

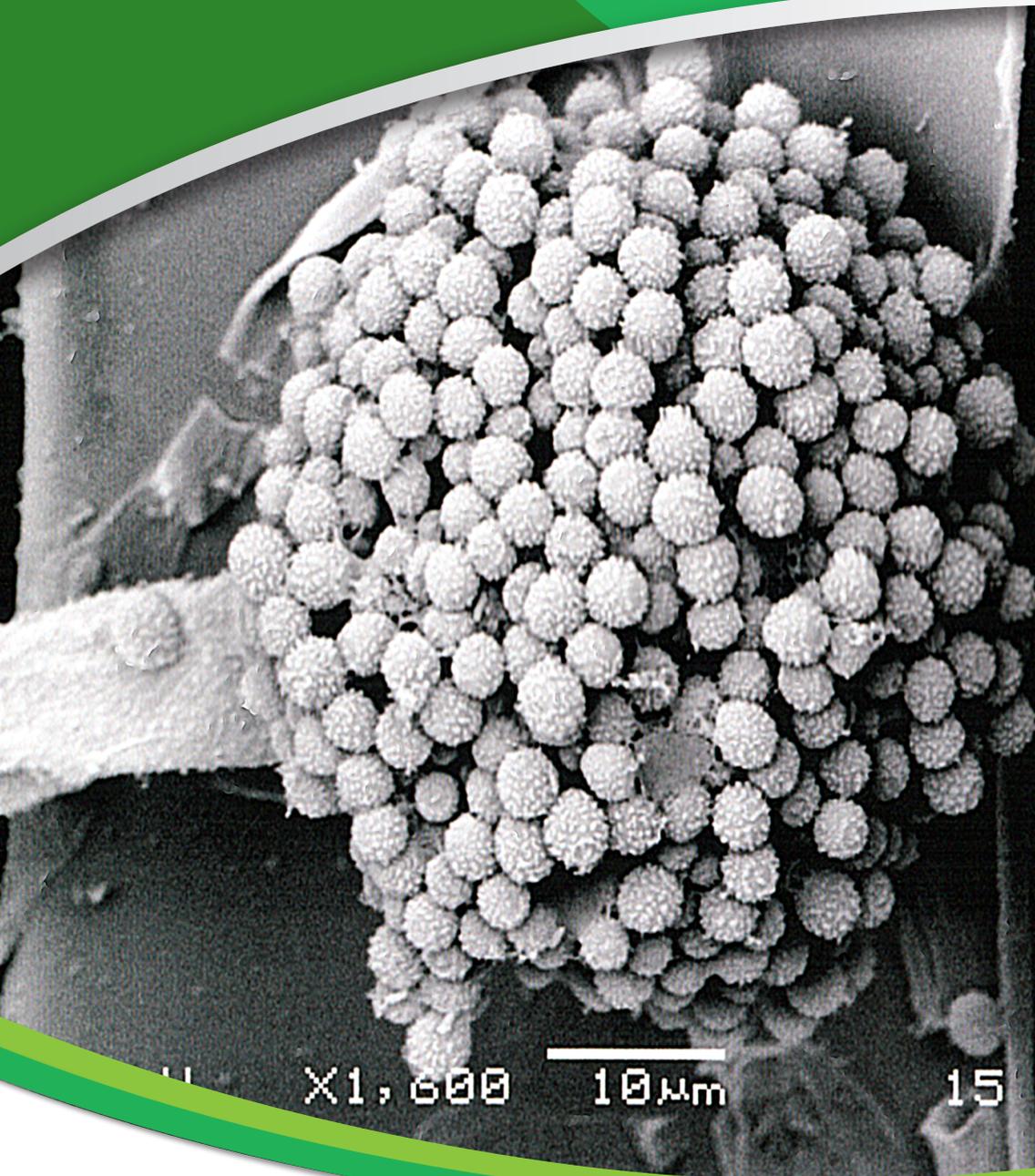


Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Manual de prácticas de laboratorio

Tecnología de Fermentaciones Alimentarias



Keiko Shirai Matsumoto

Frida P. Malpica Sánchez



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Dr. Salvador Vega y León
Rector General

Mtro. Norberto Manjarrez Álvarez
Secretario General

UNIDAD IZTAPALAPA

Dr. Javier Velázquez Moctezuma
Rector de Unidad

Dr. Miguel Ángel Gómez Fonseca
Secretario de Unidad

Dr. Rubén Román Ramos
Director de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Dr. Octavio Loera Corral
Jefe del Departamento de Biotecnología

Dra. Milagros Huerta Coria
Coordinadora de Extensión Universitaria

Lic. Adrián Felipe Valencia Llamas
Jefe de la Sección de Producción Editorial

Primera Impresión 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina,
Del. Iztapalapa, C.P 09340, México D.F. Tel.: 5804 4600

Impreso y hecho en México/*Printed in Mexico*

Índice

Lista de figuras	7
Lista de tablas	8
Prologo	9
Introducción	11
Capítulo 1. Medidas de seguridad en el laboratorio de tecnología de fermentaciones alimentarias.	13
Capítulo 2. Fermentación láctica en sustratos vegetales	25
Práctica 1. Determinación del efecto de la concentración de sal en la fermentación láctica de hortalizas encurtidas.	25
Práctica 2. Elaboración del chucrut o sauerkraut	
Práctica 3. Elaboración y análisis de un producto encurtido	37
Capítulo 3. Fermentación láctica en sustratos lácteos	43
Práctica 4. Elaboración de yogurt	43
Capítulo 4. Cultivo en medio sólido	47
Práctica 5. Fermentación en estado sólido con <i>Rhizopus oligosporus</i> : Elaboración de tempeh.	47
Capítulo 5. Fermentación alcohólica.	55
Práctica 6. Cinética de la fermentación alcohólica y efecto de la temperatura en el proceso de obtención de alcohol.	55
Práctica 7. Elaboración y caracterización de un vino de frutas.	61
Práctica 8. Elaboración y caracterización de sake	67
Práctica 9. Elaboración y caracterización de cerveza	73
Capítulo 6. Fermentación acética	79
Práctica 10. Determinación del efecto de la aireación en la fermentación acética.	79
Referencias	87
Guía para la elaboración del reporte	91
Anexo I Medios de cultivo y reactivos.	93
Anexo II Técnicas de análisis.	99
Anexo III Cuestionarios de evaluación sensorial.	107
Anexo IV Diseño de los fermentadores utilizados en la enseñanza de la asignatura de tecnología de fermentaciones alimentarias	111
Anexo V Acervo fotográfico.	115

Lista de figuras

- Figura 1.** Vestimenta de laboratorio recomendada: a) bata; b) lentes protectores; c) cubrebocas; d) mascarilla para manejo de polvos; e) mascarilla para manejo de químicos; f) guante estéril; g) guante para objetos calientes; h) guante para manejo de ácidos; i) zapatos. Estos son ejemplos para ilustrar no importando la marca ni el precio sólo que cumpla con los requisitos de seguridad.
- Figura 2.** Diamante de categorías de riesgo de la Asociación Nacional de Protección contra el Fuego (NFPA).
- Figura 3.** Diagrama de actividades para el desarrollo de la práctica de determinación del efecto de la aireación en la fermentación acética.
- Figura 4.** Cuenta en Cámara de Neubauer
- Figura 5.** Curva estándar de glucosa para la determinación de carbohidratos solubles.
- Figura 6a.** Estructura geométrica, dimensiones y especificaciones para la construcción de un fermentador. Tapa de acero inoxidable T-304, calibre 18.
- Figura 6b.** Estructura geométrica, dimensiones y especificaciones para la construcción de un fermentador. Base de acero inoxidable T-304, calibre 18.
- Figura 6c.** Estructura geométrica, dimensiones y especificaciones para la construcción de un fermentador. Jarra de vidrio Pyrex, de 3 mm de espesor. Capacidad nominal: 1000 mL.
- Figura 7.** Sistema para determinar el flujo de aireación (Fermentación acética).
- Figura 8.** Sistema de muestreo (Fermentación alcohólica).
- Figura 9.** Fotografías de los fermentadores a utilizar en las sesiones prácticas
- Figura 10.** Fotografías del arreglo de los fermentadores para determinar el flujo de aireación para el sistema aerobio (fermentación acética).
- Figura 11.** Fotografías del arreglo de los fermentadores para muestreo e incubación en el sistema aerobio (fermentación acética).
- Figura 12.** Fotografías del arreglo de los fermentadores para muestreo e incubación en el sistema anaerobio (fermentación alcohólica).

Lista de tablas

- Tabla 1.** Pictogramas de peligrosidad. Símbolos que muestran gráficamente el nivel de peligrosidad de la sustancia etiquetada.
- Tabla 2.** Componentes de la salmuera para la fermentación láctica de hortalizas encurtidas.
- Tabla 3.** Niveles de concentración de sal para la fermentación láctica de hortalizas encurtidas.
- Tabla 4.** Niveles de temperatura para la Fermentación Alcohólica
- Tabla 5.** Niveles de aireación para la fermentación acética en medio alcohólico
- Tabla 6.** Preparación de diluciones con varias concentraciones de glucosa para determinar azúcares reductores mediante la técnica reportada por Miller (1959).

Prólogo

Los alimentos fermentados no han dejado de ser un tema importante para la industria alimentaria, se han perfeccionado a través del tiempo desde procesos empíricos de conservación del alimento hasta aquellos llevados a cabo con estricto control. Desde su nacimiento los alimentos fermentados llamaron la atención por aquel “burbujeo” que se presentaba y que resultaba benéfico mejorando el sabor y la percepción para quienes lo consumían.

Actualmente, se somete industrialmente a los alimentos a una fermentación para obtener productos como el yogurt, el vino, la cerveza o las carnes maduradas entre muchos otros. La intención de este manual es que sirva de apoyo a los alumnos que cursen esta asignatura o en general para todos aquellos interesados en las fermentaciones. A pesar de que la tecnología de las fermentaciones alimentarias es sin duda parte esencial en la formación de Ingenieros y Químicos estudiosos de los Alimentos, es importante aclarar que el lenguaje empleado en este documento aunque técnico, aborda los diversos aspectos de la materia de una forma sencilla y clara, pudiendo ser este material didáctico de utilidad a los lectores con otra formación.

Este manual ofrece también al alumno la oportunidad de integrar en la práctica los conocimientos adquiridos en los cursos previos de química analítica, análisis de alimentos, microbiología general, microbiología de alimentos, así como la propia parte teórica de alimentos fermentados, permitiéndole desarrollar los criterios para cubrir la elaboración y el análisis cuantitativo de los diversos productos. Así mismo, le permitirá ubicarse en la situación laboral con la que se ha de encontrar al término de la licenciatura. Es importante desde el punto de vista pedagógico que el alumno lleve a cabo el proceso de ciertos alimentos, ya que es la única forma que tiene para poder vivenciar los problemas que se presenten y desarrollar las habilidades para resolverlos. Se presentan cuatro capítulos que cubren las diversas técnicas de elaboración de productos como herramientas necesarias para que al finalizar su licenciatura los alumnos se desarrollen competitivamente en la industria.

El alumno encontrará una guía integral para la elaboración de las actividades de laboratorio de la unidad de enseñanza aprendizaje (UEA) de Tecnología de las Fermentaciones Alimentarias. El aspecto novedoso e importante del manual, resalta el hecho de ser específico y didáctico en sus temas buscando mantener una vinculación entre la parte práctica con el contenido teórico de la asignatura. De igual forma, se destaca la claridad del objetivo y metodología, donde el trabajo de los alumnos debe ser creativo, crítico y resolutivo. Se incluye un cuestionario de evaluación y la bibliografía correspondiente, así como una guía para la elaboración de informes (reportes).

Cabe mencionar que el curso teórico práctico de Tecnología de las Fermentaciones Alimentarias de la licenciatura de Ingeniería de los Alimentos será una UEA opcional, aprobada en la sesión 340 del Consejo Académico el 28 de octubre de 2011, después de haber sido una UEA obligatoria en la Lic. de Ingeniería de los Alimentos (anteriormente Alimentos Fermentados). Esta UEA se ofrecerá a los alumnos de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud y de las demás divisiones de la Universidad Autónoma Metropolitana e incluso de otras instituciones, mediante programas de movilidad.

Esta obra es el resultado del esfuerzo conjunto de las autoras, que refleja su ánimo y entrega por la docencia, así como su experiencia y pasión en el tema. Las autoras han realizado una extensa aplicación práctica y revisión de textos, discutieron y defendieron sus puntos de vista, no sólo en el ámbito de la docencia, sino en el impacto que tiene esta UEA en nuestros alumnos tanto en la formación académica, como en el ejercicio de su profesión.

Las autoras

Introducción

La fermentación se define desde un punto de vista bioquímico como el proceso de generación de energía en el que los compuestos orgánicos actúan tanto como donadores como aceptores terminales de electrones. Una definición más amplia es la de Microbiología Industrial, cualquier proceso utilizado para la producción de productos mediante cultivo de microorganismos. La cerveza y la producción de disolventes orgánicos pueden ser descritos como fermentaciones en ambos sentidos de la palabra, pero la descripción de un proceso aeróbico como fermentación es obviamente utilizada de una forma más amplia en el contexto microbiológico.



Las fermentaciones comerciales son aquellas que producen: i) biomasa; ii) enzimas microbianas; iii) metabolitos microbianos; iv) productos recombinantes o bien, v) que modifican un compuesto el cual es adicionado a la fermentación como un proceso de transformación. Como ejemplo de las primeras, se encuentra la levadura para consumo humano producida en Alemania durante la Primera Guerra Mundial. Sin embargo, no fue hasta los sesentas que se exploró de manera más profunda su uso como fuente de proteína. En los setentas se realizaron escalamientos pero no pudieron competir con otras fuentes de proteína animal, cerrando en los ochentas. Las enzimas microbianas tienen como principales ventajas el producirse en grandes cantidades, los procesos pueden mejorarse para incrementar los rendimientos, con la tecnología de ADN recombinante es posible expresar enzimas animales en microorganismos, incrementándola productividad mediante inserción de múltiples copias de genes de enzimas en un microorganismo. Durante la etapa de crecimiento (log) los productos son esenciales para el crecimiento de la célula, tales como aminoácidos, nucleótidos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y carbohidratos. Estos productos se denominan productos primarios del metabolismo (metabolitos primarios). La tarea del microbiólogo industrial es la de modificar una cepa salvaje y proporcionar las condiciones de cultivo para aumentar la productividad. Durante la desaceleración y etapa estacionaria algunos cultivos microbianos sintetizan compuestos que no se producen en la etapa de crecimiento y que no tienen aparentemente una función obvia en el metabolismo celular. Estos compuestos se denominan como productos secundarios del metabolismo (metabolitos secundarios). Finalmente, la célula microbiana es utilizada para convertir un compuesto en otro estructuralmente relacionado y que económicamente más rentable de producir, ejemplo producción de vinagre (adicionando etanol a las fermentaciones acéticas) (Stansbury *et al.*, 1999).

Los alimentos fermentados han sido parte fundamental de diversas culturas, siendo clara su importancia primero por alargar la vida de anaquel debido a que se producen ácidos orgánicos, alcoholes y compuestos alcalinos. Segundo, porque modifican y transforman las materias primas en productos de más fácil asimilación, *e.g.* hidrólisis de proteínas y a que destruyen factores antinutricionales. Asimismo, producen compuestos que mejoran el sabor, aroma y textura de los alimentos y los enriquecen ya que se producen vitaminas, se liberan aminoácidos y ácidos grasos.

El objetivo primordial de estas sesiones prácticas es el reforzar el proceso enseñanza–aprendizaje de los conceptos teóricos mediante la realización de cultivos a escala de laboratorio que semejan a los industriales cubriendo diversos aspectos:

- i. Fisiología y cinética microbiana de los procesos más importantes,
- ii. El diseño y manejo de los equipos básicos y técnicas analíticas,
- iii. La obtención de un nuevo alimento mediante cambios producidos durante la fermentación.

El Capítulo I: Medidas de seguridad en el Laboratorio de Tecnología de Fermentaciones Alimentarias ha sido redactado y estructurado de acuerdo a los siguientes documentos oficiales:

Instructivo del funcionamiento interno y operativo para regular el uso de los servicios e instalaciones de los laboratorios de docencia de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud aprobado por el Consejo Académico en la sesión 314 el 9 de noviembre de 2009.

