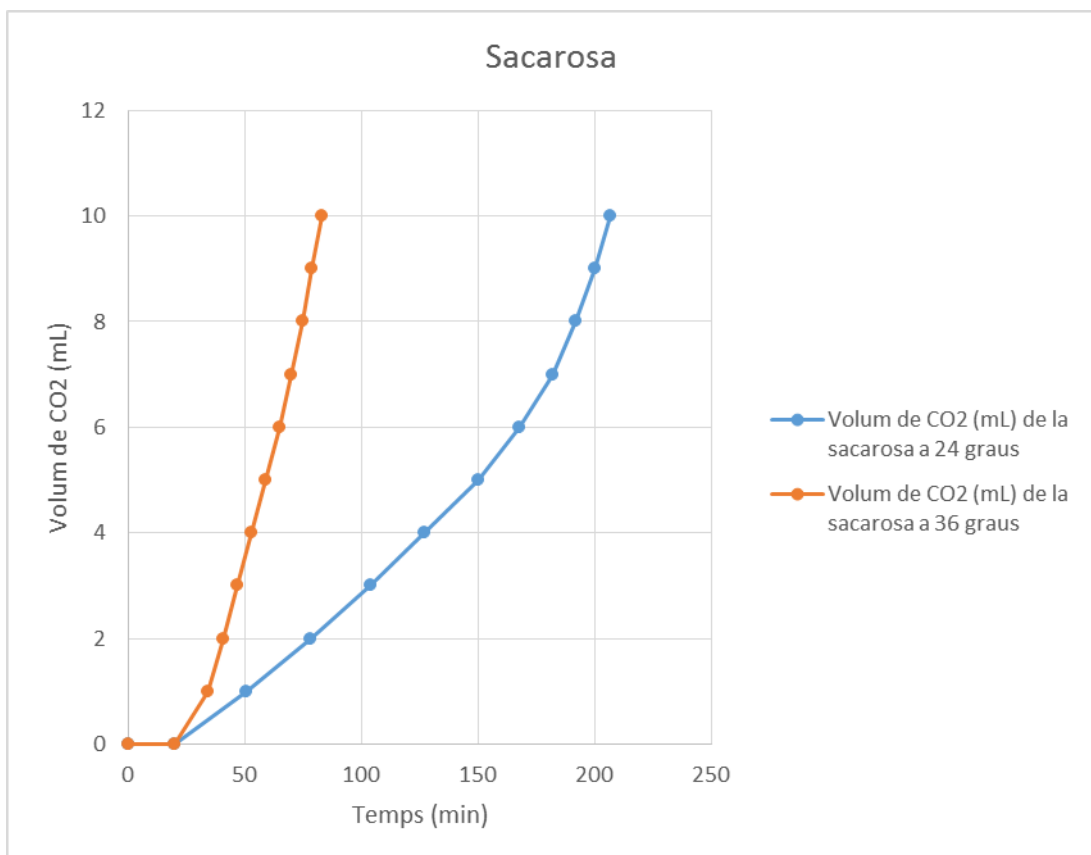
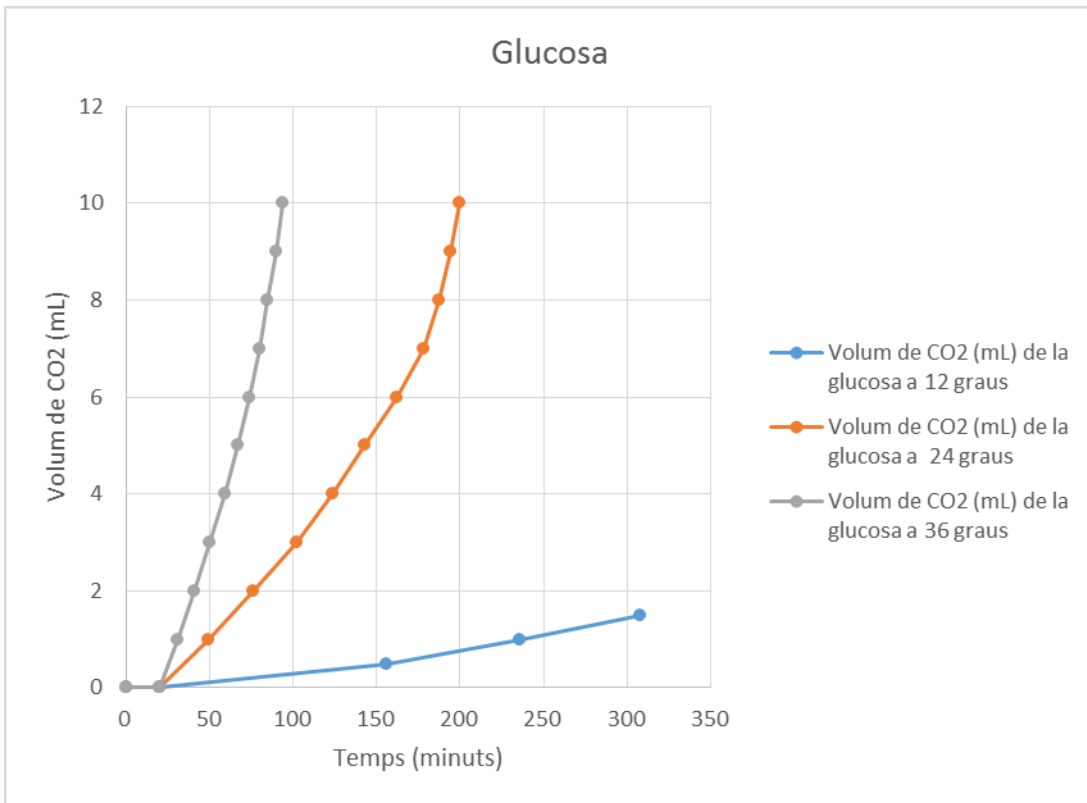
Preparar 50 mL de dissolució de cada substrat al 10%, utilitzant com a dissolvent aigua desionitzada. En les pràctiques on s'utilitza urea, s'afegeix en aquesta dissolució en una concentració de 2 g/L.

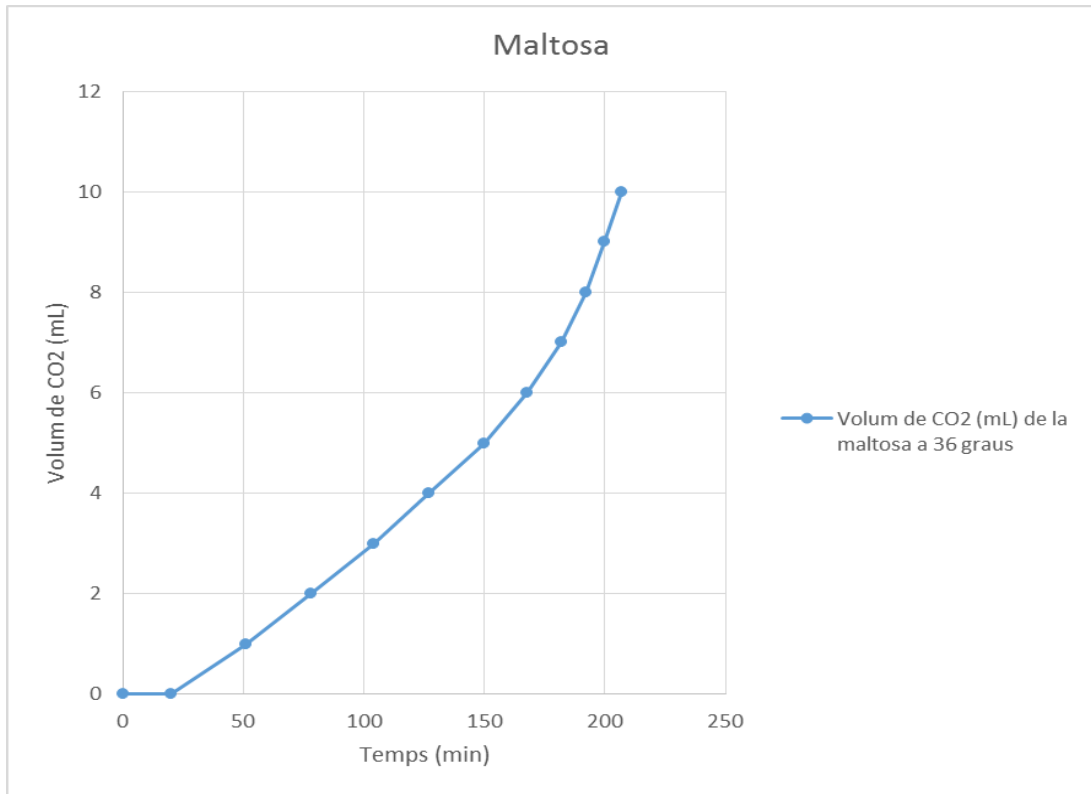
A continuació, introduir 0,5 grams de llevat a cada dissolució i, omplir els sacarímetres amb 20 ml de dissolució, utilitzant dos sacarímetres per a cada substrat.

Posar els sacarímetres a diferents temperatures per veure com el canvi de temperatura afecta a la velocitat de la fermentació.

Observar com la fermentació dels diferents substrats comença després de uns quants minuts de rehidratació dels llevats i, analitzar els resultats.