Norma Oficial Mexicana (NOM). NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 (antes NOM-087-ECOL-SSA1-2002). Protección Ambiental - Salud Ambiental - Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos - Clasificación Y Especificaciones De Manejo.

NOM-100-STPS-1994 Seguridad-Extintores contra incendio a base de polvo químico seco con presión contenida-Especificaciones.

NOM-087-ECOL-SSA-2002, Residuos biológico infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.

NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas.

NOM-113-STPS-2009, Seguridad-Equipo de protección personal-Calzado de protección-Clasificación, especificaciones y métodos de prueba.

NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal-Selección, uso y manejo en los centros de trabajo.

NOM-002-STPS-2010, Condiciones de seguridad-Prevención y protección contra incendios en los centros de trabajo.

Ley de Protección Civil para el Distrito Federal Nuevo Ordenamiento (Publicado en la Gaceta Oficial del Distrito Federal el 23 de julio de 2002).

Capítulo 1. Medidas de seguridad en el laboratorio de tecnología de fermentaciones alimentarias

En esta sección se dan a conocer las normas básicas de higiene y seguridad para el laboratorio de tecnología de fermentaciones alimentarias. El conocimiento de las medidas de seguridad y precaución son pre-requisitos indispensables de trabajo en el laboratorio. Las medidas de seguridad que a continuación se describen coadyuvan a reducir los peligros inherentes en el uso de material que, hasta cierto nivel, se puede considerar como potencialmente peligroso. Se espera que todos los alumnos y profesores observen las medidas de seguridad al estar trabajando en el laboratorio. *¡Infórmate!*

*“Existe al menos un rincón del universo que con toda seguridad puedes mejorar, y eres tú mismo.
(Aldous Huxley)*

Objetivo

El alumno conocerá las medidas de seguridad obligatorias en un laboratorio microbiológico y químico señaladas en las Normas Oficiales Mexicanas y en el instructivo del funcionamiento interno y operativo de uso de los servicios e instalaciones de los laboratorios de docencia de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAMI.

Introducción

La seguridad en los laboratorios

¿Qué es la Seguridad?

Es un conjunto de medidas técnicas, educacionales, médicas y psicológicas empleadas para prevenir accidentes, tendientes a eliminar las condiciones inseguras del ambiente y a instruir o convencer a las personas acerca de la necesidad de implementar prácticas preventivas.

El alumno estará obligado a utilizar el llamado equipo de protección personal (EPP) y seguir al pie de la letra las indicaciones dadas por el profesor acerca de cómo preparar reactivos y como llevar a cabo la práctica. El EPP se refiere a los objetos diseñados para proteger a los alumnos y al profesor durante su estancia en el laboratorio, éstos son de uso personal para cada individuo y podrán variar según lo requiera la práctica a realizar.

Normas generales

1. Es importante que antes de la primera sesión práctica en laboratorio se ubiquen las salidas de emergencia, regaderas de seguridad, extintores, lavaojos, botiquín más cercano, así como familiarizarse con el uso adecuado de los mismos.
2. No fumes, comas o bebas en el laboratorio.
3. Guarda tus prendas de abrigo y los objetos personales en los espacios designados para ello y no los dejes nunca sobre la mesa de trabajo. Coloca sobre la mesa sólo los libros y cuadernos que sean necesarios.
4. No llesves bufandas, pañuelos largos ni prendas u objetos que dificulten tu movilidad.
5. El cabello largo debe ser recogido en la parte de atrás de la cabeza para evitar contacto con soluciones, riesgo con mecheros o cultivos microbianos.
6. No apliques cosméticos ni manipules lentes de contacto. Papel, lápices, dedos y cualquier otro objeto deben mantenerse alejados de la boca y ojos.
7. Se debe utilizar bata de algodón perfectamente abotonada y limpia. La bata debe llegar a la rodilla, no se permitirá el uso de filipinas debido a que éstas no ofrecen la protección requerida. Asimismo, se sugiere que la bata sea de color blanco para facilitar la identificación de posibles derrames (Figura 1).

8. Los ojos son particularmente susceptibles de daño permanente por productos corrosivos así como por salpicaduras de partículas. Es obligatorio usar gafas de seguridad siempre que se esté en un laboratorio donde los ojos puedan ser dañados. No lles lentes de contacto en el laboratorio, ya que en caso de accidente, las salpicaduras de productos químicos o sus vapores pueden pasar detrás de las lentes y provocar lesiones en los ojos (Figura 1).
9. Se recomienda el uso de calzado cerrado y suela antiderrapante. El uso de sandalias con calcetines no es apropiado para trabajar en el laboratorio (Figura 1).
10. Mascarilla. Protege las vías respiratorias de polvos y/o vapores tóxicos o corrosivos. Las hay con diferentes filtros, para polvos finos, vapores orgánicos y ácidos (Figura 1).
11. El uso de pantalones cortos o falda; así como de calzado descubierto no está permitido dentro del laboratorio cuando se esté trabajando con los siguientes materiales:
 - a. Material potencialmente infeccioso
 - b. Material reactivo o corrosivo
 - c. Material tóxico que puede ser absorbido por la piel
12. Procura no andar de un lado para otro sin motivo y, sobre todo, no corras dentro del laboratorio.
13. Mantén el área de trabajo limpia y ordenada.
14. Ten siempre tus manos limpias y secas.
15. Cualquier tipo de herida y abrasión debe ser cubierta para prevenir infecciones.
16. No pruebes ni ingieras los productos a menos que te lo indique el profesor.
17. **Recuerda que debes de actuar responsablemente.**
18. Trabaja sin prisas, pensando en cada momento lo que estás haciendo, y con el material y reactivos ordenados.
19. No se debe gastar bromas, correr, jugar, empujar, hablar por celular, recibir visitantes en el laboratorio y toda acción que te distraiga.
20. En caso de producirse un accidente, quemadura o lesión, comunícalo inmediatamente al profesor.
21. Al acabar la práctica, limpia y ordena el material utilizado.



Figura 1. Vestimenta de laboratorio recomendada: a) bata; b) lentes protectores; c) cubrebocas; d) mascarilla para manejo de polvos; e) mascarilla para manejo de químicos; f) guante estéril; g) guante para objetos calientes; h) guante para manejo de ácidos; i) zapatos (NOM-005-STPS-1998, NOM-113-STPS-2009, NOM-017-STPS-2008). Estos son ejemplos para ilustrar no importando la marca ni el precio sólo que cumpla con los requisitos de seguridad.

Normas para manipular instrumentos, compuestos químicos, agentes biológicos y productos

1. Trabaja en una campana de extracción.
2. Antes de manipular un aparato o montaje eléctrico, desconéctalo de la red eléctrica.
3. No pongas en funcionamiento un circuito eléctrico sin que el profesor haya revisado la instalación.
4. No utilices ninguna herramienta o máquina sin conocer su uso, funcionamiento y normas de seguridad específicas.
5. Maneja con especial cuidado el material frágil, por ejemplo, el vidrio.
6. Informa al profesor del material roto o averiado.
7. Lee las etiquetas de seguridad. En las etiquetas de algunos reactivos pueden encontrarse 1 ó 2 de los pictogramas (Tabla 1) y frases que informan sobre su peligrosidad, uso correcto y las medidas a tomar en caso de ingestión, inhalación, etc. Algunos aparatos pueden contener información del mismo tipo. Lee siempre detenidamente esta información y ten en cuenta las especificaciones que se señalan en ella.

8. Lávate las manos con jabón después de tocar cualquier producto químico.
9. Si te salpicas accidentalmente, lava la zona afectada con agua abundante. Si salpicas la mesa, límpiala con agua y sécala después con un paño.
10. Evita el contacto con fuentes de calor. No manipules cerca de ellas sustancias inflamables. Para sujetar el instrumental de vidrio y retirarlo del fuego, utiliza pinzas.
11. No transportes innecesariamente los reactivos de un sitio a otro del laboratorio. Las botellas se transportan siempre tomándolas por el fondo, nunca del tapón.
12. Cuando calientes los tubos de ensayo o se realicen análisis químicos utiliza las pinzas, procura darles cierta inclinación. Nunca mires directamente al interior del tubo por su abertura ni dirijas esta hacia algún compañero. Los tubos no deben ser tomados por las tapas y no deben ser agitados violentamente. En caso de utilizar el vórtex, sostener el tubo y la tapa simultáneamente.
13. No uses vidrio agrietado.
14. Todos los productos inflamables deben almacenarse en un lugar adecuado y separados de los ácidos, las bases y los reactivos oxidantes.
15. Los ácidos y las bases fuertes han de manejarse con mucha precaución, ya que la mayoría son corrosivos y, si caen sobre la piel o la ropa, pueden producir heridas y quemaduras importantes.
16. Si tienes que mezclar algún ácido (por ejemplo, ácido sulfúrico) con agua, añade el ácido sobre el agua, nunca al contrario, pues el ácido «saltaría» y podría provocarte quemaduras en la cara y los ojos.
17. No dejes destapados los frascos ni aspire su contenido. Muchas sustancias líquidas (alcohol, éter, cloroformo, amoníaco) emiten vapores tóxicos.
18. No pipetear o tocar cualquier tipo de material con la boca. Se deben utilizar bulbos de seguridad o pro-pipetas adecuadas al volumen de trabajo. Cuando se utilicen pipetas automáticas, asegurarse de desechar las puntas en los contenedores apropiados dispuestos por la coordinación de laboratorios.
19. Se deben utilizar guantes durante la manipulación de material tóxico o corrosivo y se deben desechar adecuadamente antes de tocar materiales comunes como tapones, tubos, manijas, etc.
20. Se deben utilizar los desinfectantes indicados por el profesor cuando sea necesario.
21. Es necesario lavarse las manos con jabón y utilizar gel sanitizante al inicio y al final de la sesión de laboratorio; así como al terminar de manipular cualquier tipo de cultivo o material que pueda estar contaminado.
22. La superficie de trabajo debe ser desinfectada (e.g. fenol 5% (p/v); benzal 5% (v/v), cloro 5% (p/v)) antes de empezar a trabajar y al término de la sesión de trabajo, así como en caso de algún derrame de material infeccioso.
23. Las asas de inoculación utilizada para transferir cultivos deben ser esterilizadas por flameado al rojo vivo antes y después de cada uso. Se debe flamear el asa de manera vertical. Si el alambre se encuentra cubierto con material viscoso, es necesario secar al lado de la flama antes de esterilizar, para evitar la formación de aerosoles que puedan contaminar a quien este manipulando el material y a los compañeros que se encuentren cerca. Los mecheros deben permanecer apagados cuando no estén en uso.
24. Los derrames deben ser reportados inmediatamente al profesor responsable a la brevedad posible.
25. En caso de derrames de cultivos bacterianos, se debe proceder como sigue:
 - a. Informar al profesor responsable
 - b. Ponerse guantes de neopreno
 - c. Adicionar un volumen, igual al del derrame, de cloro o del desinfectante de superficies
 - d. Esperar 5 minutos para que las soluciones se mezclen

- e. Limpiar el derrame con toallas absorbentes, procurando el mínimo contacto con la solución contaminada
 - f. Desechar el material dentro de una bolsa o contenedor esterilizable.
 - g. Desechar los guantes y lavarse las manos con abundante agua y jabón y posteriormente utilizar gel desinfectante.
26. Todos los desechos sólidos y líquidos contaminados como cajas de Petri, difusiones, caldos de cultivo y puntas de pipeta deben ser esterilizados en autoclave antes de ser desechados en los contenedores dispuestos por la coordinación de laboratorios. Es importante desechar el material biológico siguiendo las indicaciones del profesor para evitar que el personal que manipula los desechos se contamine.
 27. Los productos químicos tóxicos se tirarán en contenedores especiales para este fin. No tires directamente al fregadero productos que reaccionen con el agua sodio, hidruros, amiduros, halogenuros de ácido), o que sean inflamables (disolventes), o que huelan mal (derivados de azufre), o que sean lacrimógenos (halogenuros de benzilo, halocetonas), o productos que sean difícilmente biodegradables (polihalogenados: cloroformo). Las sustancias líquidas o las disoluciones que puedan verterse al fregadero, se diluirán previamente, sobre todo si se trata de ácidos y de bases.
 28. No tires al fregadero productos o residuos sólidos que puedan atascarlo. En estos casos deposita los residuos en recipientes adecuados.
 29. Nunca fuerces un tubo de vidrio cerrado ya que puede romperse y cortarte utiliza guantes. En caso de que se rompa algún material de vidrio, notificar al profesor y desechar en los contenedores adecuados para evitar la posibilidad de accidentes por cortaduras o astillamientos.
 30. Si el fuego es pequeño y localizado, apagarlo utilizando un extintor adecuado, arena, o cubriendo el fuego con un recipiente de tamaño adecuado que lo ahogue. Retirar los productos químicos inflamables que estén cerca del fuego. No utilices nunca agua para extinguir un fuego provocado por la inflamación de un disolvente.
 31. Si el fuego es grande aísla el fuego utilizando los extintores adecuados. Si el fuego no se puede controlar rápidamente, accionad la alarma de fuego, avisara todos los compañeros de trabajo sin que se extienda el pánico y conservando siempre la calma y evacuar el edificio por la salida principal o por la salida de emergencia.
 32. Si se te incendia la ropa, grita inmediatamente para pedir ayuda. Estírate en el suelo y rueda sobre ti mismo para apagar las llamas. No corras ni intentes llegar a la ducha de seguridad si no está muy cerca de ti.
 33. Es tu responsabilidad ayudar a alguien que se esté quemando. Cúbrele con una manta antifuego, condúcele hasta la ducha de seguridad, si está cerca, o hazle rodar por el suelo.
 34. No utilices nunca un extintor sobre una persona.
 35. Una vez apagado el fuego, mantén a la persona tendida, procurando que no se enfríe y proporciónale asistencia médica.

Tabla 1. Pictogramas de peligrosidad. Símbolos que muestran gráficamente el nivel de peligrosidad de la sustancia etiquetada.

 <p>Corrosivo Corrosive Corrosif</p> <p>C</p>	<p>Corrosivos: las sustancias y preparados que, en contacto con tejidos vivos, puedan ejercer una acción destructiva de los mismos.</p>
 <p>Irritante Irritant Irritant</p> <p>Xi</p>	<p>Irritantes: las sustancias y preparados no corrosivos que, por contacto breve, prolongado o repetido con la piel o las mucosas puedan provocar una reacción inflamatoria.</p>
 <p>Tóxico Toxic Toxique</p> <p>T</p>	<p>Tóxicos: la sustancias y preparados que, por inhalación, ingestión o penetración cutánea en pequeñas cantidades puedan provocar efectos agudos o crónicos, o incluso la muerte.</p>
 <p>Muy Tóxico Very Toxic Très Toxique</p> <p>T+</p>	<p>Muy tóxicos: las sustancias y preparados que, por inhalación, ingestión o penetración cutánea en muy pequeña cantidad puedan provocar efectos agudos o crónicos o incluso la muerte.</p>
 <p>Inflamable Flammable Inflammable</p> <p>F</p>	<p>Inflamables: las sustancias y preparados líquidos cuyo punto de ignición sea bajo.</p> <p>Identifica a aquellas sustancias que se inflaman por un contacto breve con una fuente de ignición y después de haberse separado de dicha fuente de ignición continúan quemándose.</p> <p>Fácilmente inflamables:</p> <ul style="list-style-type: none"> • las sustancias y preparados que puedan calentarse e inflamarse en el aire a temperatura ambiente sin aporte de energía, o • sólidos que puedan inflamarse fácilmente tras un breve contacto con una fuente de inflamación y que sigan quemándose o consumiéndose una vez retirada dicha fuente, o • en estado líquido cuyo punto de inflamación sea muy bajo, o • que, en contacto con agua o con aire húmedo, desprendan gases extremadamente inflamables en cantidades peligrosas.

Tabla 1. Pictogramas de peligrosidad. Símbolos que muestran gráficamente el nivel de peligrosidad de la sustancia etiquetada (continuación).

 <p>Extremadamente Inflamable Extremely Flammable Extrêmement Inflammable F+</p>	<p>Extremadamente inflamables: las sustancias y preparados líquidos que tengan un punto de inflamación extremadamente bajo y un punto de ebullición bajo, y las sustancias y preparados gaseosos que, a temperatura y presión normales, sean inflamables en el aire.</p> <p>Identifica a aquellas sustancias que a temperatura ambiente y en contacto con el aire arden espontáneamente.</p>
 <p>Explosivo Explosive Explosible E</p>	<p>Explosivos: las sustancias y preparados sólidos, líquidos, pastosos o gelatinosos que, incluso en ausencia de oxígeno del aire, puedan reaccionar de forma exotérmica con rápida formación de gases y que, en condiciones de ensayo determinadas, detonan, deflagran rápidamente o, bajo el efecto del calor, en caso de confinamiento parcial, explotan.</p> <p><i>Identifica a aquellas sustancias que pueden hacer explosión por efecto de una llama, choque o fricción.</i></p>
 <p>Comburente Oxidising Comburant O</p>	<p>Comburentes: las sustancias y preparados que, en contacto con otras sustancias, en especial con sustancias inflamables, produzcan una reacción fuertemente exotérmica.</p>
 <p>Nocivo Harmful Nooil Xn</p>	<p>Nocivos: las sustancias y preparados que, por inhalación, ingestión o penetración cutánea puedan provocar efectos agudos o crónicos, o incluso la muerte.</p>
 <p>Peligroso para el Medio Ambiente N</p>	<p>Peligrosos para el medio ambiente: las sustancias o preparados que, en caso de contacto con el medio ambiente, presenten o puedan presentar un peligro inmediato o futuro para uno o más componentes del medio ambiente.</p>

Símbolos de riesgo (<http://www.anb.cl/bibliote/PRIMAP.pdf>)

Existen diversos sistemas convencionales para determinar los riesgos de las sustancias químicas, los más usuales son:

- i. Número de riesgo de la Organización de Naciones Unidas (ONU)
- ii. Diamante de la Asociación Nacional de Protección contra el Fuego (National Fire Protection Association NFPA).
- iii. Sistema del Departamento de Transporte de los Estados Unidos (DOT).
- iv. Códigos de riesgo de empresas fabricantes de reactivos químicos, como Merck y Baker.

De los sistemas anteriores el que más común es el de NFPA (Figura 2), este se basa en un diamante que representa visualmente la información sobre tres categorías de riesgo: salud, inflamabilidad y reactividad; identificadas y clasificadas en una escala del 0 al 4, dependiendo del grado de peligro que presenten. Adicionalmente representa el nivel de gravedad de cada uno, señala además, dos riesgos especiales: reacción con el agua y poder oxidante.

Reactivos químicos en el laboratorio

Grados o Calidades

De acuerdo a su uso, pureza y residuos los reactivos se clasifican en varios grados.

- i. Grado técnico o comercial

Su calidad no está garantizada y por ello no se utilizan para análisis químico, pueden usarse en experimentos cualitativos donde no se requiere cuantificar ni obtener resultados exactos.

- ii. Grado USP (United States Pharmacopeia)

Cumplen con las especificaciones que exigen las norma de Estados Unidos en cuanto a contenidos máximos de contaminantes dañinos a la salud. Pueden contener contaminantes no peligrosos, pero que interfieren en determinados procesos analíticos por lo que su uso no es aconsejable para estos propósitos.

- iii. Grado reactivo

Estas sustancias cumplen las especificaciones del Comité de Reactivos Químicos de la Sociedad Química Americana (Reagent Chemical Committee of the American Chemical Society) y son los indicados para el trabajo analítico.

Se identifican por las siglas en inglés ACS que aparecen en la etiqueta, la cual además declara el porcentaje máximo de impurezas permitido por dicha entidad internacional, así como el porcentaje de las impurezas que contiene.

- iv. Grado estándar primario

Son de alta pureza, se emplean como patrones primarios en la preparación de soluciones estándares.

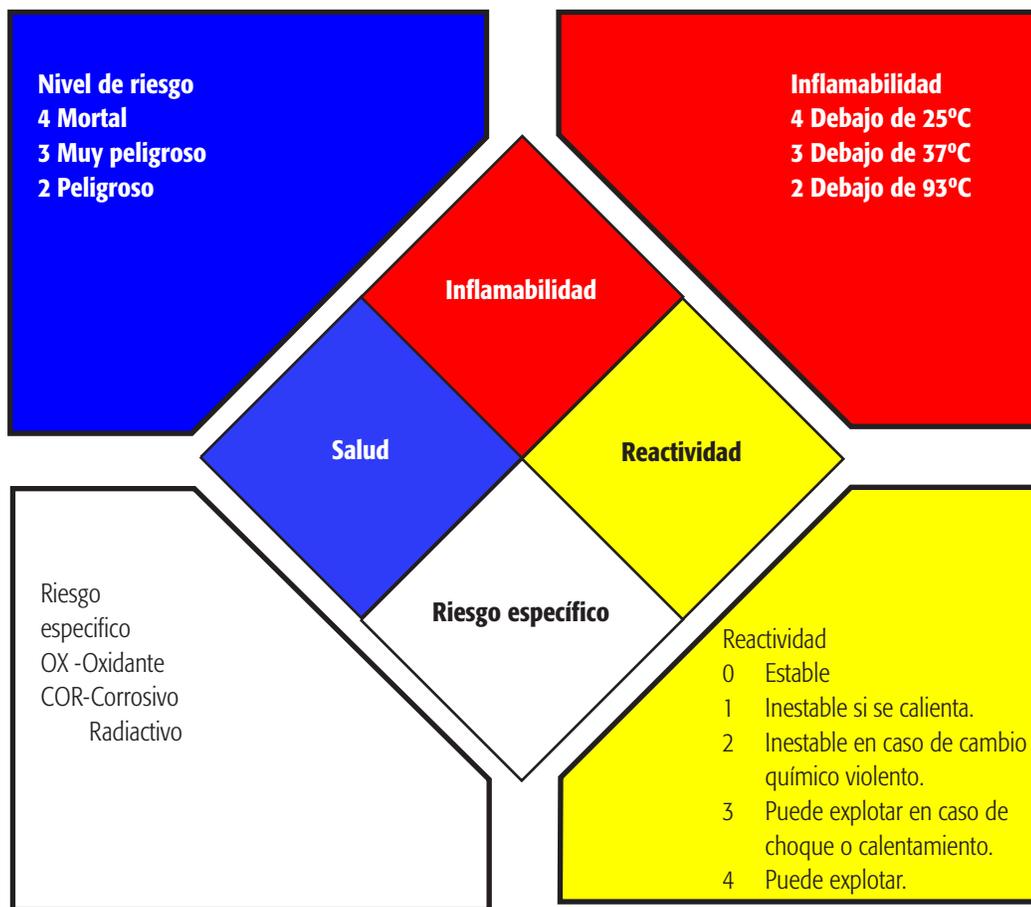


Figura 2. Diamante de categorías de riesgo de la Asociación Nacional de Protección contra el Fuego (NFPA).

¿Qué hacer en caso de accidente? Primeros auxilios

Los accidentes más frecuentes en un laboratorio son: cortes y heridas, quemaduras o corrosiones, salpicaduras en los ojos e ingestión de productos químicos:

1. Cortes y heridas.

Lavar la parte del cuerpo afectada con agua y jabón. No importa dejar sangrar, algo la herida, pues ello contribuye a evitar la infección. Aplicar después agua oxigenada y cubrir con gasa, algodón y sujetar con venda. Si persiste la hemorragia o han quedado restos de objetos extraños (e.g. trozos de vidrio), se acudirá a urgencias médicas.

2. Quemaduras o corrosiones.

- Por fuego u objetos calientes. **No lavar la lesión con agua.** Tratarla con disolución acuosa o alcohólica muy diluida de ácido pícrico (al 1 %(p/v)) o pomada especial para quemaduras y vendar.
- Por ácidos, en la piel. Cortar lo más rápidamente posible la ropa empapada por el ácido. Echar abundante agua a la parte afectada. Neutralizar la acidez de la piel con disolución de bicarbonato de sodio al 1% (p/v) (si se trata de ácido nítrico, utilizar disolución de bórax al 2%(p/v)). Después vendar.
- Por álcalis, en la piel. Aplicar agua abundante y aclarar con ácido bórico, disolución al 2 %(p/v) o ácido acético al 1 %(v/v). Después secar, cubrir la parte afectada con pomada y vendar.
- Por otros productos químicos. En general, lavar bien con agua y jabón.

3. Salpicaduras en los ojos.
 - a) Por ácidos. Inmediatamente después del accidente irrigar los dos ojos con grandes cantidades de agua templada de ser posible. Mantener los ojos abiertos, de tal modo que el agua penetre debajo de los párpados. Continuar con la irrigación por lo menos durante 15 minutos. A continuación lavar los ojos con disolución de bicarbonato de sodio al 1 % (p/v) con ayuda de lavajos, renovando la disolución dos o tres veces, dejando por último en contacto durante 5 minutos.
 - b) Por álcalis. Inmediatamente después del accidente irrigar los dos ojos con grandes cantidades de agua, templada de ser posible. Mantener los ojos abiertos, de tal modo que el agua penetre debajo de los párpados. Continuar con la irrigación por lo menos durante 15 minutos. A continuación lavar los ojos con disolución de ácido bórico al 1 % (p/v) con ayuda de la bañera ocular, renovando la disolución dos o tres veces, dejando por último en contacto durante 5 minutos.
4. Ingestión de productos químicos.
 - a) Antes de cualquier actuación concreta: **REQUERIMIENTO URGENTE DE ATENCIÓN MÉDICA**. Retirar el agente nocivo del contacto con el paciente. No darle a ingerir nada por la boca ni inducirlo al vómito.
 - b) Ácidos corrosivos. No provocar jamás el vómito. Administrar leche de magnesia (óxido de magnesio en agua) en grandes cantidades. Administrar grandes cantidades de leche.
 - c) Álcalis corrosivos. No provocar jamás el vómito. Administrar abundantes tragos de disolución de ácido acético al 1 % (v/v). Administrar grandes cantidades de leche.
 - d) Arsénico y sus compuestos. Provocar el vómito introduciendo los dedos en la boca del paciente hasta tocarle la campanilla. A cada vómito darle abundantes tragos de agua salada templada. Administrar 1 vaso de agua templada con 2 cucharadas soperas (no más de 30 g) de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ o 2 cucharadas soperas de leche de magnesia.
 - e) Mercurio y sus compuestos. Administrar de 2 a 4 vasos de agua inmediatamente. Provocar el vómito introduciendo los dedos en la boca del paciente hasta tocarle la campanilla. A cada vómito darle abundantes tragos de agua salada templada. Administrar 15 g de antídoto universal en medio vaso de agua templada. El antídoto universal es una mezcla de carbón activado dos partes, óxido de magnesio 1 parte, ácido tánico 1 parte). Administrar 1/4 L de leche.
 - f) Plomo y sus compuestos. Administrar 1 vaso de agua templada con dos cucharadas soperas (no más de 30 g) de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ó 2 cucharadas soperas de leche de magnesia. Administrar de 2 a 4 vasos de agua inmediatamente. Provocar el vómito introduciendo los dedos en la boca del paciente hasta tocarle la campanilla. Administrar 15 g de ANTÍDOTO UNIVERSAL en medio vaso de agua templada.

Incendios y catástrofes naturales

1. Los servicios de incendios y de otro tipo planes de preparación para emergencias.
2. Estar informados de las áreas que contienen material potencialmente infeccioso.
3. Es conveniente que estos servicios visiten las instalaciones del laboratorio para conocer su distribución y su contenido.
4. Después de una catástrofe natural, se informará a los servicios de emergencias locales o nacionales de los riesgos existentes dentro del edificio, el laboratorio y proximidades.
5. El personal de esos servicios sólo deberá entrar acompañado por un trabajador capacitado del laboratorio.
6. El material infeccioso será recogido en cajas impermeables o bolsas desechables fuertes.
7. El personal de seguridad determinará el material que podrá recuperarse o eliminarse.

¿Qué hacer en caso de sismos?

1. Mantener la calma.
2. Apagar el equipo eléctrico.
3. Evitar perder tiempo reuniendo las pertenencias personales.
4. Evitar correr y gritar.
5. Seguir las rutas de evacuación.
6. Buscar salir del edificio a una zona segura considerando evitar los ventanales, cables de corriente eléctrica, transformadores y flujo vehicular cercanos.
7. Encender el radio a fin de informarse sobre la magnitud del evento y sus consecuencias.
8. Comunicarse con sus familiares para conocer su estado.

¿Para qué funciona la alerta sísmica?

1. Se activa automáticamente cuando las estaciones instaladas en la costa de Guerrero detectan el inicio de un sismo y envían la señal o manualmente para hacer simulacros.
2. Funciona para que las personas dispongan de 50 segundos antes de sentir el temblor para iniciar los procedimientos y acciones de seguridad convenientes.

Cuestionario

Antes de salir del laboratorio, asegúrate de los siguientes puntos:

- | | SI | NO |
|--|----|----|
| ¿Todos los cultivos y material contaminante fueron esterilizados en autoclave y desechados apropiadamente? | | |
| ¿Se removieron todas las etiquetas de los tubos y matraces utilizados? | | |
| ¿Todo el material que quedó en las estufas, refrigeradores y gavetas está rotulado correctamente? | | |
| ¿Se cerraron las llaves del gas y agua correctamente y se apagó la luz? | | |
| ¿Se limpiaron adecuadamente todos los equipos utilizados antes de ser entregados? | | |
| ¿Se dispuso adecuadamente de los residuos químicos y/o biológicos generados durante la práctica? | | |
| ¿Se limpió y secó cualquier derrame de agua o manchas de la mesa de trabajo, piso y tarjas? | | |
| ¿Se desinfectó la mesa y superficies de trabajo? | | |
| ¿Te lavaste y desinfectaste las manos? | | |

Si la respuesta a alguna de estas preguntas fue NO realiza la acción correctiva

Capítulo 2. Fermentación láctica en sustratos vegetales



Hortalizas

Práctica 1

Determinación del efecto de la concentración de sal en la fermentación láctica de hortalizas encurtidas

“La lectura es como el alimento; el provecho no está en proporción de lo que se come, sino de lo que se digiere.”

(Jaime Luciano Balmes)



Lactobacillus plantarum



Sal

Objetivo

El alumno identificará el efecto de la concentración de sal en la conservación de las hortalizas mediante fermentación láctica.

Introducción

En diversas culturas se consumen vegetales fermentados a base de col, rábanos, pepinillos, nabos y remolachas. En China el consumo de estos productos data desde el tercer siglo A.C. su origen surge de la necesidad de alargar la vida de anaquel de los vegetales, siendo las bacterias lácticas las responsables de esta acción (Liu *et al.*, 2011). La adición de sal es indispensable para llevar a cabo el proceso de fermentación. La sal ayuda a que los alimentos pierdan agua por presión osmótica favoreciendo su conservación e inhibiendo el desarrollo de microorganismos indeseables. La sal penetra a los tejidos vegetales y salen carbohidratos, compuestos nitrogenados, minerales y otras sustancias que son utilizadas durante la fermentación (Willey *et al.*, 2008). En la salmuera se desarrolla una microbiota mixta de la que predominan las bacterias lácticas. Éstas acidifican el medio y bajan el pH lo suficiente para prevenir el desarrollo de microorganismos patógenos y alteradores sin descomponer celulosa o proteína. Las bacterias lácticas producen metabolitos que mejoran considerablemente el sabor tales como ácidos láctico, acético y propiónico, así como diacetilo (Axelsson, 2004). La fermentación también mejora la calidad nutricional de los alimentos incrementando la digestibilidad y eliminando compuestos tóxicos. Recientemente se ha informado que las bacterias lácticas producen compuestos con efectos benéficos para la salud humana. Así pues, el ácido láctico puede mejorar la asimilación de calcio, hierro, fósforo y vitamina D; alta actividad de lactasas que degradan lactosa a galactosa, esta última es constituyente de cerebrósidos que promueven el desarrollo del cerebro en infantes. Algunas cepas de bacterias lácticas pueden colonizar el intestino de humanos y animales coadyuvando a la digestión debido a que mejoran la microcirculación en el tracto gastrointestinal, la función inmune, controla los niveles séricos de colesterol, reduce infecciones intestinales y elimina sustancias nocivas del organismo (Lichtenstein y Goldin, 2004).