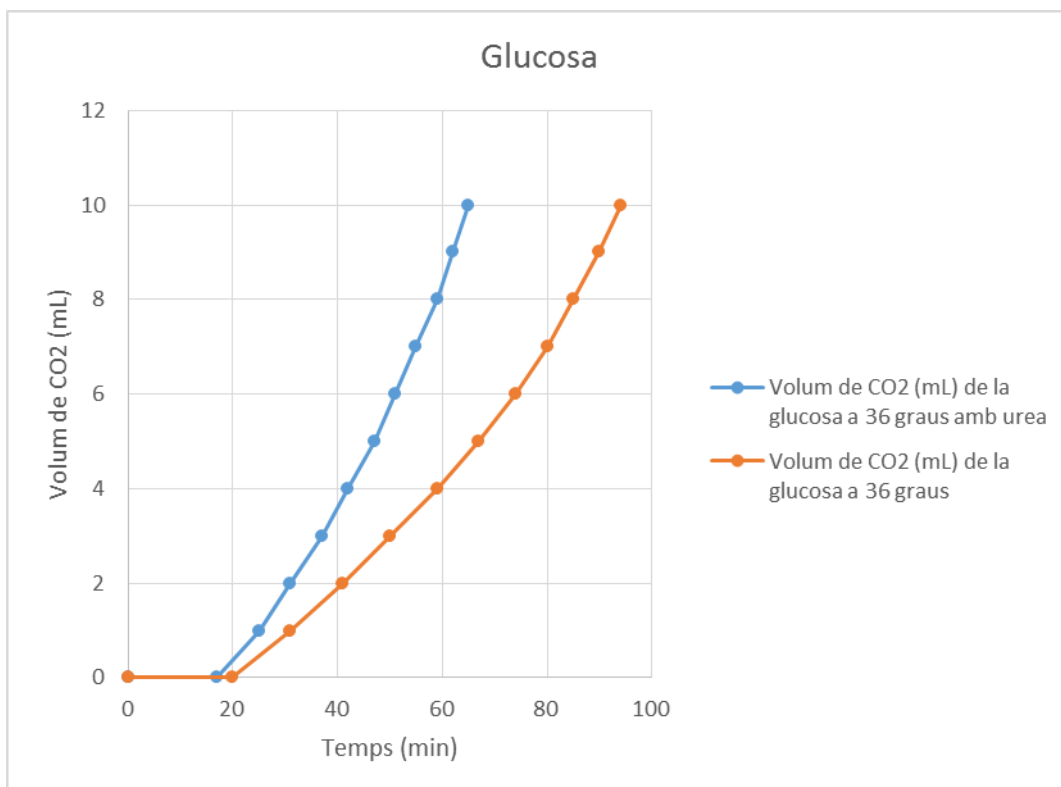
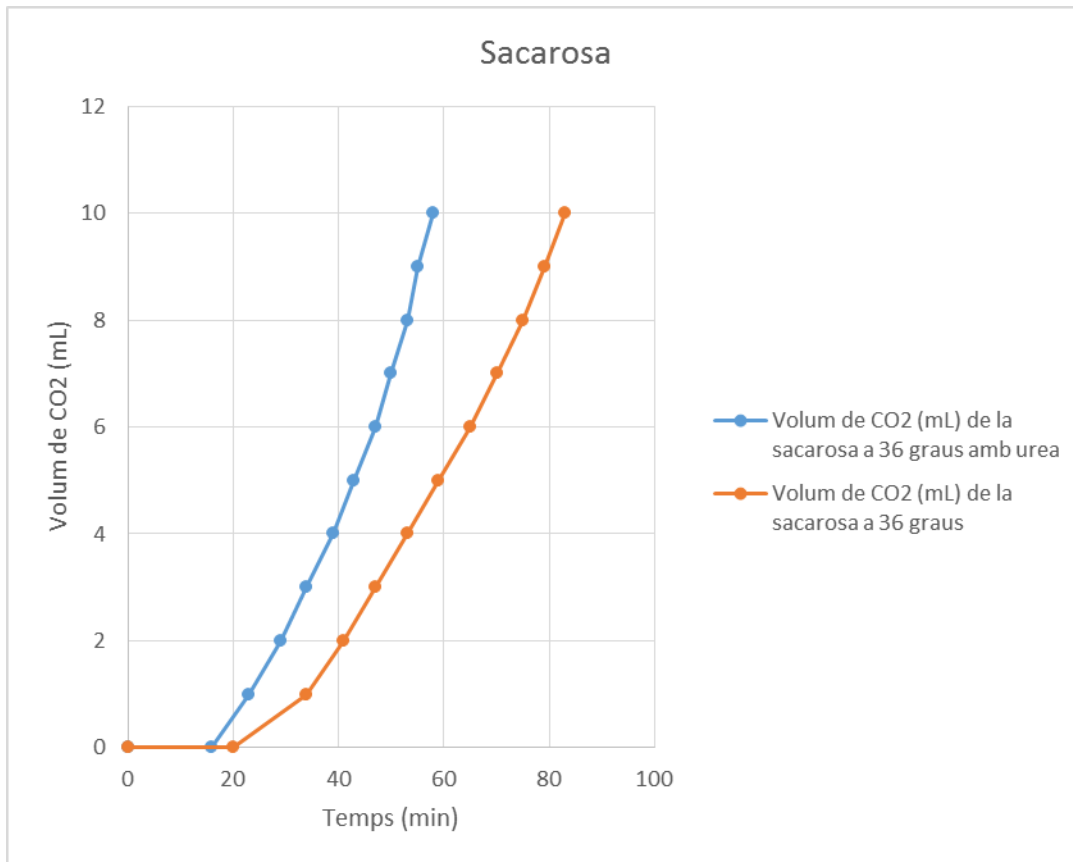
Sense utilitzar urea:

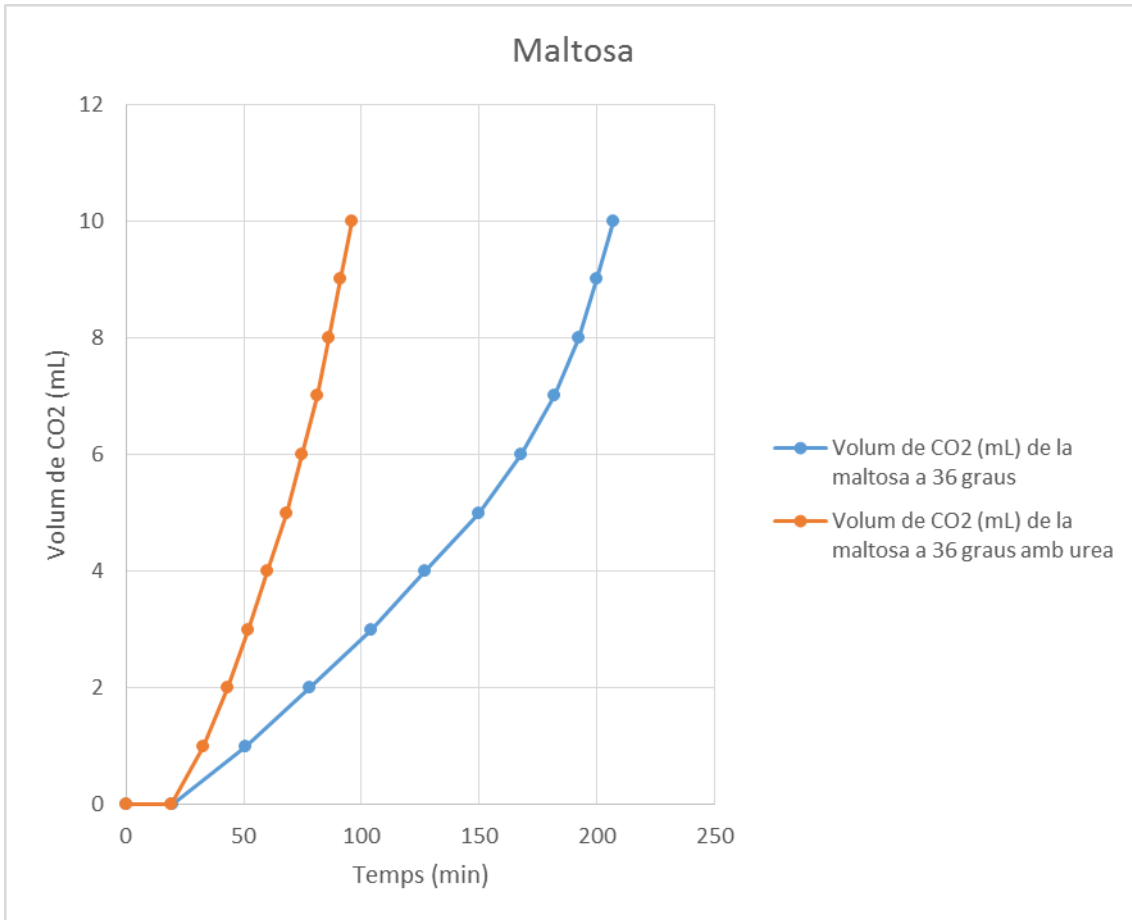






Comparació amb urea:





- **Conclusions:** Sense utilitzar urea, la glucosa es degrada més ràpidament que qualsevol altre sucre, la sacarosa es degrada més ràpidament que la maltosa i, el glicerol sols produeix unes petites bombolles de diòxid de carboni.

En canvi, utilitzant urea, tots els substrats acceleren la seva degradació, però la sacarosa aconsegueix degradar-se més ràpidament que la glucosa. La resta de substrats tot i anar més ràpidament, no varien gaire el seu comportament.

Això pot ser degut a que: La urea és una font de nitrogen per a moltes soques de *Saccharomyces cerevisiae*. Això provoca que el llevat incrementi la producció d'invertases, que són els enzims que ajuden a degradar la sacarosa. Per tant, al afegir urea, hi ha més enzims disponibles i s'accelera molt la degradació de la sacarosa.

En general, la presència d'urea accelera el procés de la glucòlisi, però per altra banda, es pot inhibir la via degradativa de la maltosa.

Finalment, es pot veure com l'augment de temperatura afavoreix la degradació dels substrats.

Per tant, la hipòtesi era només encertada quan no s'utilitza urea, quan s'utilitza urea la sacarosa es degrada més ràpidament que la glucosa i la hipòtesi s'invalida.

## 8. CONCLUSIONS

Després de realitzar aquest treball sobre les fermentacions, les conclusions que se'n poden extreure són les següents:

- En primer lloc, de l'estudi teòric que he realitzat basant-me en fonts bibliogràfiques en puc extreure que, les fermentacions es van descobrir fa molt de temps, però no va ésser fins al segle XX que es van descobrir molts aspectes i es van tornar vertaderament importants per la nostra societat, més del que ja ho era abans. També se'n pot extreure que té unes aplicacions molt diferents i a la vegada molt extenses, des de la indústria fins a la vida quotidiana i això és molt interessant.

També s'ha de dir que, aquest és un tema d'investigació actual i que en els pròxims anys segurament es tornarà molt més important.