Las bacterias lácticas se encuentran en baja proporción (2 a 4 log ufc/g) en la microbiota autóctona de vegetales. Este grupo puede fortalecerse con una apropiada inoculación. Los géneros más comúnmente encontrados son *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* (Di Cagno *et al.*, 2013). Se ha descubierto que las bacterias lácticas aisladas de vegetales son más resistentes a jugos gástricos y bilis que las derivadas de fuentes animales (Higashikawa *et al.*, 2010). Por lo que estas bacterias son una fuente promisoría de probióticos para consumo humano.

Otros grupos bacterianos pueden encontrarse como *Pseudomonas*, enterobacterias (incluyendo coliformes fecales), cori-neiformes y estafilococos coagulasa-positivos. Los patógenos normalmente se encuentran en baja densidad celular a menos de que se haya empleado agua contaminada durante su procesamiento (Di Cagno *et al.*, 2013).

En la última etapa del proceso aparecen bajas concentraciones de levaduras fermentativas. Las levaduras aerobias son indeseables porque forman películas en la superficie, disminuyen la acidez y deterioran el producto. Se evita su desarrollo cubriendo la superficie de la salmuera con plástico.

Materiales y Equipos

Materiales de Casa	Equipos
1 charola profunda 4 frascos de 120 mL de capacidad nominal con tapa de rosca 1 frasco de vidrio de 3.5 L (1 galón), con tapón de rosca. 1 recipiente metálico de 15-20 cm de altitud y 18-22 cm de diámetro. 2 kg de hortalizas (chiles jalapeños, calabacitas, cebollas de cambray) Algodón Cerillos o encendedor Cinta adhesiva de enmascarar (masking tape) Cuaderno de registros Detergente Papel aluminio Papel sanitario Papel estraza Bolígrafo Marcador negro, o azul o verde Reloj Cubrebocas Tela pañalina Tijeras 1 lienzo de franela o algodón Plástico (película de polietileno)	Autoclave Balanza granataria Balanza con capacidad para 2 kg, digital Campana de extracción de humos Parrillas de agitación y calentamiento electrorregulables Potenciómetro Refrigerador Salómetro
Materiales	Reactivos
1 asa bacteriológica 1 barra de agitación magnética 2 espátulas pequeñas de acero inoxidable 1 mechero Fisher con manguera 1 mechero bunsen con manguera 1 piceta 1 pinzas para crisol 2 pipetas graduadas de 1 mL 5 pipetas graduadas de 10 mL 1 probeta de 250 mL 1 probeta de 2000 mL 1 vaso de precipitados de 2000 mL 4 tubos de cultivo medianos con tapón roscado 1 pinzas para crisol 2 tubos en T de vidrio con manguera 6 vasos de precipitados de 50 mL	Ácido acético concentrado Agua destilada o desionizada Glucosa NaCl Soluciones amortiguadoras de referencia, pH 4.0 y 7.0 Fenol H_2SO_4 NaOH

Procedimiento

Para preparar los encurtidos vegetales se añade sal directamente a las hortalizas foliares (col, brócoli, etc.) en una concentración entre 2.5 -3% (p/v), y se espera a que se libere agua de ellas para formar una salmuera. Si las hortalizas son frutos, raíces o tallos, éstas se sumergen en una salmuera preparada con antelación, en un rango de concentración de NaCl que fluctúa entre 7 - 16%(p/v), y considerando generalmente una relación en peso entre NaCl/hortaliza de 9:100. Para expresar la concentración de NaCl en la salmuera a 20°C se usan los *grados salinos*, considerando equivalencia de la ecuación 1 (Willey *et al.*, 2008):

$$^{\circ}\text{S} = 0.265 \% \text{ NaCl} \quad (1)$$

Otro método para determinar la cantidad de NaCl es por titulación con nitrato de plata (Anexo II).

En esta práctica se evaluarán dos niveles de concentración de sal en la fermentación láctica dentro del intervalo normal que se utilice en la industria de elaboración de hortalizas encurtidas. Cada equipo de alumnos preparará su salmuera, sus vegetales y el inóculo. Después, llevará a cabo una fermentación de 3 a 4 semanas, muestreando y realizando los análisis semanalmente. Después de realizar los cálculos, se compararán los resultados de dos equipos, cada uno con la misma hortaliza y con un nivel diferente de concentración de salmuera. Cada equipo presentará un informe con los resultados de ambos equipos y su discusión. Los resultados se discutirán en una sesión global.

1. Preparación de cultivos iniciadores

Lactobacillus plantarum (Cultivo de la colección NRRL B (Northern Regional Research Laboratory USDA, USA))

1. Se inocularán con 2 a 3 asadas de *L. plantarum* en 50 mL de caldo MRS (Anexo I) en un matraz Erlenmeyer de 100 mL.
 2. Se incubará a 30°C durante 1 día.
2. Preparación de materiales de muestreo
1. Se colocan 4 pipetas graduadas de 10 mL en un cilindro y se esterilizan.
 2. En casa se hierven en baño maría los frascos de muestreo (120 mL), durante 30 min. Después se retiran del agua con precaución, se escurren, se cierran y se dejan enfriar lentamente. En el laboratorio se lava cuidadosamente un frasco de vidrio de 3.5 L con su tapa, dando un último enjuague con agua destilada, se deja secar y se cierra.

3. Preparación de la salmuera

1. La base de cálculo para todos los componentes de la salmuera indicados en la Tabla 2 será un volumen de 1500 mL. Se vierten aproximadamente 1200 mL de agua destilada en un vaso de precipitados de 2 L. Se añaden sales de mesa y glucosa, calculadas para 1500 mL. Las soluciones se mezclan con un agitador magnético sobre una parrilla eléctrica.
2. El pH de la salmuera se ajusta a 5.0 con soluciones de H₂SO₄ o NaOH 0.1 N, con ayuda de un potenciómetro, calibrado previamente.
3. Se mide el volumen de la salmuera con una probeta, se ajusta con agua destilada a un volumen de 1470 mL y se regresa al vaso. Esta salmuera debe prepararse el mismo día de la fermentación. Los componentes de la salmuera se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Componentes de la salmuera para la fermentación láctica de hortalizas encurtidas

Componentes	Concentración inicial	Ajuste de concentración a la 1ª semana
NaCl (°S)	15 ó 30	22.5 o 45
Glucosa%(p/v)	0.5	
Inóculo % (p/v)	2.0	

4. Preparación de las hortalizas

1. Se utiliza un solo tipo de hortaliza para dos equipos. De un peso inicial de 1.5 kg se seleccionan los mejores ejemplares maduros y frescos. Pueden emplearse chiles jalapeños, calabacitas, cebollas de cambrey, etc. Las hortalizas se preparan dependiendo del tipo: a los chiles, calabacitas y cebollas se les cortan los pedúnculos con un cuchillo; los nopales se hierven durante 5 min. Se lavan las hortalizas en un escurridor de plástico. Para cada fermentador se utilizan 1.2 kg de hortalizas preparadas.

5. Fermentación

1. Se proponen dos niveles para evaluar el efecto de la concentración de sal en esta fermentación láctica con *Lactobacillus plantarum*, de acuerdo a la Tabla 3.
2. Se adiciona el inóculo (2% (v/v) de 1500 mL) a la salmuera que está en el vaso en una zona aséptica, utilizando una pipeta estéril, se mezcla con un agitador magnético.
3. Las hortalizas (1.2 kg) se acomodan en el interior del frasco sin salmuera, se adicionan los 1500 mL de salmuera inoculada al frasco fermentador sobre las hortalizas. Inmediatamente después se toma una alícuota de 15 mL con otra pipeta estéril, en condiciones asépticas, la cual se va a analizar el mismo día. Se debe anotar la fecha y hora del inicio de la fermentación.
4. Se corta un círculo de una película de polietileno, cuyo perímetro exceda aproximadamente 10 cm al perímetro del frasco. Con este se cubre la superficie del líquido, tocándola y sin dejar burbujas de aire. Sobre el plástico se colocan de 8 a 10 canicas de vidrio, a fin de garantizar que ésta no se levante con el gas que se formará posteriormente. La superficie del líquido nunca debe quedar expuesta al aire porque ahí se formarán biopelículas (nata). Después se tapa el frasco con la tapa de rosca, sin apretar.
5. Los fermentadores se mantienen a temperatura ambiente durante un período de 2 semanas.
6. Se toma una muestra cada semana para lo cual se transporta el fermentador con cuidado a una zona limpia; ahí se abre el frasco, se retira la película plástica que se lavará previamente antes de volver a colocarse en el fermentador.
 - a. Si se observa una nata superficial, ésta se retira con una espátula limpia y se realiza un frotis.
7. Después, se vacía la salmuera en una probeta de 2 L para medir el volumen y se regresa al vaso de 2 L. Se retira una alícuota de 15 mL con una pipeta estéril, para realizar los análisis el mismo día.
8. Posteriormente, se vierten 250 mL de salmuera a una probeta de vidrio de esa capacidad, se introduce un salómetro y se sigue el procedimiento indicado en el Anexo II para la medición del grado salino. El contenido de esa probeta se regresa luego al vaso de precipitados que contiene el resto de la salmuera.
9. Se añade la cantidad de sal calculada para incrementar el grado salino al valor que le corresponda (Tabla 3). La sal se mezcla con un agitador magnético y una parrilla eléctrica. Después se regresa la salmuera al fermentador, se colocan la película plástica limpia y las canicas recién lavadas en la superficie. Finalmente, se tapa el frasco y se deja en reposo a temperatura ambiente.

Tabla 3. Niveles de concentración de sal para la fermentación láctica de hortalizas encurtidas

No. Fermentador	Concentración inicial de sal (°S)*	Concentración final de sal (°S)*
1	15	30
2	30	60

* 1 grado salino (°S) = NaCl 0.265 % (p/v)

10. La concentración de sal en la salmuera se incrementará al doble de la concentración inicial a la primera semana, para favorecer la actividad de *Lactobacillus plantarum*. Durante el reposo de 2 semanas, la salmuera se diluye porque la hortaliza libera agua por lo que cada semana debe medirse la concentración salina y ajustarla al nivel deseado.

6. Análisis de muestras

1. Los siguientes análisis se realizan en las muestras de 15 mL de salmuera el mismo día de cada muestreo:
 - a. Morfología de los diversos grupos microbianos con tinción de Gram de frotis elaborados de la salmuera y de la nata superficial (si se formó).

- b. pH y determinación de acidez titulable (expresada como ácido láctico) con solución de NaOH 0.05N.
- c. Análisis de cloruro de sodio en las salmueras por titulación con nitrato de plata.

Los análisis se realizan de acuerdo a las técnicas que se presentan en los Anexos II y III.

7. Evaluación sensorial de los productos

1. Consiste en la degustación del producto elaborado y uno comercial entre los integrantes de todos los equipo y se realizará una encuesta con escala hedónica para su evaluación o se complementará una ficha de cata (Anexo III).

8. Elaboración del reporte

1. Realizar un diagrama de flujo del proceso de elaboración de hortalizas encurtidas.
 1. Tablas de resultados
 - a. Tabla de resultados 1. Evaluación sensorial de los productos
 - b. Tabla de resultados 2. Anotar la morfología microscópica de los diversos grupos microbianos observados en las muestras de salmuera y las de nata de cada fermentador. También se mencionará en otra columna el orden de abundancia de cada grupo microbiano. Presentar dibujos y/o fotografías.
 - c. Tabla de resultados 3. Para cada fermentador se presentan los resultados de los análisis físicos y químicos directos del fermentador: volúmenes medidos de salmuera; grado salino medido y grado salino ajustado (después de añadir la sal); alícuotas y gastos de la solución de NaOH para la determinación de acidez titulable en cada muestra. Es importante no anotar en este cuadro ningún dato calculado.
 - d. Tabla de resultados 4. Anotar los datos calculados para cada muestra de los dos fermentadores con los niveles de sal: pH y acidez titulable en dos tipos de unidades: a) concentración de ácido láctico en la salmuera, en % (p/v) y en $\text{mmol}_{\text{ácido láctico}}/\text{kg}_{\text{hortaliza}}$. Este valor se calcula considerando la masa del ácido láctico (g) que hay en el volumen total de la salmuera en el fermentador de cada semana, dividiendo entre el peso inicial de las hortalizas (1.2 kg) y considerando el peso molecular.
 - e. Tabla de resultados 5. Anotar los resultados de la degustación de sus vegetales encurtidos en comparación con productos comerciales.
 - f. De acuerdo a los resultados obtenidos en las Tablas 1 y 2 analice cual es el mejor °S para ese vegetal, considerando sus características deseables así como su porcentaje de conservación.
 2. Gráficas
 1. Utilizando los datos calculados de las Tablas de resultados 3 y 4 se realizarán las gráficas indicadas en los siguientes incisos, con ayuda de un programa de computación (e.g. Excel). El formato será de dispersión x y, con puntos y líneas suavizadas, una gráfica por página.
 2. Gráficas por fermentador: En las Figuras 1, 2 y 3 se presentarán las gráficas de cada fermentación:
 - a. En la abcisas se indica el tiempo en días y el volumen de la salmuera en las ordenadas,
 - b. pH *versus* tiempo
 - c. $\text{mmol}_{\text{ácido láctico}}/\text{kg}_{\text{hortaliza}}$ *versus* tiempo
 3. Parámetros de velocidad del proceso
 1. Con los datos que corresponden a la acidez de la tropofase de cada cultivo, Figura 3 y Tabla de resultados 4, se calculan los valores de productividad de ácido láctico de acuerdo a la ecuación 2.

$$P = \frac{AL}{t} \quad (2)$$

donde: AL es la cantidad de ácido láctico producido ($\text{mmol}_{\text{ácido láctico}}/\text{kg}_{\text{hortaliza}}$) y t es tiempo en horas.

2. Los datos utilizados en los cálculos, y los parámetros resultantes se escribirán en la Tabla 6.

Cuestionario

1. Analice con base a los resultados obtenidos las diferentes etapas en la fermentación, identificando en qué fase se presentan las mayores actividades de la fermentación láctica y la deshidratación de las hortalizas.
 1. ¿Qué es la capacidad amortiguadora de los sustratos? ¿Cómo es ésta en los sustratos vegetales?
 2. Explique ¿cuál fue el efecto de la concentración de sal en la velocidad y rendimiento del ácido láctico y en el cambio de pH?
 3. ¿Qué es un probiótico y cuál es su importancia?
 4. Elabore un cuadro indicando la clasificación de microorganismos de acuerdo a su capacidad de crecimiento en presencia de NaCl.

Práctica 2

Elaboración del chucrut o sauerkraut

“La libertad es el mayor don del ser humano, pero ¿de qué sirve sin amigos que la alimenten?”

(Anónimo)

Objetivo

El alumno utilizará la fermentación láctica de col para obtener chucrut o sauerkraut.

Introducción

El chucrut (del francés choucroute) y Sauerkraut (del alemán Sauer: agrio, Kraut: repollo, col, es decir: repollo salado o en salmuera) es una comida típica de Alsacia y de Alemania que se prepara haciendo fermentar las hojas del repollo (col) en agua con sal (salmuera) (Ams, 2004). Se emplea en la mayoría de casos como acompañamiento de platos que, por regla general, se ven aliñados con algunas especias tales como el enebro o la pimienta, y diversos embutidos y carnes.

Las primeras referencias a la elaboración del chucrut provienen de China del norte y fue exportado hacia Europa mediante la expansión de los mongoles (Ams, 2004). Debido a su capacidad de conservación durante largos periodos de tiempo, se ha empleado en Alemania, Holanda y Polonia para ser consumido durante los periodos invernales en los que resulta necesario conservar verduras para equilibrar la dieta (Kaufmann, 2002).

El sauerkraut se elabora con coles finamente picadas que se mezclan con sal y se ponen juntos en un contenedor anaeróbico para que se produzca la fermentación, la misión de la sal es la de secar la verdura hasta que posea un porcentaje de agua bajo. Durante este proceso se forman hongos en la superficie; para poder eliminarlos totalmente una vez preparado y tratando de que el nivel de agua con sal se presente en superficie se le instala una madera cubriendo la superficie y un peso sobre ella (botella con agua) y se vierte dentro del recipiente un vaso de aceite comestible, al quedar a flote ese aceite hace imposible el contacto de aire con el agua salada (salmuera) y elimina la posibilidad en la formación de hongos (Ams, 2004).