- De les pràctiques, se'n poden extreure conclusions per afirmar que la temperatura ideal per realitzar una fermentació ràpida és a 36°C, però si es vol realitzar una fermentació per obtenir productes més elaborats, com ara la cervesa, cal molt de temps i una temperatura baixa. De les pràctiques també se'n pot argumentar que una font de nitrogen pot ajudar molt en alguns casos a accelerar el procés de fermentació, i aquesta dada és interessant perquè va permetre en la última pràctica estalviar més de 20 minuts si es comparen les degradacions de sacaroses.

## 9. BIBLIOGRAFIA I WEBGRAFIA

### BIBLIOGRAFIA:

Biotecnología y alimentación

Gloria Morcillo Ortega, Estrella Cortes Rubio, José Luis García López

Biotecnología Básica

J. D. Bu'Lock

El Ascenso del Hombre

Jacob Bronowski

## WEBGRAFIA:

<http://dlc.iec.cat/> (09/08/2014)

<http://www.rae.es/> (09/08/2014)

<http://es.wikipedia.org/wiki/Fermentaci%C3%B3n> (01/10/2014)

<http://www.csic.es/> (10/08/2014)

<http://www.genome.jp/kegg/> (25/07/2014)

<http://www.wikipathways.org/> (25/07/2014)

(Molta informació també ha estat extreta de coneixements, documentació del curs “Bojos per la Bioquímica” i preguntes realitzades a professors)

## 10. AGRAÏMENTS

Per la realització d'aquest treball ha estat important la col·laboració i el suport de moltes persones i a totes elles, gràcies.

Al doctor Javier Méndez per ajudar-me en la part pràctica i teòrica del treball, ja que sense ell aquest treball no hauria estat possible.

A la Universitat de Barcelona, la Fundació Catalunya-La Pedrera i al Programa Bojos per la Bioquímica, juntament amb Josep Maria Fernández, coordinador del programa, per permetre la meua estada a la Universitat per dur a terme la part pràctica.

A la Montse Coll, tutora, per haver-me ajudat a realitzar aquest treball.

A l'INS Miquel Martí i Pol per oferir-me la oportunitat de fer aquest treball.

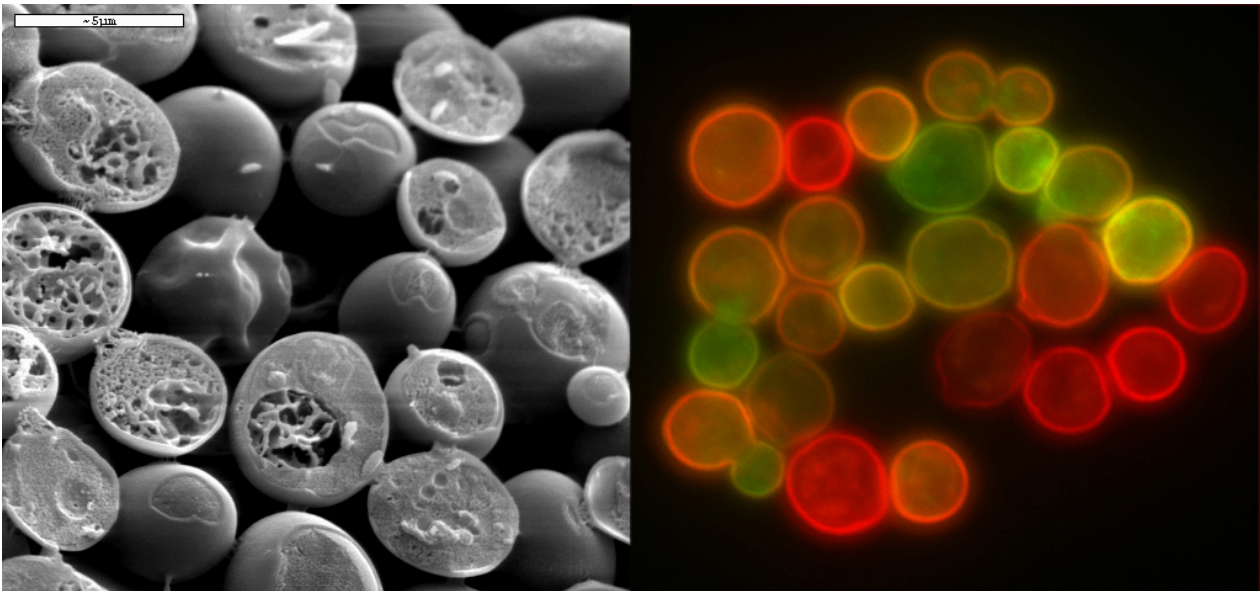
A Cerveses Manlleu S.C.P. (PilsTer) per ajudar-me en la part pràctica.

Als meus pares, per ajudar-me i donar-me suport sempre.

Finalment vull agrair l'ajuda de totes les persones que, d'una manera o d'una altra, hagin contribuït a l'elaboració d'aquest treball.

# ANNEX: DOCUMENTS COMPLEMENTARIS

## ESTUDI DE LES FERMENTACIONS I ELS ORGANISMES IMPLICATS





## SUMARI DE L'ANNEX

4.	La història de les Fermentacions.....	pàg. 1
4.4.	La Biotecnologia Moderna.....	pàg. 1
5.	Material d'ús Microbiològic.....	pàg. 4
5.1.	Material d'ús general.....	pàg. 4
6.	El Llevat i les Principals Rutes Metabòliques.....	pàg. 20
7.	Part Pràctica.....	pàg. 21
7.2.	Càlcul de la Resistència a l'Alcohol.....	pàg. 21
7.3.	Estudi de la Degradació de Sucres.....	pàg. 22

## 4. LA HISTÒRIA DE LES FERMENTACIONS

### 4.1 LA BIOTECNOLOGIA MODERNA

En aquest apartat del treball escrit, hi ha una citació de Louis Pasteur extreta del llibre “El Ascenso del Hombre”, de Jacob Bronowski. Aquesta citació està en la pàgina 128 i 129 del llibre, transcrites en les pàgines següents.

La part de la citació i la consegüent explicació està subratllada.

Cuando la teoría de la evolución presupuso que algunas especies animales habían hecho su aparición en épocas más recientes que otras, los críticos respondían frecuentemente con citas bíblicas. Sin embargo, la mayoría de las gentes admitía que la creación no se había detenido en la Biblia. Había la creencia de que el Sol formaba cocodrilos del fango del Nilo. Se suponía que los ratones se generaban en montones de trapos viejos y sucios; y era evidente que el origen de las moscardas era la carne descompuesta. Los gusanos debían ser creados dentro de las manzanas, pues, ¿de qué otra forma se explicaría su presencia allí? Y se suponía que todas estas criaturas surgían espontáneamente a la vida sin la intervención de progenitores.



*Figura 44 Fotografía de Wallace admirando un Eremurus Robustus que floreció en su jardín en 1905.*

Las fábulas acerca de cómo las criaturas surgen espontáneamente a la vida son muy antiguas y todavía son creídas, pese a que Louis Pasteur las confutó bellamente a partir de 1860. Efectuó buena parte de ese trabajo durante su infancia, en el hogar paterno de Arbois, en la campiña francesa del Niza, al cual solía regresar todos los años. Ya para entonces había realizado trabajos sobre la fermentación, particularmente acerca de la fermentación de la leche (la palabra «pasteurización» nos lo recuerda). Pero alcanzaría la cúspide de su poderío en 1863 (contaba cuarenta años de edad) cuando el Emperador de Francia le pidió que investigase qué marchaba mal en la fermentación del vino, problema que resolvió en dos años. Resulta irónico recordar que aquellos figuran entre los mejores años vinícolas de que se tenga memoria; hasta nuestros días, el año de 1864 se recuerda, en ese sentido, como ningún otro.

«El vino es un mar de organismos», afirmó Pasteur «Merced a algunos vive, merced a otros se descompone». Hay dos elementos sorprendentes en este pensamiento. Uno es que Pasteur encontró organismos que viven sin oxígeno. Esto representaba una molestia para los vinicultores de entonces; pero a partir de ese momento se ha hecho crucial para la comprensión del inicio de la vida, pues en ese entonces la Tierra carecía de oxígeno. Y el segundo elemento es que Pasteur era poseedor de una técnica admirable, mediante la cual podía observar los vestigios de vida en el líquido. A partir de los veinte años se había creado una reputación al demostrar que existen moléculas de forma característica. Esta era por tanto una pista con la cual rastrear a través del proceso vital. Este resultó ser un proceso tan profundo y, aun para nosotros, tan enigmático, que es conveniente echar una ojeada al propio laboratorio de Pasteur y a sus propias palabras.

¿Cómo puede explicarse el proceso del vino al fermentarse, la masa dejada crecer; o agriarse la leche cortada; o convertirse en humus las hojas muertas y las plantas enterradas en el suelo? Debo de hecho confesar que mis investigaciones han estado imbuidas con intensidad por la idea de que la estructura de las sustancias, desde el punto de vista siniestro y diestro (si todo lo demás es igual), juega una parte importante en las leyes más íntimas de la organización de los seres vivos, adentrándose en los más oscuros confines de su fisiología.

Mano derecha; mano izquierda; esta fue la pista profunda que Pasteur siguió en su estudio de la vida. El mundo está saturado de ejemplos cuya versión diestra difiere de la versión siniestra: un sacacorchos diestro opuesto a otro siniestro; un caracol diestro opuesto a otro siniestro. Pero particularmente las dos manos; se pueden acoplar una sobre otra, mas no volverlas de modo tal que la mano derecha y la izquierda se tornen intercambiables. Esto era conocido en tiempos de Pasteur, e incluso ya se aplicaba a algunos cristales cuyas facetas están dispuestas en forma tal que existen versiones derecha e izquierda.

Pasteur realizó modelos en madera de tales cristales (poseía habilidad manual y era un espléndido dibujante), pero mucho más que eso, concibió modelos intelectuales. En su primera pieza de investigación había dado con la noción de que debían existir también moléculas diestras así como siniestras; y lo que era verdad acerca del cristal debía reflejar una propiedad de la propia molécula. Y esto debería ser extensivo para el comportamiento de las moléculas en cualquier situación asimétrica. Por ejemplo, cuando son colocadas dentro de una solución y brilla un rayo de luz polarizado (que es asimétrico) a través de ellas, las moléculas de una clase (digamos, por conveniencia, las moléculas que Pasteur denominó diestras) deberán rotar el plano de polarización de la luz hacia la izquierda. Una solución de cristales correspondientes todos a una misma forma se dirigirán asimétricamente hacia el rayo de luz asimétrico producido por un polarímetro. Conforme gira el disco polarizante, la solución se verá alternadamente oscura y luminosa y oscura y luminosa de nuevo.