El chucrut o sauerkraut es una buena fuente de cepas probióticas ya que se desarrollan *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* spp. a lo que debe su larga vida de anaquel y distintivo sabor como resultado de la fermentación láctica (Peres *et al.*, 2012). El chucrut es lo suficientemente ácido para inhibir el desarrollo de *Clostridium botulinum* y la liberación de sus neurotoxinas (Beganovic *et al.*, 2011).

El primer microorganismo en crecer en vegetales puesto a fermentar, es el *Leuconostoc mesenteroides* el cual degrada la glucosa por vía heterofermentativa produciendo CO₂, ácido láctico, etanol, etc (Ams, 2004). A continuación, actúan los *Lactobacillus* que no producen gas, *Lactobacillus plantarum*, el cual produce ácido láctico a partir de la fermentación de los azúcares y manitol originado por *Leuconostoc*. El *Lactobacillus plantarum*, por ser la especie más ácido tolerante termina la fermentación de vegetales. Si después de que *Lactobacillus plantarum* ha terminado su acción queda suficiente cantidad de azúcar y manitol, actúan otros *Lactobacillus* productores de gas (Ams, 2004). *Lactobacillus brevis* puede desarrollarse y continuar la producción de ácido láctico hasta un 2.4 % (p/v), sin embargo, esta acidez raramente se alcanza, por falta de azúcar y manitol.

Existe en la literatura científica informes del efecto benéfico del consumo de sauerkraut, entre ellos debido a la presencia de glucosinolatos que son metabolitos secundarios de la col que contienen azufre. Estos compuestos presentan propiedades anticarcinogénicas, la fermentación favorece la hidrólisis de glucosinolatos a derivados que promueven la salud. Asimismo, se producen con este proceso otros compuestos como el ascorbigeno, un compuesto resultante de la reacción entre indol-3-carbinol y vitamina C. El contenido de estos compuestos varía con el cultivo iniciador y la concentración de sal (Peña *et al.*, 2012)



Materiales y Equipos

Materiales de casa	Equipo
1 recipiente de 5 litros 3.5 kg de col Cuchillos Recipiente de plástico Sal (500g) Cucharas largas Plástico Agua potable Tablas de madera Canicas Vinagre Algodón Cerillos o encendedor Cinta adhesiva de enmascarar (masking tape) Cuaderno de registros Detergente Papel aluminio Papel sanitario Papel estraza Bolígrafo Marcador negro, o azul o verde Reloj Cubrebocas Tela pañalina Tijeras 1 lienzo de franela o algodón Plástico (película de polietileno)	Balanza granataria Balanza analítica Salómetro Potenciómetro
Material	Reactivos
1 probeta de 1 L 1 agitador de vidrio 1 vaso de precipitado de 1 L 1 embudo mediano 1 matraz volumétrico de 1 L 1 espátula 1 vaso de precipitado de 100 mL 1 vaso de precipitado de 50 mL 1 piceta 1 bureta de 100 mL 1 soporte universal 1 pinzas para soporte 3 matraces Erlenmeyer de 250 mL	NaOH Soluciones amortiguadoras de referencia 4 y 7

Procedimiento

1. Preparación de cultivos iniciadores

Lactobacillus plantarum (Cultivo de la colección NRRL B (Northern Regional Research Laboratory USDA, USA))

1. Se inocularán con 2 a 3 asadas de *L. plantarum* en 50 mL de caldo MRS (Anexo I) en un matraz Erlenmeyer de 100 mL.
2. Se incubará a 30°C durante 1 día.

2. Preparación de materiales de muestreo

1. Se colocan 4 pipetas graduadas de 10 mL en un cilindro y se esterilizan.
2. En casa se hierven en baño maría los frascos de muestreo (120 mL), durante 30 min. Después se retiran del agua con precaución, se escurren, se cierran y se dejan enfriar lentamente.

En el laboratorio se lava cuidadosamente un frasco de vidrio de 3.5 L con su tapa, dando un último enjuague con agua destilada, se deja secar y se cierra.

3. Preparación de la salmuera

1. La base de cálculo para todos los componentes de la salmuera indicados en la Tabla 2 será un volumen de 1500 mL. Se vierten aproximadamente 1200 mL de agua destilada en un vaso de precipitados de 2 L. Se añaden sales de mesa y glucosa, calculadas para 1500 mL. Las soluciones se mezclan con un agitador magnético sobre una parrilla eléctrica.
2. El pH de la salmuera se ajusta a 5.0 con soluciones de H₂SO₄ o NaOH al 0.1 N, con ayuda de un potenciómetro, calibrado previamente.
3. Se mide el volumen de la salmuera con una probeta, se ajusta con agua destilada a un volumen de 1470 mL y se regresa al vaso. Esta salmuera debe prepararse el mismo día de la fermentación.

4. Preparación de la col agria

1. Las coles agria de buena calidad se dejan marchitar por 1 o 2 días con el fin de que su temperatura sea uniforme para facilitar el troceado. Se eliminan las hojas que presentan manchas de alteración y los externos se lavan con agua limpia y se extrae el corazón para trocearlo y añadirlo al resto de la col.
2. Antes de introducir la col troceadas en los fermentadores, se mezclan con un 2.25 a 2.50 % (p/v) de sal, se hace presión sobre los mismos y, finalmente se dejan que por su propio peso se hundan en el líquido de la cuba de forma que en la parte superior quede una capa del jugo obtenido al prensar la col a la que se le ha añadido sal. Las cubas se deben tapar bien para que no penetre el oxígeno.

5. Fermentación

1. Se adiciona el inóculo (2% (v/v) de 1500 mL) a la salmuera que está en el vaso en una zona estéril, utilizando una pipeta estéril, se mezcla con un agitador magnético.
2. Durante la fermentación láctica, la temperatura debe ser de 21 a 24°C. Si es inferior a 15.6°C la fermentación será lenta e incompleta. Si se encuentra por encima de 26 – 29°C, es posible que tenga fermentaciones anormales.
Si la superficie se deja descubierta durante la fermentación crecerán levaduras o mohos formadores de velo en la superficie.
3. Cuando se ha obtenido la acidez deseada, se detiene la fermentación mediante el incremento de temperatura (80°C) o con temperaturas bajas (0°C).
4. A la tercera semana se vuelve a adicionar un 2 % (p/v) de sal y en la semana restante, un 1 % (p/v).
5. Al cabo de unos 2 meses, dependiendo del tipo de vegetal, temperatura del proceso y concentración de la salmuera, finalizada la fermentación. Este cambio final se detecta por algunos cambios y sabor ácido característico del vegetal fermentado.
6. Posteriormente, se vierten 250 mL de salmuera a una probeta de vidrio de esa capacidad, se introduce un salómetro y se sigue el procedimiento indicado en el Anexo II para la medición del grado salino. El contenido de esa probeta se regresa luego al vaso de precipitados que contiene el resto de la salmuera.

6. Análisis de la muestra

En los encurtidos los análisis que se realizan es el seguimiento de $\%(p/v)$ de sal y la acidez. Adicionalmente a juicio del profesor se podrán realizar análisis microbiológico para determinar el número de unidades formadoras de colonia (UFC) de bacterias lácticas por gramo de producto (Anexo II).

7. Evaluación sensorial de los productos

Consiste en la degustación del producto entre los integrantes de todos los equipos y se realizará una encuesta con escala hedónica para su evaluación o se complementará una ficha de cata (Anexo III).

8. Elaboración del reporte

1. Realizar un diagrama de flujo del proceso de elaboración de sauerkraut.
2. Elaborar una tabla donde se expongan los ajustes de sal al encurtido cada semana y el contenido de ácido láctico generado durante la fermentación
3. Elaborar una gráfica del punto anterior.
4. Se analizarán los datos y el aspecto físico del producto con normativas existentes para este alimento.

Cuestionario

1. ¿Qué función tiene la sal en la elaboración del encurtido?
2. Describe el tipo de microorganismos que pueden participar en esta fermentación.
3. Describe por qué es importante la temperatura en la fermentación.
4. ¿Qué características debe tener la materia prima?
5. Explica cómo es el metabolismo de carbohidratos de las bacterias lácticas
6. ¿Cómo se obtiene manitol?

Práctica 3

Elaboración y análisis de un producto encurtido

“Es un buen libro aquel que se abre con expectación y se cierra con provecho.”

(Alcott Bronson)



Materia Prima



Corte



Producto Terminado

Objetivo

El alumno comparará los productos vegetales fermentados con base en la materia prima seleccionada.

Introducción

El encurtido es una semi-conserva alimenticia de gran importancia nacional debido a su alto consumo por parte de la población durante los últimos años. La naturaleza de esta semi-conserva es de tipo hortícola, observándose muy raras veces la presencia de otros elementos constitutivos. Los vegetales que se utilizan tradicionalmente con: el pimentón, la cebolla, la zanahoria, la coliflor, el pepino, el calabacín, entre otros.

Las hortalizas tienen un aroma y un color característicos diferentes según la variedad y su composición química. Todas ellas tienen en común su elevado aporte de agua, que se sitúa en torno al 75-95% (p/v) del peso total. Por este motivo, contribuyen a hidratar al organismo y a eliminar con más facilidad sustancias tóxicas, por lo que poseen una acción depurativa. Debido a su bajo aporte de hidratos de carbono (del 1% al 8% (p/v)) y aún menor de proteínas (1-5% (p/v)) y de grasas (0,1-0,3% (p/v)), su aporte calórico es de entre 20 y 40 calorías por cada 100 gramos. Lo más destacable de estos alimentos es su riqueza en micronutrientes (vitaminas, minerales), así como en fibra y sustancias antioxidantes que se sabe ayudan en la reducción del riesgo de múltiples enfermedades.

Los hidratos de carbono son el segundo componente más importante en cantidad después del agua. Las hortalizas son ricas en hidratos de carbono complejos (almidón), lo que diferencia a este grupo frente a las frutas, que tienen en mayor cantidad hidratos de carbono sencillos o azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa). Estos también se hallan en las hortalizas, pero en cantidades mínimas. Es por esta razón que carecen del sabor dulce propio de las frutas. Los diferentes tipos de azúcares que se encuentran son: polisacáridos, hidratos de carbono simples o azúcares, fibra, fructo-oligosacáridos (Hensley, 2008).

Materiales y Equipo

Materiales de casa	Equipo
Cuchillos 1.5 kg de pimentón, cebolla, zanahoria, coliflor, pepinillo, calabacín o chile Tablas de madera 2 Frascos de mayonesa grandes Sal (aprox. 500 g) Agua potable Canicas grandes Vinagre Algodón Cerillos o encendedor Cinta adhesiva de enmascarar (masking tape) Cuaderno de registros Detergente Papel aluminio Papel sanitario Papel estraza Bolígrafo Marcador negro, o azul o verde Reloj Cubrebocas Tela pañalina Tijeras 1 lienzo de franela o algodón Plástico (película de polietileno)	Balanza granataria Balanza analítica 1 salómetro
Materiales	Reactivos
1 probeta de 1 L 1 agitador de vidrio 1 vaso de precipitado de 1 L 1 embudo mediano 1 matraz volumétrico de 1 L 1 espátula 1 vaso de precipitado de 100 mL 1 vaso de precipitado de 50 mL 1 piseta 1 bureta de 100 mL 1 soporte universal 1 pinzas para soporte 3 matraces Erlenmeyer de 250 mL	NaOH Soluciones amortiguadora referencia, pH 4 y 7 Fenol H_2SO_4

Procedimiento

1. Preparación de cultivos iniciadores

Lactobacillus plantarum (Cultivo de la colección NRRL B (Northern Regional Research Laboratory USDA, USA))

1. Se inocularán con 2 a 3 asadas de *L. plantarum* en 50 mL de caldo MRS (Anexo I) en un matraz Erlenmeyer de 100 mL.
 2. Se incubará a 30°C durante 1 día.
2. Preparación de materiales de muestreo
 1. Se colocan 4 pipetas graduadas de 10 mL en un cilindro y se esterilizan.
 2. En casa se hierven en baño maría los frascos de muestreo (120 mL), durante 30 min. Después se retiran del agua con precaución, se escurren, se cierran y se dejan enfriar lentamente. En el laboratorio se lava cuidadosamente un frasco de vidrio de 3.5 L con su tapa, dando un último enjuague con agua destilada, se deja secar y se cierra.

3. Preparación de la salmuera

3. La base de cálculo para todos los componentes de la salmuera indicados en la Tabla 2 será un volumen de 1500 mL. Se vierten aproximadamente 1200 mL de agua destilada en un vaso de precipitados de 2 L. Se añaden sales de mesa y glucosa, calculadas para 1500 mL. Las soluciones se mezclan con un agitador magnético sobre una parrilla eléctrica.
4. pH de la salmuera se ajusta a 5.0 con soluciones de H₂SO₄ o NaOH al 0.1 N, con ayuda de un potenciómetro, calibrado previamente.
5. Se mide el volumen de la salmuera con una probeta, se ajusta con agua destilada a un volumen de 1470 mL y se regresa al vaso. Esta salmuera debe prepararse el mismo día de la fermentación.

4. Preparación de las hortalizas

1. Una vez que se haya elegido la materia prima, cada equipo deberá trabajar con una diferente, se realizarán cortes homogéneos es importante que así sea para que la fermentación se lleve a cabo lo más uniforme posible en cada trozo de la materia prima.
2. Posteriormente se colocan los trozos en el fermentador y se vierte agua potable hasta cubrir la materia prima.
3. La cantidad de agua empleada se saca del fermentador para ser medido exactamente en una probeta y poder realizar el cálculo correspondiente para preparar una salmuera al 10% (p/v).
4. Ya preparada la salmuera se vierte nuevamente en el fermentador asegurándose de que cubra completamente a la materia prima.

5. Fermentación

1. Se adiciona el inóculo (2% (v/v) de 1500 mL) a la salmuera que está en el vaso en una zona estéril, utilizando una pipeta estéril, se mezcla con un agitador magnético.
2. Durante la fermentación láctica, la temperatura debe ser de 21 a 24°C. Si es inferior a 15.6°C la fermentación será lenta e incompleta. Si se encuentra por encima de 26 a 29°C, es posible que tenga fermentaciones anormales. Si la superficie se deja descubierta durante la fermentación crecerán levaduras o mohos formadores de velo en la superficie.
3. Cuando se ha obtenido la acidez deseada, se detiene la fermentación mediante el tratamiento térmico que se lleva a cabo durante el enlatado, o mediante temperaturas bajas.
4. Se coloca un plástico limpio en la boca del fermentador empujando con la mano tratando de que se desplace todo el oxígeno presente en ese espacio de cabeza y se colocarán sobre el plástico las canicas formando un contrapeso para evitar en la medida de lo posible el crecimiento de microorganismos aerobios.
5. Los fermentadores se guardan en gaveta y se checarán cada semana para medir el grado de salinidad y ajustar 1% (p/v) de sal al líquido.
6. En caso de que haya crecimiento de microorganismos aerobios se tiene que retirar la nata que se produce, lavar perfectamente el plástico y volver a colocar todo para que continúe la fermentación.
7. Esta práctica se realizará a lo largo de seis semanas hasta llegar a un porcentaje de sal del 16% (p/v).

6. Análisis de las muestras

Se tomarán muestras semanales al ajustar el porcentaje de sal y se medirá la cantidad de ácido láctico producido. Adicionalmente a juicio del profesor se podrán realizar análisis microbiológico para determinar el número de unidades formadoras de colonia (UFC) de bacterias lácticas por gramo de producto (Anexo II).

7. Evaluación sensorial de los productos

Consiste en la degustación del producto entre los integrantes de todos los equipos y se realizará una encuesta con escala hedónica para su evaluación (Anexo III).

8. Elaboración del reporte

1. Realizar un diagrama de flujo del proceso.
2. Elaborar una tabla donde se expongan los ajustes de sal al encurtido cada semana y el contenido de ácido láctico generado durante la fermentación.
3. Se analizarán los datos y es aspecto físico del producto con normatividades existentes para este alimento.