El hecho más notable es que ocurre exactamente lo mismo en una solución que contenga células vivas. Aún no sabemos por que la vida cuenta con esta extraña propiedad química. Mas la propiedad establece que la vida tiene un carácter químico específico, el cual se ha mantenido a través de la evolución. Por primera vez Pasteur había eslabonado todas las formas de vida con una sola clase de estructura química. De este poderoso pensamiento se desprende que podremos eslabonar la evolución con la química.

La teoría de la evolución no es ya un campo de batalla. Esto se debe a que la evidencia en pro de ella es mucho más rica y más variada ahora que en los días de Darwin y Wallace. La evidencia más interesante y moderna proviene de la química de nuestro propio cuerpo. Permítaseme dar un ejemplo práctico: me es dado mover la mano en este momento porque sus músculos contienen un depósito de oxígeno, el cual se encuentra ahí gracias a una proteína llamada mioglobina. Esta proteína está formada por un poco más de ciento cincuenta aminoácidos. El número es igual en mí que en cualquier animal que haga uso de la mioglobina. Pero los mismos aminoácidos tienen ligeras variantes. Entre mí y un chimpancé existe sólo una diferencia en un aminoácido; entre mí y un mono *bush* (que es un primate menos evolucionado) existen algunas diferencias en los aminoácidos; y finalmente, entre mí y la oveja o el ratón, el número de diferencias se incrementa. El número de diferencias en los aminoácidos es la medida de la distancia evolutiva entre mí y los demás mamíferos.

Está claro, pues, que debemos buscar el progreso evolutivo de la vida en la producción de moléculas típicas. Y esa producción debe comenzar a partir de los materiales en ebullición al formarse la Tierra. Para hablar con sensatez acerca de la aparición de la vida habremos de ser sumamente realistas. Tendremos que formular una pregunta histórica. Cuatro mil millones de años atrás, antes del comienzo de la vida, cuando la Tierra era muy joven, ¿cómo era su superficie?, ¿cómo era su atmósfera?

## **5. MATERIAL D'ÚS MICROBIOLÒGIC**

### **4. MATERIAL D'ÚS GENERAL**

En aquest apartat del treball escrit, concretament en l'explicació dels medis de cultiu sòlids, es mencionen alguns dels més utilitzats. Seguidament, hi ha documentació complementària sobre els medis de cultiu sòlids que més s'utilitzen per cultivar llevats i bacteris.

Cada cultiu té la explicació de com fabricar-lo, amb els ingredients i la concentració d'aquests.

# YEAST AND BACTERIAL MEDIA RECIPES

## 10X YEAST NITROGEN BASE SOLUTION (YNB + dextrose + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )

Dissolve 1.7 g yeast nitrogen base (w/o ammonium sulfate and w/o amino acids) and 5 g of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in 100 ml of distilled water, filter sterilize and transfer sterilely to a sterile bottle or to autoclaved medium. The same sterile filter unit can be used for the to sterilize additional YNB etc. unless the spout is contaminated by coming into contact with a nonsterile surface.

## 10X SUPPLEMENT SOLUTIONS

Dry supplement mix is dissolved in 100 ml distilled water (when making 1000 ml of medium). This should be done on a stir plate set at low heat. Once the powder has dissolved (a few crystals may be left after 30 min. of stirring) the mixture is filter sterilized and can then be added to the appropriate autoclaved media. The following amounts of supplement mix are used to make one liter of media:

SUPPLEMENT MIX	WEIGHT FOR 1 LITER OF MEDIA	TYPE OF MEDIA
-ADE	440 mg	SDC-ADE
-ARG	440 mg	SDC-ARG, SDC-ARG+CAN
-HIS	440 mg	SDC-HIS, SORB/SDC-HIS
-LEU	430 mg	SDC-LEU, SORB/SDC-LEU
-LYS	430 mg	SDC-LYS
-MET	440 mg	SDC-MET
-THR	260 mg	SDC-THR
-TRP	440 mg	SDC-TRP, SORB/SDC-TRP
-TYR-PHE	380 mg	SDC-TYR-PHE
-URA	440 mg	SDC-URA, SORB/SDC-URA
COM	460 mg	SDC, Kac

## AMINO ACID AND BASE STOCK SOLUTIONS

Stock solutions are given as weight/volume (g/100 ml) and are made in H<sub>2</sub>O unless otherwise noted. All solutions should be stored in the refrigerator. Arginine, aspartic acid, histidine, threonine, tryptophan, tyrosine, canavanine and cycloheximide solutions should be filter sterilized rather than autoclaved. Histidine and tryptophan solutions should be kept in the dark.

name/concentration/made in ml of solution/l of medium & ~ µl/plate (assume 30 plates/l)

0.5% adenine/0.05 N HCl	8 ml/l & 280 µl/plate (neutralize with 0.4 ml of 1 M base/l after adding to medium)
2% arginine	1 ml/l & 35 µl/plate
2% aspartic acid/adjust to pH 5.5	5 ml/l & 175 µl/plate
2% histidine	1 ml/l & 35 µl/plate
0.6% isoleucine	5 ml/l & 175 µl/plate
1% leucine	6 ml/l & 210 µl/plate
1.5% lysine	2 ml/l & 70 µl/plate
2% methionine	1 ml/l & 35 µl/plate
2% phenylalanine	2 ml/l & 70 µl/plate
6% threonine	5 ml/l & 175 µl/plate
1% tryptophan	2 ml/l & 70 µl/plate
0.25% tyrosine/0.05 N NaOH	10 ml/l & 350 µl/plate (neutralize with 0.5 ml of 1 M HCl/l after adding to medium)
0.2% uracil/1% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5 ml/l & 175 µl/plate
3% valine	5 ml/l & 175 µl/plate





## 1000X VITAMIN STOCK SOLUTION

Vitamin	Stock solution	Vol. added for 100 ml of 1000X vitamin stock solution; stocks may have to warmed to go into solution; solubility ( )
biotin	0.01 g/100 ml 95% EtOH	2 ml (~ 80 mg/100 ml 95% EtOH)
calcium pantothenate	1 g/100 ml	4 ml (1 g/2.8 ml H <sub>2</sub> O)
folic acid	0.01 g/100 ml	2 ml (warm to dissolve)
inositol	10%	2 ml (14 g/100 ml H <sub>2</sub> O)
niacin	1%	4 ml (1 g/60 ml EtOH or 1.4 ml H <sub>2</sub> O)
p-aminobenzoic acid	1 g/100 ml 95% EtOH	2 ml
pyridoxine HCl	1 g/100 ml 95% EtOH	4 ml (1 g/90 ml EtOH or 4.5 ml H <sub>2</sub> O)
thiamine HCl	1 g/100 ml 95% EtOH	4 ml (1 g/100 ml 95% EtOH or 1 ml H <sub>2</sub> O)
riboflavin		add 20 mg

### Complete vitamin solution:

- 1.) Remove the individual stock solutions from the refrigerator, may have to warm to get them back into solution,
- 2.) Combine all 95% EtOH vitamin solutions (12 ml volume),
- 3.) Add 20 mg riboflavin to 95% EtOH mixture,
- 4.) Combine all filter sterilized H<sub>2</sub>O solutions (12 ml volume) with 76 ml sterile dH<sub>2</sub>O,
- 5.) Combine the sterile H<sub>2</sub>O solution with the 95% EtOH solution/suspension for a final volume of 100 ml. Add 1 ml to 1 l of medium.

### Vitamin dropout solutions:

Same as above except that one or more vitamins are not added to the final mixture and the volume of sterile dH<sub>2</sub>O added is adjusted so the final volume is 100 ml. Add 1 ml to 1 l of medium.

## VITAMIN CONCENTRATIONS IN DEFINED MEDIUM

Vitamin	Final conc.
biotin	2 µg/l
calcium pantothenate	400 µg/l
folic acid	2 µg/l
inositol	2 mg/l
niacin	400 µg/l
p-aminobenzoic acid	200 µg/l
pyridoxin HCl	400 µg/l

riboflavin	200 µg/l
thiamine HCl	400 µg/l

## MAKING SUPPLEMENT MIXTURES

There are ten different dropout mixtures. Nine of these lack a single amino acid or base (ADE, ARG, HIS, LEU, LYS, MET, THR, TRP and URA) and one is missing two amino acids (TYR-PHE). There is also a complete mixture (COM) which contains everything. To make a supplement mixture simply weigh out the different components (minus 1 or 2) and grind them into a fine powder with a mortar and pestle (~ 4-5 minutes) or a coffee grinder (clean thoroughly after each use). One mixture made according to this recipe will make ~ 40 liters of plates. Charts have been made for each kind of supplement mix. You should make copies of all of the charts. When you are making up a supplement mix check off each component on the chart. This makes it less likely that a component will be left out or added twice. Another useful trick: after weighing out each component (on a separate weigh boat or piece of weigh paper), place it on the bench and label each one e.g. adenine, arginine, etc. When you are done recheck to make sure you have all the components, then combine them and mix them. Store the supplement mixtures in disposable plastic scintillation vials; mark the amount to be used per liter of media on each vial.

## SUPPLEMENT MIXTURE COMPONENTS

adenine	800 mg
arginine	800 mg
histidine	800 mg
leucine	1200 mg
lysine	1200 mg
methionine	800 mg
phenylalanine	2000 mg
threonine	8000 mg
tryptophan	800 mg
tyrosine	1200 mg
uracil	800 mg

COMPONENT	TYPE OF SUPPLEMENT MIX			
	-ADE	-ARG	-HIS	-LEU
adenine	0 mg	800 mg	800 mg	800 mg
arginine	800 mg	0 mg	800 mg	800 mg
histidine	800 mg	800 mg	0 mg	800 mg
leucine	1200 mg	1200 mg	1200 mg	0 mg
lysine	1200 mg	1200 mg	1200 mg	1200 mg
methionine	800 mg	800 mg	800 mg	800 mg
phenylalanine	2000 mg	2000 mg	2000 mg	2000 mg
threonine	8000 mg	8000 mg	8000 mg	8000 mg
tryptophan	800 mg	800 mg	800 mg	800 mg
tyrosine	1200 mg	1200 mg	1200 mg	1200 mg
uracil	800 mg	800 mg	800 mg	800 mg

COMPONENT	TYPE OF SUPPLEMENT MIX			
	-LYS	-MET	-THR	-TRP
adenine	800 mg	800 mg	800 mg	800 mg
arginine	800 mg	800 mg	800 mg	800 mg
histidine	800 mg	800 mg	800 mg	800 mg
leucine	1200 mg	1200 mg	1200 mg	1200 mg
lysine	0	1200 mg	1200 mg	1200 mg
methionine	800 mg	0	800 mg	800 mg
phenylalanine	2000 mg	2000 mg	2000 mg	2000 mg
threonine	8000 mg	8000 mg	0	8000 mg
tryptophan	800 mg	800 mg	800 mg	0
tyrosine	1200 mg	1200 mg	1200 mg	1200 mg
uracil	800 mg	800 mg	800 mg	800 mg

COMPONENT	TYPE OF SUPPLEMENT MIX		
	-TYR -PHE	-URA	COM
adenine	800 mg	800 mg	800 mg
arginine	800 mg	800 mg	800 mg
histidine	800 mg	800 mg	800 mg
leucine	1200 mg	1200 mg	1200 mg
lysine	1200 mg	1200 mg	1200 mg
methionine	800 mg	800 mg	800 mg
phenylalanine	0	2000 mg	2000 mg
threonine	8000 mg	8000 mg	8000 mg
tryptophan	800 mg	800 mg	800 mg
tyrosine	0	1200 mg	1200 mg
uracil	800 mg	0	800 mg

## PLATE RECIPES

### SD PLATES:

#### Agar

850 ml distilled water  
20 g. agar:  
Autoclave

#### YNB + Dextrose

150 ml distilled water  
6.7 g Yeast Nitrogen Base (w/o amino acids, with ammonium sulfate)  
20 g. Dextrose  
Filter Sterilize

After autoclaving combine the autoclaved solution and 150 ml of (filter sterilized) Yeast Nitrogen Base etc. Mix thoroughly and pour plates.

### SDC and SDC-? PLATES:

#### Agar

850 ml distilled water  
20 g. agar  
Autoclave

#### YNB + Dextrose + Amino Acids

150 ml distilled water  
Amino acid supplement mixture  
6.7 g Yeast Nitrogen Base (w/o amino acids, with ammonium sulfate)  
20 g. Dextrose  
Filter Sterilize

After autoclaving combine the autoclaved solution YNB + Dextrose + Amino Acids. Mix thoroughly and pour plates.

### SDC - ARG + CAN PLATES:

- 1.) make SDC-ARG (see SDC-? above)
- 2.) after autoclaving add 2 ml of 2% canavanine (filter sterilized), do not mouth pipette

2% canavanine solution: Wear gloves when making the solution. Dissolve 2 g canavanine in 100 ml of distilled water, filter sterilize and transfer 10 to 15 ml to sterile plastic tubes (15 ml). Keep one tube in the refrigerator ready for use. The other tubes should be kept frozen. When a frozen tube is thawed it must be thoroughly mixed, otherwise the canavanine will be concentrated in the bottom of the tube.

### SORBITOL CONTAINING DROPOUT PLATES: SORB/SDC-?

#### Agar

670 ml distilled water:  
182 g Sorbitol  
20 g. agar  
Autoclave

#### YNB + Dextrose + Amino Acids

150 ml distilled water  
Amino acid supplement mixture  
6.7 g Yeast Nitrogen Base (w/o amino acids, with ammonium sulfate)  
20 g. Dextrose  
Filter Sterilize

After autoclaving combine the autoclaved solution YNB + Dextrose + Amino Acids. Mix thoroughly and pour plates.

#### YEPD (YPD) PLATES:

##### Agar

20 g. Peptone  
10 g. Yeast Extract  
900 ml distilled water:  
5 ml of 1 M HCl (do not mouth pipette)  
20 g. Agar  
Autoclave

##### 20% Dextrose

100 ml distilled water  
20 g. Dextrose  
Autoclave

After autoclaving mix the two components and pour plates

Making 1 M HCl: This entire operation must be done in a hood and gloves and lab coat must be worn. Do not even think about mouth pipeting concentrated hydrochloric acid. Measure 83 ml of concentrated hydrochloric acid (HCl) in a graduated cylinder and slowly add the HCl to 917 ml of distilled water which is stirring on a stir plate. Once the 1 M HCl is made up it can be transferred to a plastic 1 liter bottle. The graduated cylinder which is used to measure the concentrated HCl must be carefully rinsed out with water before being put in with dirty glassware to be cleaned.

#### YEPD+CYH PLATES:

- 1.) make YEPD (as above)
- 2.) add 1 ml of 1% cycloheximide (filter sterilized) after autoclaving, do not mouth pipet

1% cycloheximide solution: Wear gloves when making up the solution. Dissolve 1 g cycloheximide in 100 ml of distilled water, filter sterilize and transfer 10 to 15 ml to sterile plastic tubes (15 ml). One tube is kept refrigerated ready for use while the other tubes are kept frozen. When a frozen tube is thawed it must be thoroughly mixed, otherwise the cycloheximide will be concentrated in the bottom of the tube.

#### KAc PLATES

##### Agar

900 ml distilled water  
2.2 g yeast extract  
0.5 g dextrose  
20 g potassium acetate  
20 g agar  
Autoclave

##### Amino Acid Supplements

100 ml distilled water  
460 mg COM(complete) mixture  
Filter sterilize

Combine the autoclaved and filter sterilized solutions, mix thoroughly and pour the plates

DIET KAc PLATES:

1000 ml distilled  
water 20 g potassium  
acetate 20 g agar  
Autoclave

After autoclaving mix thoroughly and pour plates

YEP(GAL), (MAL), (RAF) AND (SUC) PLATES:

Agar

20 g. Peptone	<u>20% Sugar</u>
10 g. Yeast Extract	100 ml distilled water
900 ml distilled water:	20 g. Sugar
5 ml of 1 M HCl (do not mouth pipet)	Filter sterilize
20 g. Agar	
Autoclave	

20% sugar solutions consist of 20 g of the appropriate sugar dissolved in 100 ml of distilled water (low heat will help galactose and raffinose go into solution). The solutions are then filter sterilized. After autoclaving add 100 ml of (filter sterilized) 20% galactose or maltose or raffinose or sucrose (substituting raffinose for sucrose allows better scoring of SUC markers); add antimycin A to a final concentration of 0.1 µg/ml

YEP(EG) PLATES:

In a 1 L beaker

950 ml distilled water  
10 g succinic acid (dissolve succinic first)  
20 g bacto-peptone (Sigma S-7501)  
20 g glycerol  
10 g yeast extract  
adjust to pH 5.5 by adding KOH pellets

Transfer pH's media into Flask/Bottle

20 g agar

Autoclave

After autoclaving add 25 ml 95% EtOH, mix thoroughly and pour plates

GELATIN MEDIUM:

In a >2 L container

950 ml distilled water  
10 g yeast extract  
20 g dextrose

100 g gelatin (Sigma, G-2500; 300 Bloom))

Melt gelatin in 55°C water bath, autoclave. After autoclaving, mix thoroughly and pour plates

#### $\alpha$ -AMINOADIPATE MEDIUM ( $\alpha$ -AA) PLATES:

<u>Agar</u>	<u>YNB + Dex + Lys</u>	<u><math>\alpha</math>-aminoadipate</u>
800 ml distilled water:	100 ml distilled water	100 ml distilled water
20 g. Agar	1.7 g. Yeast Nitrogen Base, without $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 g $\alpha$ -aminoadipate
Autoclave	20 g dextrose	Adjust to pH 5.5. (This will require adding pellets of KOH until all of the powder goes into solution and then adjusting the pH down to 5.5)
	2 ml of 1.5% lysine	Filter sterilize.
	Filter Sterilize	

After autoclaving, add filter sterilized solutions to autoclaved agar, mix thoroughly and pour plates.

It is possible to add some nutritional supplements to  $\alpha$ -AA medium but the best results are obtained with either no supplements (using a prototrophic strain) or supplements that either cannot be utilized as nitrogen sources or are poorly utilized (e.g. adenine, histidine, tryptophan, uracil).

#### 5-FOA PLATES

<u>Agar</u>	<u>YNB + Dex + 5-FOA</u>
500 ml distilled water:	500 ml distilled water
20 g. Agar	6.7 g. Yeast Nitrogen Base, with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Autoclave	1 g. 5-fluoroortic acid
	10 ml of 0.2% uracil (50 mg)
	20 g dextrose
	Adjust to pH 4.5
	Filter Sterilize

After autoclaving, add filter sterilized solution to autoclaved agar, mix thoroughly and pour plates.

It is possible to add other nutritional supplements or to add dropout mixtures to 5FOA medium. These should be dissolved along with the yeast nitrogen base etc. and filter sterilized.

Personal communication, W.M. Barnes:

- "I have discovered that FOA selection breaks down above pH 4.5. This problem is consistent with only the protonated form of FOA permeating cells. It turns out that the standard recipe for



FOA plates is pH 2.8. Some of this acidity is due to the FOA, which you have less of, so your plates must be at slightly higher pH.

- 5-FOA has no effect at all at pH 6 or 6.2, pretty good at pH 5.4, and full effect at 4 and below. This is as 2X filtered medium at R.T., before mixing with 4% hot agar. After solidifying, the plates have a slightly higher pH, as measured with a pH stick/paper."