Cuestionario

1. Explica cómo se lleva a cabo la fermentación láctica en productos encurtidos.
2. Describe el tipo de microorganismos que pueden participar en esta fermentación.
3. Investiga y describe los cambios que presentan las hortalizas desde su compra hasta que el producto se considera terminado. Incluye las posibles causas que originan los cambios.
4. ¿Qué cambios propones para mejorar el proceso realizado en el laboratorio?
5. Menciona algunos vegetales que no sean aptos para ser sometidos a este tipo de fermentación y explica el por qué

Capítulo 3. Fermentación láctica en sustratos lácteos

Práctica 4

Elaboración de yogurt

“Pan con ojos, queso sin ojos y vino que te salte a los ojos”. (Anónimo)

Objetivo

El alumno determinará la producción de ácido como responsable de la fermentación de leche.

Introducción

Producto lácteo fermentado, semilíquido, considerado un alimento saludable. Se elabora con leche entera, descremada, cocida y concentrada por evaporación. La fermentación se consigue añadiendo cultivos de dos bacterias: *Lactobacillus acidophilus* y *Streptococcus thermophilus*. Se pueden obtener nuevos lotes de yogurt añadido a la leche concentrada una porción del lote anterior. El yogur es el producto obtenido mediante la coagulación por fermentación de la leche entera, total o parcialmente descremada, provocada por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* (Hernández, 1998).

Las cualidades nutritivas del yogur provienen no sólo de la presencia de los compuestos de la leche, sino también de la transformación de éstos como resultado de la fermentación ácido-láctica causada por los microorganismos.

La ingestión de este producto es recomendable en todas las edades. Para la mayor parte de los lactantes intolerantes a las leches constituye un magnífico alimento, pues la reducción moderada de su contenido de lactosa, en comparación con el de la leche, lo hace más apropiado para los pacientes con deficiencia de lactasa (Mantello, 2007).

Las propiedades bacteriostáticas del yogurt contribuyen a la resistencia a las infecciones:

1. En efecto, este producto contiene bacterias activas que forman parte de nuestra flora intestinal indispensable, las cuales participan en el metabolismo de los alimentos en el proceso digestivo. El yogurt se cataloga como un producto de alta digestibilidad, que aumenta el coeficiente de absorción de numerosas sustancias, tales como proteínas y grasas.
2. El consumo de yogurt intensifica la retención de fósforos, calcio y hierro en comparación con la leche; también cabe destacar su participación en la disminución de los problemas alérgicos.
3. Además de consumir el yogur en forma natural, éste se puede integrar a múltiples preparaciones culinarias. Existen diferentes tipos de yogurt: fluido (líquido), aflanado y batido (Tamime y Robinson, 2007).



Descremadora



Pasteurización



Fermentación

Materiales y equipos

Materiales de casa	Equipo
Termómetro Azúcar 1g/L Alcohol 75-85% (v/v) Leche de vaca 1L 1 recipiente de vidrio o plástico para fermentar (1.5 L) 1 olla de acero inoxidable Algodón Cerillos o encendedor Cinta adhesiva de enmascarar (masking tape) Cuaderno de registros Detergente Papel aluminio Papel sanitario Papel estraza Bolígrafo Marcador negro, o azul o verde Reloj Cubrebocas Tela pañalina Tijeras 1 lienzo de franela o algodón	1 parrilla de gas 1 incubadora 1 potenciómetro
Material	Reactivos
1 bote de yogurt natural (150 g) sin sabor, sin color sin azúcar ni edulcorantes 1 mechero Fisher 1 mechero bunsen 1 conexión T de vidrio 1 agitador de vidrio 1 bureta de 100 mL 1 soporte universal 1 pinzas para soporte 3 matraces Erlenmeyer de 250 mL	NaOH Soluciones Amortiguadoras pH 4 y 7

Procedimiento

El yogurt debe contener 14-16% (p/v) de sólidos totales, yogurt para beber 8-9% (p/v) de sólidos totales. La leche bronca contiene de 11 a 12% (p/v) de sólidos.

Estandarización del contenido de grasa de la leche. El ajuste de grasa se realizará dependiendo de la composición de la leche empleada, es decir, entera, semidescremada y descremada.

Para la preparación de 1 litro de yogurt se adicionará como inóculo el 5% (p/v) de yogurt natural comercial.

1. Preparación de cultivos iniciadores

En este caso se empleará un yogurt comercial, con las siguientes características: natural, sin sabor, sin color, sin azúcar, ni edulcorantes.

2. Fermentación

1. Se agrega el cultivo comercial lentamente y agitando todo el tiempo.
2. Se incuba por 4 horas mínimo a 42° C
3. Terminada la fermentación se agrega azúcar, y aditivos en caso de que así se determine.

3 Reposo

Se deja disminuir la temperatura gradualmente en un lugar fresco y se coloca en refrigeración por 3 h.

4 Análisis de la muestra

1. Determinar la acidez total en el producto (Anexo III).
2. Determinar pH del producto final (Anexo III).

5 Evaluación Sensorial de los productos

Consiste en la degustación del producto entre los integrantes de todos los equipos y se realizará una encuesta con escala hedónica para su evaluación (Anexo III).

6 Elaboración del reporte

1. Realizar un diagrama de flujo del proceso de elaboración del yogurt.
2. Elaborar una tabla donde se expongan los cambios generados por la fermentación con respecto a pH y acidez.
3. Se analizarán los datos y es aspecto físico del producto con normatividades existentes para este alimento (NOM-181-SCFI-2010).

Cuestionario

1. Brevemente expresa en un cuadro ventajas y desventajas de las leches de cabra y vaca, para la elaboración del yogurt.
2. Bajo qué condiciones se puede alterar fisicoquímica y sensorialmente el yogurt.

Capítulo 4. Cultivo en medio sólido

Práctica 5

Fermentación en estado sólido con *Rhizopus oligosporus*: Elaboración de Tempeh.

“Los deseos del joven muestran las virtudes futuras del hombre.”
(Cicerón)

Objetivo

El alumno reconocerá los principios de un cultivo en medio sólido a través del estudio de la fermentación de frijol de soya con *Rhizopus oligosporus*.

Introducción

El proceso de fermentación en medio sólido se puede definir como el crecimiento microbiano en partículas sólidas sin la presencia de agua libre. El agua presente en los sistemas en medio sólido existe dentro de la matriz sólida o como una capa delgada absorbida en la superficie de las partículas o dentro de las regiones capilares del sólido. El agua libre sólo se producirá una vez que la capacidad de saturación de la matriz sólida es excedida.

La velocidad de desarrollo del micelio en un sustrato sólido y su actividad metabólica son influenciadas por los parámetros ambientales, como la temperatura, el pH, la humedad y la aireación. La acumulación de metabolitos primarios ocurre principalmente durante la fase de crecimiento somático del micelio, aunque la cinética de producción y la de crecimiento microbiano no necesariamente coinciden. La aireación forzada trae consigo una remoción de calor y de humedad. Esta última debe ser compensada para evitar deficiencias en el medio (Aidoo *et al.*, 1984; Hamada *et al.*, 1991; Sato, 1982; Wood, 1973).

La fermentación sólida puede realizarse en diversos granos, como: la soya, el arroz, la cebada o el maíz. *Rhizopus oligosporus* se utiliza para fermentar la soya cocida y así obtener un alimento sólido con la apariencia de un pastel blanco rebanable llamado Tempeh, típico de Indonesia que se consume en sopas y platillos como sustituto de proteína (Steinkraus, 1994). La soya es remojada, descascarillada y cocida para servir como sustrato a zigomiceto *R. oligosporus*, cuyo micelio se desarrolla sobre los granos.

Durante el cultivo sólido, proteínas y lípidos son hidrolizados haciendo mucho más digerible el alimento además de que factores antinutricionales como el ácido fítico se disminuyen significativamente (Feng 2007).



Materiales y Equipo

Materiales de casa	Equipo
1 recipiente de plástico de 1 L 1 cuchara grande metálica 1 escurridor circular de plástico 1 escurridor circular de aluminio 1 espátula grande 1 frasco de vidrio de 2 L 3 frascos Gerber 1 mechero Bunsen 1 mechero Fisher 1 olla metálica de 26-30 cm de diámetro y aproximadamente 3-5 L de capacidad con tapa 1 cuchara grande metálica 200 g de frijol de soya se puede adquirir en las tiendas de productos naturistas 1 cubrebocas 1 charola de plástico profunda que resista esterilización en autoclave (121°C por 15 min) 1 tijeras 1 lentes de seguridad Algodón Cerillos o encendedor Cinta adhesiva de enmascarar (masking tape) Cuaderno de registros Detergente Papel aluminio Papel sanitario Papel estroza Bolígrafo Marcador negro, o azul o verde Reloj Cubrebocas Tela pañalina Tijeras 1 lienzo de franela o algodón Plástico (película de polietileno)	Autoclave, Canastilla para autoclave Base para autoclave Válvula de seguridad Balanza granataria digital Balanza analítica Balanza con capacidad hasta de 2 kg Horno para reactivos químicos. Agitador de tubos tipo vórtex Campana de flujo laminar Incubadora estática Microscopio estereoscópico (de disección) con lámpara 1 microscopio óptico 1 Parrilla de calentamiento y agitación electrorregulable 1 Potenciómetro 1 contador manual 1 Bomba de 30 galones (105 L). 1 Refrigerador.
Materiales	Reactivos
1 probeta de 250 mL 1 propipeta 1 tela de asbesto 1 termómetro de 10 - 250 °C 1 tripie metálico 1 tubo en T con manguera 2 vasos de precipitados de 100 mL 1 vaso de precipitados de 1000 mL 1 agitador de vidrio 1 asa bacteriológica 1 embudo pequeño 1 barra magnética de agitación 2 cajas de Petri de 10 x 2 cm 2 espátulas delgadas	Agar papa dextrosa H ₂ O destilada o desionizada KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄ NaCl Solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.0 Solución amortiguadora de fosfatos 0.5 M, pH = 4.0 Fenol H ₂ SO ₄ NaOH HCl Tween 80

<p>1 gradilla metálica 1 lentes de seguridad 1 matraz Erlenmeyer de 125 mL 1 mechero Bunsen con manguera de hule látex 1 mechero Fisher con manguera de hule látex 2 picetas 4 pipetas graduadas de 1 mL 2 pipetas graduadas de 2 mL 5 pipetas graduadas de 5 mL 3 pipetas graduada de 10 mL 1 cilindro de acero inoxidable para esterilizar pipetas 1 propipeta 3 probetas de 100 mL 1 termómetro de - 10 a 50°C 2 tubos de ensayo medianos 3 tubos de cultivo grandes, con boca ancha y tapón roscado 3 tubos de cultivo anchos grandes (sin rosca) 1 tubo de vidrio en T, con manguera de hule látex 3 vasos de precipitados de 50 mL 2 vasos de precipitados de 100 mL 2 vasos de precipitados de 250 mL 1 cámara de Neubauer con cubreobjetos 1 gradilla Portaobjetos y cubreobjetos 1 filtro de Nylon horador de tapones de hule del No. 3 1 matraz Kitasato de 500 mL 1 matraz Kitasato de 125 mL 1 matraz volumétrico de 125 mL 2 pipetas Pasteur de cuello largo nuevas 1 pipeta Pasteur parcialmente despuntada 3 pipetas Pasteur con bombilla tapón de hule para el matraz Kitasato de 125 mL 1 tapón de hule para el matraz Kitasato de 500 mL 1 tramo de manguera de hule látex de 6 mm de diámetro interno y 30 cm de longitud, nuevo 3 tramos de manguera esterilizable Nalgene de 6 mm de diámetro interno y 50 cm de longitud 1 tramo de tubo delgado de hule rígido de los que se usan para pece- ra, de 3 mm de diámetro interior y 30 cm de longitud 1 tramo de tubo de vidrio de 7 mm de diámetro externo y 10 cm de longitud 1 tramo de tubo de vidrio de 7 mm de diámetro externo y 20 cm de longitud trozo de hilaza blanca de 1 m 1 bisturí 1 bureta de 25 mL 2 espátulas grandes 3 matraces Erlenmeyer de 125 mL 3 matraces Erlenmeyer de 250 mL 1 matraz Erlenmeyer de 500 mL 1 pinza para bureta 1 pinza de disección recta 1 sistema de fermentación descrito en procedimiento 1 soporte universal</p>	<p>fenolftaleína-timolftaleína BaCl₂ Solución de yodo Gram Ácido láctico</p>
---	--

Procedimiento

Cada equipo preparará una suspensión de esporas del moho como inóculo, la cual se aplicará al frijol de soya previamente remojado, descascarillado y cocido al vapor. Se realizará un cultivo en estado sólido con aireación forzada. El fermentador será implementado y compartido entre 2 o 3 equipos y se dará seguimiento de la actividad microbiana por medio de la cuantificación del cociente respiratorio, de la observación del micelio en el estereoscopio y de la hidrólisis proteica en la soya.

1. Preparación del cultivo iniciador

Rhizopus oligosporus (Cultivo de la colección NRRL (Northern Regional Research Laboratory USDA, USA))

1. Se inocularán con *R. oligosporus* por picadura 75 mL de agar papa dextrosa (Anexo I) en matraces Erlenmeyer de 250 mL.
2. Se incubará a 30°C durante 5 a 7 días o hasta que sea abundante la esporulación apreciable por la coloración blanca en la superficie del micelio.
3. Se empleará solución 0.1% (v/v) de Tween 80 para preparar la suspensión de esporas mediante agitación mecánica en parilla con un agitador magnético.
4. Se determinará el número de esporas mediante conteo directo al microscopio en cámara de Neubauer (Anexo II).

2. Preparación de materiales para fermentación y muestreo

1. Esta actividad se realiza antes de la fermentación principal. En casa se hierven durante 30 min 3 frascos de 120 mL, con sus respectivas tapas, en un baño maría. Posteriormente, se retiran del agua con cuidado, se escurren sobre el agua hirviendo, se cierran inmediatamente con precaución, y se dejan enfriar lentamente. Estos se preparan uno o varios días antes de la fermentación.
2. Se esterilizan en autoclave a 121°C, durante 15 min: cilindro con pipetas graduadas, frasco (2L) con tapón de algodón, en papel estraza se envuelve el tapón horado con la pipeta Pasteur despuntada, 1 espátula grande y charola, 3 tubos de ensayo con tapones roscados vacíos, 1 tubo de cultivo grande con rosca y 10 mL de agua destilada.

3. Preparación de frijoles de soya

1. 200 g de frijol de soya serán remojados en 600 mL de agua corriente con 1% (v/v) de ácido láctico por 16 h a temperatura ambiente.
2. Los frijoles de soya serán descascarillados, lavados y hervidos en un exceso de agua durante 30 min.
3. Los frijoles cocidos serán escurridos y colocados en la charola previamente esterilizada, una vez eliminado el exceso de agua se inocularán con la suspensión de esporas hasta tener 10^5 esporas/g de frijol de soya en base húmeda.
4. Los frijoles inoculados serán colocados en el frasco estéril de 2 L que será tapado, mientras se colocan en el sistema de fermentación.

4. Sistema de fermentación

1. Se construirá el sistema de fermentación siguiendo las indicaciones del profesor. El sistema de fermentación consta de 4 partes:
 - a. la primera es una bomba de aireación que cuenta con un filtro de Nylon, la cual proporciona al microorganismo el oxígeno necesario para su desarrollo;
 - b. la segunda es un matraz Kitasato de 500 mL, el cual contendrá 400 mL de una solución de NaOH 2 N que servirá para la eliminación de la mayor cantidad posible de CO_2 atmosférico (lavado de aire);
 - c. la tercera es un frasco de 2 L en el que se va a llevar a cabo la fermentación sólida y,
 - d. la última parte consta de un matraz Kitasato de 125 mL el cual contendrá 100 mL de la misma solución de NaOH medida exactamente con un matraz volumétrico. Con esta solución se recolectará el CO_2 producido durante el transcurso de un día de fermentación y se cambiará diariamente. La solución de NaOH se recogerá en la campana, y se utilizarán lentes de seguridad.

2. El tiempo cero de la fermentación se considera en el momento de la inoculación. El cultivo se incubará a 30°C durante 2 a 3 días.

5. Medición del flujo de aireación

1. Para medir el flujo de aireación se reemplazará en todos los matraces Kitasato del sistema de fermentación la solución de NaOH por agua.
2. Una sola bomba de aireación puede proveer suficiente aire para 3 o 4 fermentadores. El burbujeo en el matraz de 125 mL debe ser lento, pero constante.
3. El flujo del aire puede medirse con un burbujómetro colocado a la salida de cada fermentador y éste se distribuirá equitativamente entre todos los fermentadores, con ayuda de mangueras y pinza de tornillo de Mohr.
4. La medición de flujo de aireación se realizará conforme el arreglo que se describe en el Anexo IV.