#### D-HISITIDINE PLATES:

<u>Agar</u>	<u>D-Histidine</u>	<u>YNB + Dex + Pro</u>
800 ml distilled water:	100 ml distilled water	100 ml distilled water
20 g. Agar	2.1 g D-histidine	1.7 g. Yeast Nitrogen Base, without
Autoclave	Filter sterilize	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
		1 g. Proline
		20 g dextrose
		Filter Sterilize

After autoclaving, add filter sterilized solutions to autoclaved agar, mix thoroughly and pour plates. Final concentration of D-histidine ~ 10 mM.

This medium is used to positively select gap1 mutants. Gap1 is the only amino acid permease which can take up (i) toxic D-amino acids and (ii) citrulline. Therefore, gap1 mutants are (i) resistant to D-amino acids and (ii) unable to utilize citrulline as either a nitrogen source or as an arginine precursor. The general amino acid permease (Gap1) is repressed on rich nitrogen sources hence the use of proline as a nitrogen source.

#### MMS PLATES:

Make YEPD or SD/SDC medium, allow the medium to cool.

Add methyl methanesulfonate (MMS; methanesulfonic acid methylester, Sigma) to a final concentration of 0.035%. Use the plates ~ 12 hours after pouring them; discard unused plates after 2 days because the MMS breaks down. The best strategy for the occasional use of MMS plates is to have aliquots (e.g. 100 ml) of sterile medium (e.g. YEPD) made up. This sterile medium can be melted, allowed to cool and then MMS can be added. Original recipe is from Genetics 86: 33-55 (1977).

#### CASEIN PLATES:

<u>Agar</u>	<u>Casein</u>	<u>YNB + Dex</u>
500 ml distilled water:	400 ml distilled water	100 ml distilled water
20 g. Agar	5 g. casein (Sigma C-0376)	1.7 g. Yeast Nitrogen Base,
Autoclave	~ 800 mg (8 pellets) of NaOH is	without (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	added to help dissolve the	20 g Dextrose
	casein.	Filter Sterilize
	Adjust to pH 10 with 1 M HCl	
	Autoclave	

After autoclaving, mix the sterile solutions and pour plates.

## DOMINANT DRUG SELECTION MEDIA

### YPD + DRUG PLATES:

Use recipe for YPD plates, after autoclaving, cool media to pouring temperature and add 1 ml 1000X stock per liter of media\* and pour plates.

### SEC or SEC-? + DRUG PLATES:

<u>Agar</u>	<u>YNB + Dextrose + Amino Acids</u>
850 ml distilled water:	150 ml distilled water
20 g. agar	Amino acid supplement mixture
Autoclave	1.7 g. Yeast Nitrogen Base, without (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	1 g. Glutamic Acid (monosodium salt, Sigma G-1626)
	20 g. Dextrose
	Filter Sterilize

After autoclaving combine the autoclaved solution and 150 ml of (filter sterilized) yeast nitrogen base etc. Cool to pouring temperature, add filter sterilized antibiotic, mix thoroughly and pour plates.

<u>Antibiotic in plates</u>	<u>1000X Stock concentration</u>	<u>Final concentration</u>
Nourseothricin (Nat)	100 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O	100 µg/ml
Geneticin (G418)	200 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O	200 µg/ml
Hygromycin B (Hyg)*	Check the container to determine the concentration	300 µg/ml

### Notes:

Often the Hygromycin B is >300 mg/ml, you may have to calculate the amount required for a 300 µg/ml final concentration.

There can be variations on how much drug is added depending upon the strain of yeast or type of media.

### SDP PLATES + Bialaphos or Glufosinate:

<u>Agar</u>	<u>YNB + Dextrose</u>
850 ml distilled water	150 ml distilled water
20 g. agar	1.7 g Yeast Nitrogen Base (w/o amino acids, w/o ammonium sulfate)
Autoclave	1 g/L L-Proline
	20 g. Dextrose
	Filter Sterilize

After autoclaving combine the autoclaved solution and 150 ml of (filter sterilized) yeast nitrogen base etc. Cool to pouring temperature, add filter sterilized antibiotic, mix thoroughly and pour plates.

<u>Antibiotic</u>	<u>Final concentration</u>
Bialaphos	200 µg/ml
Glufosinate	600-800 µg

#### SLAD PLATES:

<u>Agar</u>	<u>YNB + Dex + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></u>
900 ml distilled water:	100 ml distilled water
20 g. Agar	1.7 g. Yeast Nitrogen Base, without (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Autoclave	5 ml 10 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	20 g dextrose
	Filter Sterilize

10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 0.132 g per 100 ml. Alternatively, add 6.6 mg of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to 1 l of medium.

After autoclaving, mix the sterile solutions and pour into petri dishes.

Pour plates thin!! Cells on a thin plate starve faster and it's easier to see (& photograph) the pseudohyphae.

## Bacterial Media

### LB Media (1L)

#### LB Broth

10 g Bacto-Tryptone  
5 g Bacto-Yeast Extract  
5 g NaCl  
ddH<sub>2</sub>O to 1 Liter  
Autoclave

#### LB Plates

10 g Bacto-Tryptone  
5 g Bacto-Yeast Extract  
5 g NaCl  
15 g Agar  
ddH<sub>2</sub>O to 1 Liter  
Autoclave

### LB + Antibiotic Plates

- Use recipe for LB plates, after autoclaving, cool media to pouring temperature and add 1 ml 1000X antibiotic stock per liter of media.

<u>Antibiotic</u>	<u>1000X Stock concentration</u>	<u>Final concentration in plates</u>
Ampicillin	100 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O	100 µg/ml
Carbenicillin	100 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O	100 µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in 100% EtOH	34 µg/ml
Kanamycin	40 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O	40 µg/ml
Tetracycline	15 mg/ml in 70% EtOH	15 µg/ml
Streptomycin	50 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O	50 µg/ml
Spectinomycin	50 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O	50 µg/ml

#### Notes:

There can be variations on how much antibiotic is added (and the differences in the concentration of the stocks). I put down my “standard” concentrations. YMMV

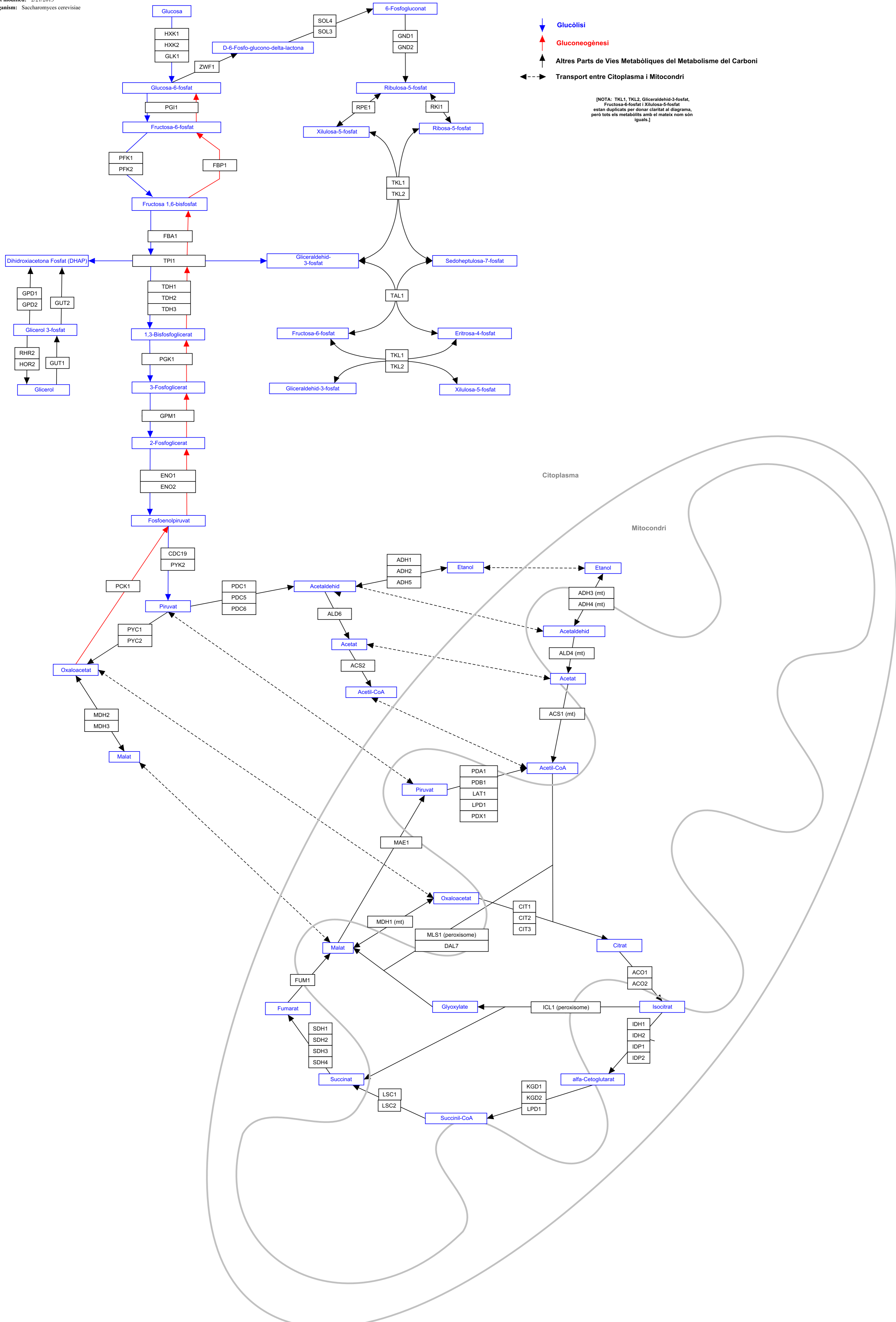
### LB + X-gal + Antibiotics

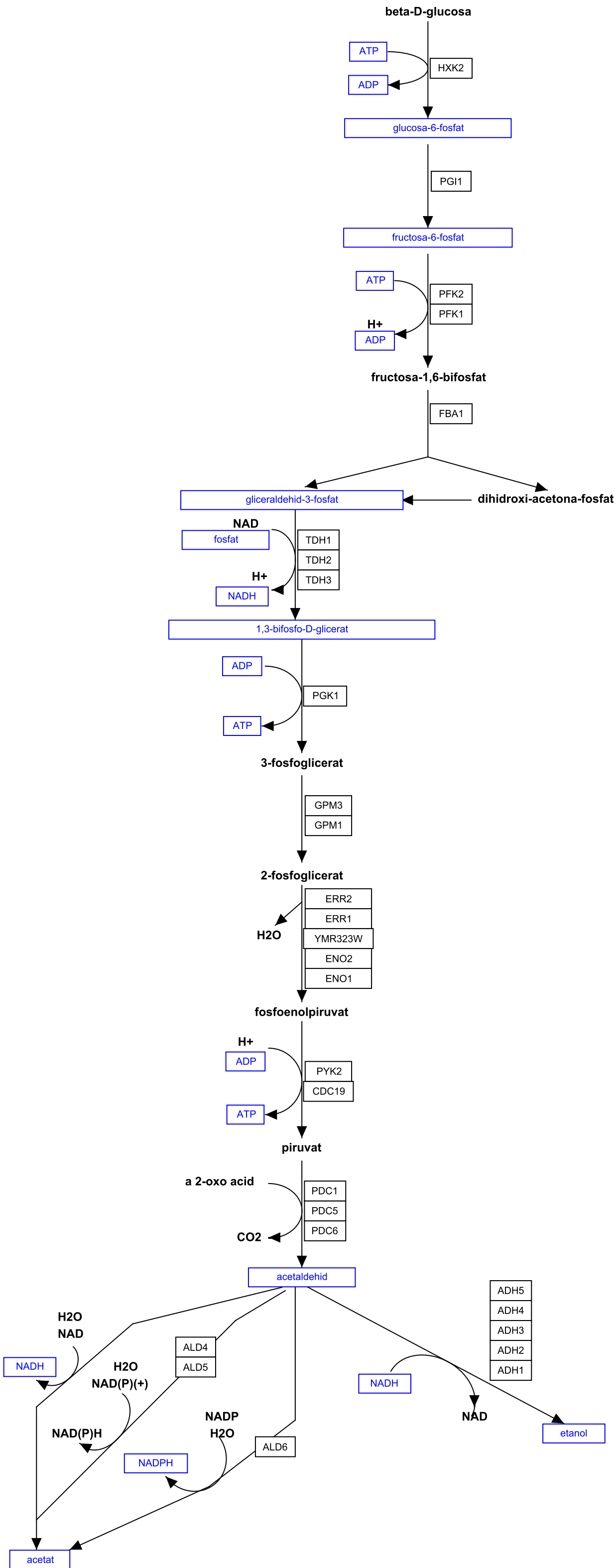
- Use recipe for LB plates, after autoclaving, cool media to pouring temperature, add desired antibiotics and add 2 ml of X-gal 20% stock (20 mg/ml) per liter of media. Warning: X-gal is in DMF (Dimethyl Formamide). Do not get DMF on skin, use gloves and eye protection.

## 6. EL LLEVAT I LES PRINCIPALS RUTES METABÒLIQUES

Tal i com s'exposa en el treball escrit, la ruta metabòlica principal de la fermentació alcohòlica dels llevats és la glucòlisi. Per aquest motiu, en la següent pàgina hi ha un mapa metabòlic, en DIN A2, extret i traduït de <http://www.wikipathways.org/>.

També hi ha un altre mapa, també extret de <http://www.wikipathways.org/>, que exposa de manera bastant clara el procés de fermentació, situat en la pàgina que succeeix el primer mapa.





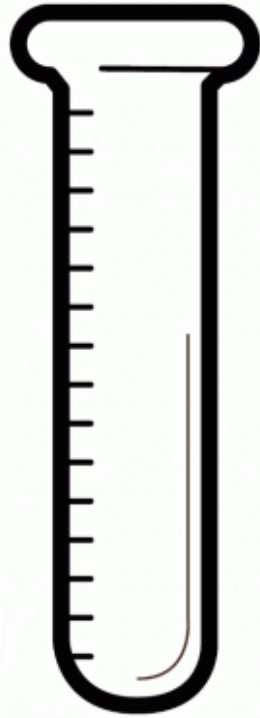
## 7. PART PRÀCTICA

### 7.2 CÀLCUL DE LA RESISTÈNCIA A L'ALCOHOL

En aquest apartat del treball escrit s'exposa un experiment i s'explica com es distribueixen els diferents compostos en els tubs que es deixen fermentant, però potser pot arribar a semblar una mica complicat. Per aquesta raó, en aquest apartat de l'annex s'exposa de manera gràfica, utilitzant esquemes, la forma en la qual es distribueixen les dissolucions en cada un dels 9 tubs (tots grups de 9 tubs són iguals, sols canvia la soca de llevat que s'inocula).

Aprofitant l'annex, també s'hi exposa el document en el que s'explica com fer el caldo utilitzat en la pràctica. Encara que el document de la explicació és per confeccionar el caldo 1x, per confeccionar un caldo 2x com l'utilitzat en la pràctica s'han de duplicar les concentracions dels elements solubles en la mateixa quantitat d'aigua destil·lada (concentrar la dissolució al doble).