6. Análisis de muestras

Determinación de CO₂ producido

1. Se cuantificará la producción de CO₂ durante la fermentación para tal fin cada 24 h se colectarán los 100 mL de solución de NaOH contenida en el matraz Kitasato de 125 mL del sistema de aireación, vaciándolos en uno de los frascos Gerber.
2. El frasco se etiqueta indicando los siguientes datos: # del fermentador, número del equipo, # de muestra, fecha, hora del muestreo y nombre de la persona que realizó el muestreo. Se guarda la muestra en un congelador hasta su análisis.
3. El contenido del matraz Kitasato de 125 mL se reemplazará diariamente con 100 mL de solución nueva de NaOH, midiendo con matraz volumétrico. La primera muestra (Muestra # 1) se toma a las 24 h de cultivo.
4. *Análisis de CO₂ producido por día.*
 - a. A un matraz Erlenmeyer de 125 mL se transfieren 10 mL de la solución de NaOH colectada en cada muestra.
 - b. Luego se añaden 5 mL de una solución de BaCl₂ al 20% (p/v) y se titulan con HCl 1 N, agregando 5 gotas del indicador mixto (fenoltaleína-timoltaleína).
 - c. La titulación termina cuando el color del indicador mixto (violeta) desaparezca (incolore).

Análisis microbiológico.

1. Se recomienda usar un cubrebocas durante el muestreo microbiológico, también se tomarán muestras cada 24 h, pero se inicia en el tiempo 0 h.
2. Antes de tomar las muestras de frijoles se deben anotar los datos de apariencia, observando especialmente el momento en que aparezca una esporulación incipiente, ya que, eso indica que el metabolismo del microorganismo cambió de primario a secundario.
3. En cada uno de los muestreos se cortarán y tomarán, con ayuda de pinzas de disección, espátula y bisturí (esterilizados por flameo), aproximadamente 2 cm³ de granos con micelio y se depositarán en un tubo de ensaye ancho con tapón de algodón y gasa, previamente etiquetado.
4. El tubo se debe almacenar en congelación con los siguientes datos: # del fermentador, número del equipo, # de muestra, fecha, hora del muestreo y nombre de la persona que muestreó. Una vez tomada la muestra se mezclan perfectamente los granos con una espátula estéril (flameada y fría).
5. Por último se procede a ensamblar de nuevo el sistema de fermentación y de aireación.
6. Observación del micelio en el estereoscopio:
 - a. Se depositarán porciones pequeñas de grano de cada muestra sobre portaobjetos con ayuda de un bisturí y pinzas de disección, y se observarán en el microscopio estereoscópico sin maltratar el micelio del hongo.
 - b. Tinción de los granos de arroz con solución de yodo de Gram.
7. Se tomará un grano de cada muestra con ayuda de unas pinzas de disección y se colocarán sobre un portaobjetos.
8. Posteriormente se añadirá una gota de yodo de Gram al grano para observar el cambio de color de azul oscuro a blanco, para interpretar el grado de daño del almidón.

Finalización de la fermentación y medición del blanco de aireación.

1. Al final de la fermentación se retirarán los granos del frasco y se procederá a dejar el sistema trabajando un día más con 125 mL de solución de NaOH nueva, para que esta muestra se emplee como el blanco de aireación (CO_2 acumulado en 24 h que no viene de la respiración).
2. El grano fermentado se esteriliza en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, para posteriormente tirarlo a la basura dentro de una bolsa de plástico. Este procedimiento se debe de realizar utilizando cubrebocas para evitar inhalación de esporas.

7. Elaboración del reporte

1. Elabora el diagrama de flujo del proceso.
2. Tabla de resultados 1. Se anotarán los datos directos de los equipos que ocuparon el mismo fermentador: el número de esporas por equipo obtenido en la cámara de Neubauer, el volumen inoculado por equipo, el peso total del frijol cocido (g).
3. Tabla de resultados 2. Se anotarán los datos de las titulaciones, de las observaciones del aspecto del micelio y los cambios de color con la solución de yodo.
4. Tabla de resultados 3. En éste cuadro se indicarán los resultados de O_2 alimentado cada día, del CO_2 producido diariamente y de los coeficientes respiratorios (Anexo II).
5. Gráficas
 1. Gráfica de coeficiente respiratorio. Se realizará una gráfica (Figura 1) para el cociente respiratorio, indicando en las abscisas el tiempo en días, y en las ordenadas el C_R con sus unidades. Aquí se observará en qué período se presenta la mayor actividad respiratoria, también se observará si hay cambio de C_R en el momento en que el moho inicia el metabolismo secundario (esporulación).
 2. Se discutirán los resultados con base a las observaciones del micelio, del frijol, de la prueba de yodo y de la actividad respiratoria (C_R). Con ellos se evaluará si existieron diferentes etapas de desarrollo del hongo con su actividad respiratoria y su efecto sobre el sustrato.

Cuestionario

1. ¿Explique qué factores afectan la fermentación en medio sólido?
2. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas del cultivo en medio sólido a comparación del sumergido?
3. Investigue cuáles son las características organolépticas del tempeh.
4. Resuma de qué maneras se cocina (consume) el tempeh.

Materiales y Equipo

Material de casa	Equipo
1 charola profunda 7 frascos de 120 mL de capacidad nominal con tapa de rosca. 1 frasco de vidrio de 1000 mL esterilizable (de suero), con tapón de hule 1 recipiente metálico de 15-20 cm de altitud y 18-22 cm de diámetro. Algodón Bata cerillos o encendedor cinta adhesiva tipo masking cuaderno de registros detergente papel aluminio papel sanitario papel estraza pluma plumón marcador negro reloj tapabocas tela pañalina o gasa tijeras toallita para las manos trapo de franela.	Autoclave Balanza granataria Balanza digital Congelador Incubadora o baño de temperatura controlada Parrillas de calentamiento y agitación electrorregulables Potenciómetro Refrigerador
Material	Reactivos
1 asa bacteriológica 1 baño de temperatura controlada 2 barras de agitación magnéticas 2 embudos de 7 cm de diámetro 5 espátulas pequeñas de acero inoxidable 1 gradilla 1 matraz Erlenmeyer de 500 mL 1 mechero Fischer con manguera 1 mechero Bunsen con manguera 1 piceta 1 pinza para crisol 3 pipetas graduadas de 1 mL 1 pipeta graduada de 2 mL 5 pipetas graduadas de 10 mL 1 probeta de 250 mL 1 termómetro de -10 a 50 C 1 tubo en T de vidrio 4 tubos de ensaye medianos con rosca 2 vasos de precipitados de 50 mL 1 vaso de precipitados de 600 mL 1 vaso de precipitados de 1000 mL	Extracto de levadura Agua destilada o desionizada Fosfato dipotásico Sulfito de potasio Sulfato de magnesio Sulfato de manganeso Sulfato de amonio Sacarosa (Glucosa o maltosa) Soluciones amortiguadoras de referencia, pH 4.0 y 7.0 Azul de metileno Fenol H_2SO_4 $NaOH$ Na_2SO_3 Solución de vitaminas y minerales Un tubo con cultivo axénico de 48 h de una cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , en medio complejo sólido

Preparación de reactivos y medios Anexo I y II

Procedimiento

Se evaluarán dos niveles de temperatura en la fermentación alcohólica dentro del rango normal que se utiliza en la industria, para la elaboración de las bebidas alcohólicas, propuestos de acuerdo a la Tabla 4. Cada equipo de alumnos preparará su medio de cultivo y el inóculo; llevará a cabo la fermentación de 3 – 5 días a una temperatura asignada. Se realizarán muestreos de acuerdo al cronograma propuesto, y se realizará la evaluación de los cambios en las concentraciones de levaduras, de etanol y de azúcares reductores. Después de efectuar los cálculos se realizará una comparación de los resultados de dos equipos, cada uno con un nivel diferente de temperatura. Cada equipo presentará un informe con los resultados de ambos equipos y escribirá su discusión. Los resultados se discutirán en una sesión global.

1. Preparación de cultivos iniciadores

Saccharomyces cerevisiae (Cultivo de la colección NRRL (Northern Regional Research Laboratory USDA, USA))

1. Se prepararán 2 matraces Erlenmeyer con caldo dextrosa–Sabouraud estéril, siguiendo el procedimiento indicado en el Anexo I.
2. Se verifica la pureza de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que se ha desarrollado previamente en medio sólido inclinado, realizando un frotis teñido con la técnica simple de azul de metileno al 0.5 % (p/v)(Anexos I y II).
3. El caldo dextrosa–Sabouraud se inocula con una asada de la levadura en condiciones asépticas y se incuba durante 48 h, a 28°C, con agitación.

2 Preparación de materiales de muestreo

- 1 Los frascos de muestreo (120 mL) se hierven en baño maría, durante 30 min. Después se retiran del agua con precaución, se escurren, se cierran y se dejan enfriar lentamente.
- 2 Se esterilizan 4 pipetas graduadas de 10 mL, 3 tubos de ensayo con tapón roscado vacíos y un embudo chico, en autoclave a 121°C, durante 15 min.

3 Preparación de los medio de fermentación

En el Anexo IV se presenta el diseño de los fermentadores que se emplearán para esta práctica.

1. El medio de cultivo caldo de glucosa se prepara previamente antes del inicio de la fermentación (Anexo I).
2. El volumen de trabajo de cada fermentador es de 700 mL, el cual incluye al volumen del medio (95%) y al volumen del inóculo (5%). En la preparación del medio se esterilizan por separado los componentes orgánicos y los inorgánicos.
3. En un vaso de precipitados de 400 mL se mezclan los componentes orgánicos indicados en el Anexo I, en 200 mL de agua, calculando las cantidades de los componentes con base a un volumen de trabajo de 700 mL. Se mezcla el medio en una parrilla de agitación a temperatura ambiente y se ajusta el pH a 4.0 con soluciones de H₂SO₄ o NaOH al 0.1 N, con ayuda de un potenciómetro calibrado. Se esteriliza el medio en un matraz Erlenmeyer de 500 mL.
4. En un vaso de precipitados de 1 L se prepara por separado la solución de componentes inorgánicos (con excepción del K₂SO₃) en 465 mL de agua, siguiendo el procedimiento descrito para el medio anterior hasta el ajuste del pH. Esta solución se vierte en el fermentador junto con una barra de agitación magnética. Se tapan todas las salidas del fermentador con pequeños tapones de algodón largos y poco apretados, además se colocará gasa por fuera de las salidas amarrándolas con hilaza (Anexo VI).
5. Se esteriliza el matraz Erlenmeyer y el fermentador con los medios en la autoclave a 121°C, durante 15 min, y se enfría lentamente para evitar la ruptura del frasco.
6. Por separado se esteriliza el tapón de rosca del fermentador, un tramo de manguera esterilizable de 45 cm y 2 tramos de hilaza de 10 cm cada uno, envueltas separadamente en papel de estraza (Anexo IV).
7. Los extremos de los tubos que estén expuestos, se tapan externamente con algodón, amarrándolos con hilaza (Anexo IV). **Ojo: la jarra de vidrio del fermentador (con o sin tapa) siempre se transportará dentro de una charola de plástico profunda, nunca en las manos directamente.**

8. Antes de iniciar el cultivo se lavan las manos con fenol al 1% (p/v), se ponen cubrebocas y se sana la mesa con fenol al 5% (p/v).

Se coloca el fermentador entre mecheros y sobre la mesa saneada, se vacía la solución de componentes orgánicos estéril al fermentador, a través del orificio central con rosca, con ayuda de un embudo estéril. Luego se retira el embudo y se adiciona el K_2SO_3 y se coloca de nuevo el tapón de algodón.

Tabla 4. Niveles de temperatura para la Fermentación Alcohólica

Fermentación No.	Temperatura(°C)
1	24
2	30

9. Fermentación

Antes de inocular el sistema de fermentación se debe verificar la pureza del inóculo, por medio de la observación al microscopio de un frotis teñido con tinción simple de azul de metileno al 0.5 % (p/v) (Anexos I y II). Los tubos y el frasco se etiquetan previamente indicando los siguientes datos: Número de la fermentación, número del equipo, fecha, hora del muestreo y nombre de la persona que muestreó.

En el Anexo IV se presenta el diseño de los fermentadores que se emplearán para esta práctica.

1. La fermentación inicia cuando se inocula asépticamente el mosto con 35 mL del cultivo de 48 h de *Saccharomyces cerevisiae*, con una pipeta estéril de 10 mL, a través del orificio central con rosca con ayuda de un embudo estéril. Se flamea la abertura con un mechero bunsen y se coloca asépticamente el tapón de acero inoxidable con rosca. Se anota la fecha y la hora exactas del inicio de la fermentación.

10. Muestreo

1. En este momento se conecta asépticamente el tubo flexible estéril de 45 cm en la salida para toma de muestra, y se cierra a 5 cm del borde de la manguera con una pinza Mohr con rosca. Se mezcla el mosto inoculado sobre una parrilla de agitación y se toma una alícuota de 15 mL con una jeringa estéril en condiciones asépticas, absorbiendo por debajo del nivel del fermentador. De esta muestra, 3 mL se vierten en un tubo de ensayo con tapón roscado estéril, y 12 mL se vierten en un frasco de muestreo (Anexo IV).
2. Después del muestreo se cierra el tubo con la pinza Mohr, se sacude el tubo y se sumerge en una solución de Na_2SO_4 (50 mg/L) contenida en un tubo de cultivo mediano sin rosca, durante 10 min (Anexo IV).
3. El fermentador se coloca en un baño maría con temperatura controlada, muestreando posteriormente en condiciones asépticas. Se anota primero la apariencia del mosto: color, turbidez, intensidad de burbujeo, formación de natas y/o sedimentos. Posteriormente el mosto se agita sobre una parrilla eléctrica a temperatura ambiente, se toman 15 mL que se vierten en el frasco de muestreo y en el tubo, como se indicó previamente, anotando la hora exacta. Las muestras se congelan (Anexo IV).

11. Análisis de la muestra

Los análisis se realizan de acuerdo a las técnicas que se presentan en el Anexo II, utilizando los reactivos preparados en el Anexo I. Se determinarán los siguientes parámetros en cada muestra:

1. Cuento diferencial de levaduras viables y no viables por tinción simple con azul de metileno.
2. Azúcares reductores
3. Grado alcohólico

12. Evaluación sensorial de los productos

Consiste en la degustación del producto entre los integrantes de todos los equipos y se realizará una encuesta con escala hedónica para su evaluación o se complementará una ficha de cata (Anexo III).

13. Elaboración del reporte

1. Elaborar un diagrama de flujo del proceso.

2. Tablas de resultados

1. Tablas de resultados 1 Se presentan los resultados directos de los análisis de azúcares reductores, de grado alcohólico.
2. Tabla de resultados 2. Conteo de levaduras viables y no viables de todas las muestra y de cada condición de cultivo ($T^{\circ}\text{C}$), indicando además las alícuotas y diluciones manejadas en cada análisis.
3. Tabla de resultados 3. Anotar los datos de la curva estándar que se realizó en el análisis de los azúcares reductores, junto con la ecuación de la curva ajustada y el coeficiente de regresión.
4. Tabla de resultados 4 Se anotan los datos calculados de cada condición de cultivo ($T^{\circ}\text{C}$): resultados de los conteos de levaduras viables y totales (viables + no-viables) en unidades de log (# levaduras/mL) y ln (# levaduras/mL).
5. Tabla de resultados 5.; Concentración de azúcares reductores en % (p/v), y contenido alcohólico, en % (v/v).