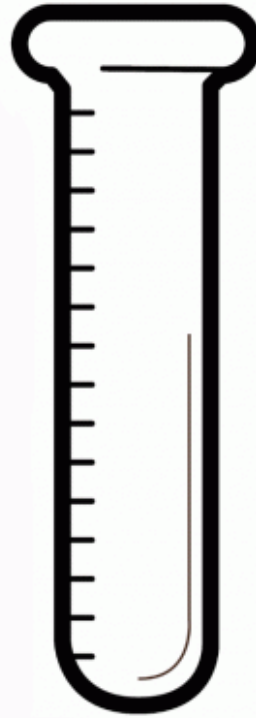
0% d'etanol

5 mL de caldo YPD 2x

1 mL de llevat en medi  
d'ampicil·lina

0 mL d'etanol

4 mL d'aigua destil·lada



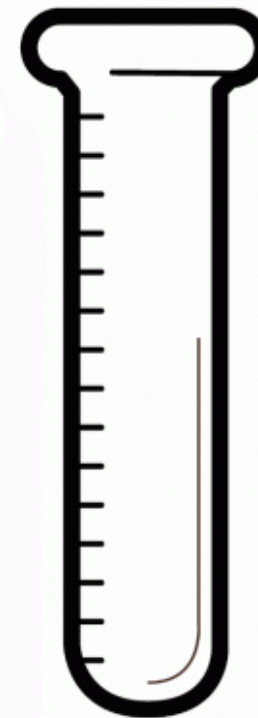
5% d'etanol

5 mL de caldo YPD 2x

1 mL de llevat en medi  
d'ampicil·lina

0,5 mL d'etanol

3,5 mL d'aigua destil·lada



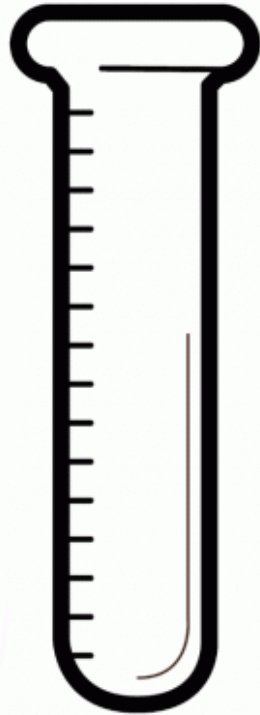
7% d'etanol

5 mL de caldo YPD 2x

1 mL de llevat en medi  
d'ampicil·lina

0,7 mL d'etanol

3,3 mL d'aigua destil·lada



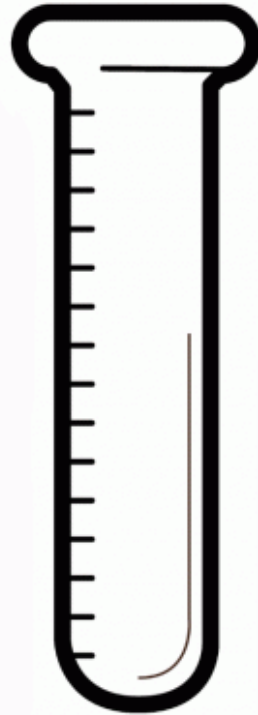
9% d'etanol

5 mL de caldo YPD 2x

1 mL de llevat en medi  
d'ampicil·lina

0,9 mL d'etanol

3,1 mL d'aigua destil·lada



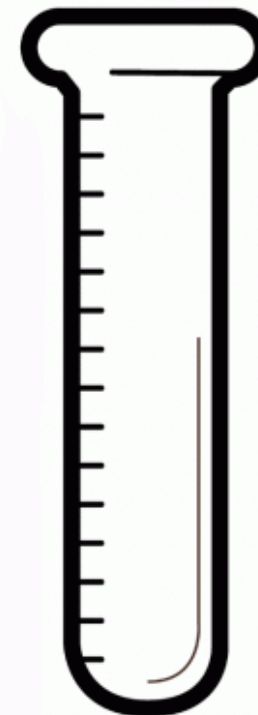
10% d'etanol

5 mL de caldo YPD 2x

1 mL de llevat en medi  
d'ampicil·lina

1 mL d'etanol

3 mL d'aigua destil·lada



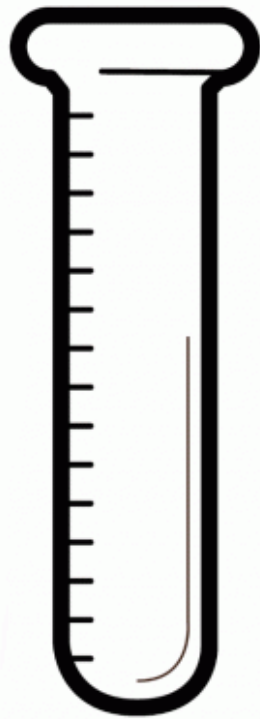
11% d'etanol

5 mL de caldo YPD 2x

1 mL de llevat en medi  
d'ampicil·lina

1,1 mL d'etanol

2,9 mL d'aigua destil·lada



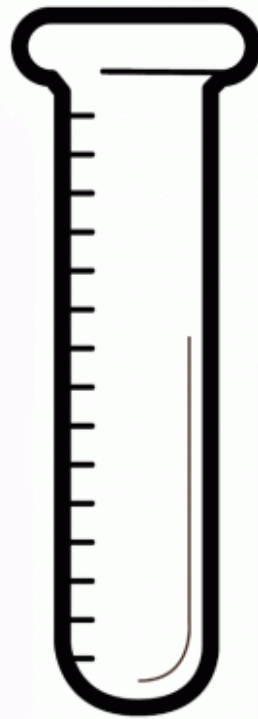
12% d'etanol

5 mL de caldo YPD 2x

1 mL de llevat en medi  
d'ampicil·lina

1,2 mL d'etanol

2,8 mL d'aigua destil·lada



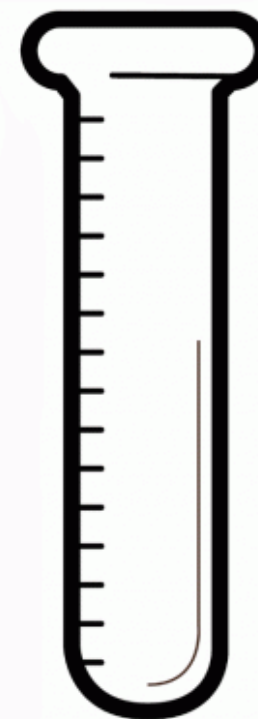
13% d'etanol

5 mL de caldo YPD 2x

1 mL de llevat en medi  
d'ampicil·lina

1,3 mL d'etanol

2,7 mL d'aigua destil·lada



14% d'etanol

5 mL de caldo YPD 2x

1 mL de llevat en medi  
d'ampicil·lina

1,4 mL d'etanol

2,6 mL d'aigua destil·lada

# Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD) Agar

## Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD) Broth

### Intended Use

YPD Agar and YPD Broth are used for maintaining and propagating yeasts in molecular microbiology procedures.

### Summary and Explanation

General methods in yeast genetics specify using yeast extract-peptone-dextrose (YPD) medium for cultivating *Saccharomyces cerevisiae* and other yeasts.<sup>1</sup> Yeasts grow well on a minimal medium containing only dextrose and salts. The addition of protein and yeast cell extract hydrolysates allows faster growth so that during exponential or log-phase growth, the cells divide every 90 minutes.<sup>1</sup>

### Formulae

#### Difco™ YPD Agar

Approximate Formula* Per Liter	
Yeast Extract .....	10.0 g
Peptone .....	20.0 g
Dextrose .....	20.0 g
Agar .....	15.0 g

#### Difco™ YPD Broth

Consists of the same ingredients without the agar.

\*Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria.

### User Quality Control

#### Identity Specifications

##### Difco™ YPD Agar

Dehydrated Appearance:	Beige, free-flowing, homogeneous.
Solution:	6.5% solution, soluble in purified water upon boiling. Solution is light to medium amber, very slightly to slightly opalescent.
Prepared Appearance:	Light to medium amber, slightly opalescent.
Reaction of 6.5% Solution at 25°C:	pH 6.5 ± 0.2

##### Difco™ YPD Broth

Dehydrated Appearance:	Beige, free-flowing, homogeneous.
Solution:	5.0% solution, soluble in purified water. Solution is light to medium amber, clear to very slightly opalescent.
Prepared Appearance:	Light to medium amber, clear to very slightly opalescent.
Reaction of 5.0% Solution at 25°C:	pH 6.5 ± 0.2

#### Cultural Response

##### Difco™ YPD Agar or YPD Broth

Prepare the medium per label directions. Inoculate and incubate at 25 ± 2°C for 42-48 hours (broth) or 48 hours (agar – up to 72 hours if necessary).

ORGANISM	ATCC™	INOCULUM CFU	RECOVERY
<i>Kluyveromyces lactis</i>	8563	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	Good
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18790	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	Good
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9080	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	Good

### Principles of the Procedure

YPD Agar and YPD Broth contain peptone as a source of carbon, nitrogen, vitamins and minerals. Yeast extract supplies B-complex vitamins which stimulate bacterial growth. Dextrose is the carbohydrate source. YPD Agar contains agar as the solidifying agent.

### Directions for Preparation from Dehydrated Product

1. Suspend the powder in 1 L of purified water:  
Difco™ YPD Agar – 65 g;  
Difco™ YPD Broth – 50 g.  
Mix thoroughly.
2. Heat the agar medium with frequent agitation and boil for 1 minute to completely dissolve the powder.
3. Autoclave the agar and broth media at 121°C for 15 minutes.
4. Test samples of the finished product for performance using stable, typical control cultures.

### Procedure

See appropriate references for specific procedures.

### Expected Results

Growth of colonies on the agar or turbidity in the broth.

### Reference

1. Ausubel, Brent, Kingston, Moore, Seidman, Smith and Struhl. 1994. Current protocols in molecular biology, Current Protocols, Brooklyn, N.Y.

### Availability

#### Difco™ YPD Agar

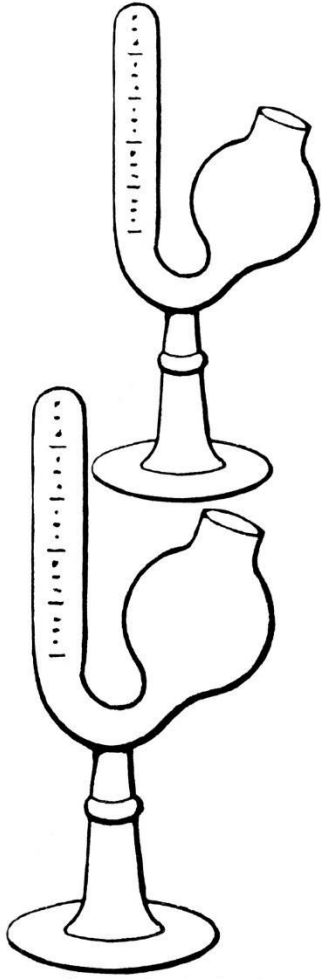
Cat. No.	242720	Dehydrated – 500 g
	242710	Dehydrated – 2 kg

#### Difco™ YPD Broth

Cat. No.	242820	Dehydrated – 500 g
	242810	Dehydrated – 2 kg

## 7.3 CÀLCUL DE LA RESISTÈNCIA A L'ALCOHOL

Al igual que en l'apartat anterior, aquesta part de l'annex va destinada a clarificar l'experiment realitzat utilitzant un document més gràfic. En aquest cas, s'explica de què està formada la dissolució de dins dels sacarímetres.

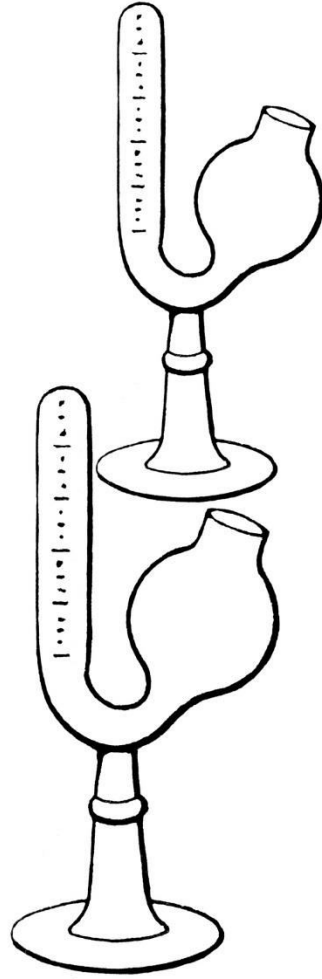


20 mL  $H_2O$

2 g de glucosa

0,2 g de llevat

(0,04 g d'urea)

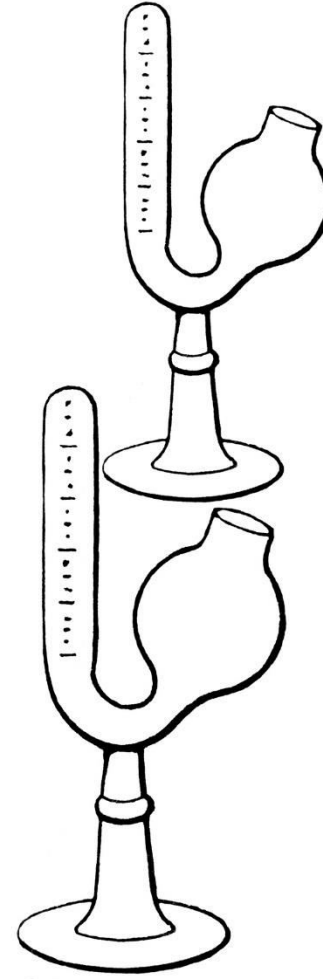


20 mL  $H_2O$

2 g de sacarosa

0,2 g de llevat

(0,04 g d'urea)

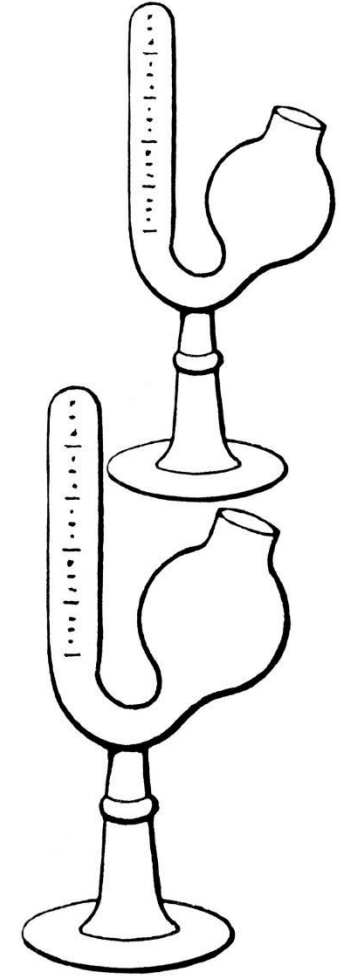


20 mL  $H_2O$

2 g de maltosa

0,2 g de llevat

(0,04 g d'urea)



20 mL  $H_2O$

2 g de glicerol

0,2 g de llevat

(0,04 g d'urea)

(Es van utilitzar dos sacarímetres per a cada substrat per aconseguir una rèplica de l'experiment i, també per aconseguir una mitjana de temps, ja que al ser un experiment microbiològic, té possibilitats d'error bastant altes)