3. Gráficas

1. Utilizando los datos calculados de las Tablas de resultados 4 y 5 se realizarán las gráficas indicadas en los siguientes incisos, con ayuda del programa de computación Excel, para graficar los datos.
2. Gráficas por cultivo. Se presentará una gráfica por cada cultivo realizado a diferente temperatura (Figs. 1 y 2), indicando en abscisas el tiempo en h; y en las ordenadas, el contenido alcohólico en % (v/v), la concentración de azúcares reductores en % (p/v), y el conteo de levaduras totales en log (número de microorganismos/mL), o ln (número de microorganismos/mL).
3. Gráfica de crecimiento microbiano. Se presentarán en una sola figura (Figura 3), las curvas de crecimiento microbiano contra tiempo, de los cultivos provenientes de dos niveles de temperatura. En esta gráfica se evaluará el efecto de la temperatura en cada fase de las curvas de crecimiento microbiano.
4. Gráficas de consumo de azúcares reductores. De manera similar a las anteriores, se presentará en una sola figura (Figura 4) las curvas de contenido de azúcares reductores (% (p/v)) contra el tiempo de las dos fermentaciones.
5. Gráficas de producción de alcohol. En una sola figura (Figura 5) se presentarán las curvas de formación de alcohol de las dos fermentaciones, indicando en las abscisas el tiempo en h, y en las ordenadas el contenido alcohólico en % (v/v).

4. Parámetros cinéticos

1. Estos se llevarán a cabo después de calcular las ecuaciones ajustadas de línea recta en cada cultivo, utilizando solo los datos que corresponden a la fase exponencial de las Tablas de resultados No. 4 y 5. Las ecuaciones ajustadas y los parámetros cinéticos que se indican a continuación se escribirán en el Tabla No. 6.
2. Tasas de rendimiento. Tomando los datos máximos y mínimos de los parámetros de cada cultivo, se calcularán las tasas de rendimiento de producto con respecto a sustrato, de biomasa con respecto a sustrato y de producto con respecto a biomasa.
3. Con los datos ajustados de la fase exponencial de las curvas de levaduras viables se calculará la velocidad específica de crecimiento microbiano. Con datos obtenidos en el mismo intervalo de tiempo, se calcularán las tasas específicas de consumo de sustrato y de formación de producto (valores ajustados). Con base en un análisis de la gráfica de producción de alcohol se calcularán los valores de productividad máxima y productividad total de etanol. Cada equipo calculará los parámetros de su cultivo, y se intercambiarán los resultados con el equipo que trabajo a diferente temperatura.
4. Analice los resultados de las Tablas No. 4 y 5 y de las Figs. 1 y 2 y explique las fases de las curvas de crecimiento microbiano y las fases de producción, con especial énfasis en la fase exponencial de crecimiento y la tropofase para etanol. Con base a estas observaciones se decidirá a qué modelo de formación de producto pertenece cada cultivo.
5. Analice las curvas de las Figs. 3 y 4 y los parámetros cinéticos calculados para determinar el efecto de la temperatura en las tasas de consumo del sustrato y formación de etanol, y sus rendimientos. Compare los resultados experimentales con los de la bibliografía.

Cuestionario

1. Describe las condiciones óptimas para el desarrollo de *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Indica y explica cuáles son las enzimas que participan en la vía metabólica de la levadura para la obtención de los productos principales.
3. Con base a los resultados obtenidos explica el efecto de la temperatura en la cinética de la fermentación alcohólica.
4. ¿Cuáles son los puntos críticos o de riesgo que encuentre en esta práctica que influyan en el resultado?

Practica 7

Elaboración y análisis de un vino de frutas

Vieja madera para arder, viejo vino para beber, viejos amigos en quién confiar y viejos autores para leer”.

(Sir Francis Bacon)

Objetivo

El alumno identificará los parámetros a controlar en una fermentación alcohólica para producir un vino de frutas.

Introducción

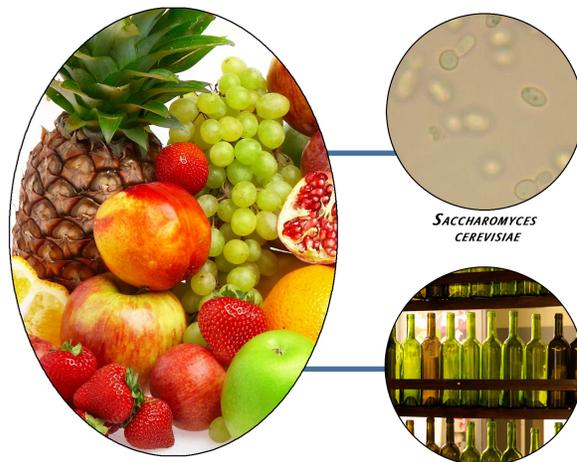
La elaboración de un vino de fruta se realiza mediante una fermentación alcohólica (Práctica No. 1) dónde se explica en qué consiste dicha fermentación.

El hecho de emplear una materia prima para la fermentación alcohólica implica el estudio de diversos frutos que presenten ciertas características que los hagan susceptibles a la fermentación. Por lo que las materias primas a utilizar deberán contener los azúcares adecuados para ser transformados en alcohol etílico, CO₂ y agua.

Existen frutos como el mango, la guanábana, la pera la manzana, la uva entre otros que son utilizados solos o en mezclas para la elaboración de un vino. El caso de la manzana es para la elaboración de la sidra la cual puede ser mezclada con pera, en el caso de la uva da como resultado el vino conocido como de mesa.

Las características que estas materias primas deben de tener es una cierta cantidad de azúcares que se ven reflejados en el parámetro de grados Brix, aproximadamente de un 24-26 °Bx es un valor adecuado para obtener un 12% (v/v) de alcohol.

En el desarrollo de esta práctica se indicarán los pasos para la elaboración de este producto así como los análisis que correspondan según la normatividad existente.



Materiales y Equipos

Materiales de Casa	Equipo
1 kg o 1 ½ kg de fruta 1 frasco de vidrio de boca ancha (mayonesa). 5 frascos de vidrio de papilla para bebé Sal Algodón Cerillos o encendedor Cinta adhesiva de enmascarar (masking tape) Cuaderno de registros Detergente Papel aluminio Papel sanitario Papel estraza Bolígrafo Marcador negro, o azul o verde Reloj Cubrebocas Tela pañalina Tijeras 1 lienzo de franela o algodón Plástico (película de polietileno)	1 Incubadora 1 balanza analítica 1 potenciómetro 1 microdestilador Kjeldahl
Materiales	Reactivos
1 espátula pequeña de acero inoxidable. 1 asa bacteriológica 2 embudos de 7 cm de diámetro 1 matraz Erlenmeyer de 500 mL 2 matraces volumétricos de 1 L 1 matraz volumétrico de 100 mL 1 mechero Fisher 1 mechero bunsen 1 piceta de agua agitador de vidrio 1 pipetas graduadas de 1 mL 1 pipeta volumétrica de 25 mL 2 pipetas volumétricas de 10 mL 3 matraces Erlenmeyer de 500 mL 1 probeta de 500 mL 1 probeta de 100 mL 1 tubo en T de vidrio 1 termómetro de -10 a 50°C 2 vasos de precipitados de 50 mL 1 vaso de precipitados de 600 mL 1 bureta de 100 mL 1 soporte universal 1 pinzas para soporte	Alcohol Etílico Soluciones Buffer 4 y 7 Dicromato de Potasio 0.114M Ácido Sulfúrico concentrado Sulfato Ferroso Amoniacal 0.35M Orto fenantrolina ferroso Sulfato ferroso heptahidratado

Procedimiento

1. Preparación de cultivos iniciadores

Opción 1

1. Se inocularán con 2 a 3 asadas de *Saccharomyces cerevisiae* (**Cultivo de la colección NRRL (Northern Regional Research Laboratory USDA, USA)**) en 100 mL de Caldo Dextrosa Sabouraud (Anexo I) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.
2. Se incubará a 30°C durante 2 días

Opción 2

Comprar levadura de panificación liofilizada y reactivarla en un poco de mosto de la materia prima a emplear.

2. Preparación de materiales de muestreo

1. Se colocan 4 pipetas graduadas de 10 mL en un cilindro y se esterilizan.
2. En casa se hierven en baño maría los frascos de muestreo (120 mL), durante 30 min. Después se retiran del agua con precaución, se escurren, se cierran y se dejan enfriar lentamente. En el laboratorio se lava cuidadosamente un frasco de vidrio de 3.5 L con su tapa, dando un último enjuague con agua destilada, se deja secar y se cierra.

Se prepararán 1 L de dicromato de potasio 0.114M y 1 L de sulfato ferroso amoniacal 0.35M (Anexo IV).

3. Preparación de los frutos

1. Una vez elegida la materia prima se tomará la decisión de sólo cortar o triturar dependiendo de la presentación final del producto, creando un mosto si fuera necesario se adicionará un poco de agua potable para que la pulpa o mosto no esté muy espeso.
2. La materia prima ya lista se colocará en fermentadores de vidrio preferentemente con boca ancha para poder manipular e introducir el mosto.

4. Fermentación

1. Al colocar el mosto no se debe dejar espacio de cabeza muy grande, aproximadamente 10 cm para que el CO₂ generado pueda salir y se cubrirá la boca del fermentador con un plástico auto adherible este llevará pequeños orificios para la liberación del gas carbónico.
2. Se medirá el pH del mosto y se ajustará con NaOH o H₂SO₄ (Anexo II).
3. Se inoculará una asada de *Saccharomyces cerevisiae* (Anexo I) o se adiciona aproximadamente el 3% (p/v) de levadura comercial. Se homogeniza el mosto perfectamente.
4. Se dejarán los fermentadores en gaveta y se deben monitorear para evitar derrames.
5. Se tomarán muestras aproximadamente 100 mL en frascos de vidrio con pipetas estériles para poder analizar posteriormente el incremento del contenido alcohólico, así como la acidez volátil y total (Anexo II).
6. Al término de la fermentación, se pondrá en refrigeración el fermentador por un periodo de 3 a 5 días y después se retirarán los sólidos por decantación. Si el producto todavía tuviera sólidos en suspensión entonces se volverá a someter a refrigeración el tiempo que sea necesario.
7. Una vez clarificado el producto se degustará realizando una evaluación sensorial con todo el grupo para poder detectar aspectos benéficos o defectos al producto. (Anexo III).

5. Análisis de las muestras

En una bebida alcohólica se miden diversos parámetros según la normatividad que le aplique, los más usuales son contenido alcohólico, acidez total, acidez volátil y azúcares (Anexo I y II)

6. Evaluación sensorial de los productos

Consiste en la degustación del producto entre los integrantes de todos los equipo y se realizará una encuesta con escala hedónica para su evaluación o se complementará una ficha de cata (Anexo III)

7. Elaboración del Reporte

1. Elaborar un diagrama de flujo del proceso.
2. Elaboración de una ficha técnica: Con base en la información obtenida de los análisis fisicoquímicos se elaborará un reporte o ficha técnica donde se vacíen los resultados de los análisis.
3. Interprete los resultados en base a las normatividades que rijan a este producto, la interpretación deberá considerarse como un resultado oficial simulando que será entregado a la empresa responsable de la elaboración de ese producto.
4. Elabore una descripción del producto desde el punto de vista sensorial basándose en la ficha de cata o se complementará una ficha de cata (Anexo III).

Cuestionario

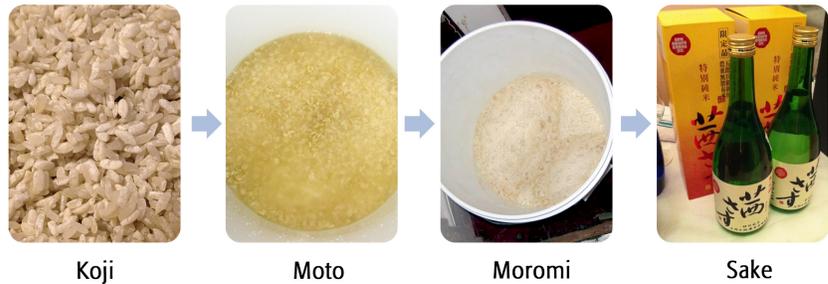
1. ¿Qué es una ficha técnica?
2. ¿En qué consiste la interpretación de resultados y qué objetivo tiene?
3. ¿Con qué aspectos debe contar la materia prima a utilizar para la elaboración de una bebida alcohólica?
4. ¿Cuáles son las condiciones óptimas para llevar a cabo la fermentación alcohólica?
5. ¿Cuál es la vía metabólica que se lleva a cabo para la obtención de etanol, CO_2 y qué microorganismo (s) son los indicados para dicha fermentación?

Práctica 8

Elaboración y caracterización de sake

“¿Me preguntas por qué compro arroz y flores? Compro arroz para vivir y flores para tener algo por lo que vivir.”

(Confucio)



Objetivo

El alumno descubrirá en la elaboración de sake un ejemplo de técnicas combinadas de cultivo de microorganismos, sólido y líquido (sumergido).

Introducción

El Sake es la bebida alcohólica tradicional del Japón que se obtiene del arroz no glutinoso, con una concentración de alcohol de *circa* 16 % (v/v) con una fragancia característica un sabor dulce y ligeramente ácido (Duffus y Slaughter, 1985). Se emplean granos de arroz largo sin cascavilla y pulido hasta eliminar entre un 30-60% de su peso para remover proteínas y compuestos inorgánicos. El componente principal del grano de arroz es el almidón, pero aparte de esto, las capas exteriores y el germen de arroz integral contienen muchos nutrientes, como proteínas, grasas, minerales y vitaminas. Estos nutrientes son importantes para la proliferación de los mohos y levaduras, lo que conlleva a velocidades excesivas de crecimiento causando desequilibrio en el proceso de fermentación, lo cual es perjudicial para el color, aroma y sabor del sake. Por esta razón, no sólo es el germen eliminado, sino también el exterior con el fin de reducir los niveles de proteínas, grasas, minerales y vitaminas. Esto se conoce como pulir o moler, pero la cantidad de material eliminado es mucho mayor que con el arroz pulido para su uso en la cocina. Para ser adecuado en la elaboración de sake, el arroz debe ser absorbente de agua, resistente al vapor, de fácil conversión durante el proceso Koji y también debe ser soluble en el Moromi y contener poca proteína (Japan Sake & Shochu Makers Association, 2011).

“Koji”, es el cultivo iniciador de la elaboración de sake, se prepara mediante un cultivo en estado sólido de *Aspergillus oryzae* sobre granos de arroz cocido al vapor, con el objetivo de hidrolizar enzimáticamente el almidón (sacarificación). Koji es el equivalente a la malta en el proceso de elaboración de cerveza. Koji se mezcla con arroz cocido y agua donde se produce o se añade ácido láctico y se le adiciona levaduras a este cultivo iniciador se le conoce como “Moto”. La elaboración del Moto se puede dividir en aquellos que utilizan bacterias ácido lácticas (BAL) para producir el ácido láctico o bien añadirlo (solución 90% (v/v)) directamente a la masa. Sake elaborado con BAL es un producto con un sabor más complejo y rico debido a las interacciones microbianas que producen péptidos que contribuyen al sabor (Japan Sake & Shochu Makers Association, 2011). En el proceso tradicional el proceso de sacarificación (Koji) y la producción de alcohol por *Saccharomyces sake* procede fácilmente y simultáneamente en el tanque de fermentación. En esta etapa llamada “Moromi” se alcanza una alta concentración de alcohol (más de 20% (v/v)) (Oishi *et al.*, 1992).

Materiales y equipos

Materiales de casa	Equipo
1 kg de arroz sin cascarilla y de grano largo 1 recipiente de plástico de 3 a 5 L de capacidad 1 coladera de cocina 1 lienzo de algodón o pañalina de aproximadamente 3 metros 1 olla de presión 1 botella de vidrio con tapón de corcho o tapa de rosca de 1 L Algodón Cerillos o encendedor Cinta adhesiva de enmascarar (masking tape) Cuaderno de registros Detergente Papel aluminio Papel sanitario Papel estraza Bolígrafo Marcador negro, o azul o verde Reloj Cubrebocas Tela pañalina Tijeras 1 lienzo de franela o algodón	2 Balanzas granatarias 2 Balanzas analíticas 2 Autoclaves con base, canastilla y válvula 1 Incubadora 1 Refrigerador 3 parrillas con calentamiento y agitación 1 microscopio óptico 1 Potenciómetro 1 espectrofotómetro
Materiales	Reactivos
1 termómetro 1 matraz Erlenmeyer de 2000 mL 9 matraces Erlenmeyer de 250 mL 1 matraz Erlenmeyer de 100 mL 1 vaso de precipitados de 1 L 1 probeta de 50 mL 3 espátulas 4 agitadores magnéticos 1 frasco de dilución 3 pipetas graduadas de 1 mL 2 pipetas graduadas de 5 mL 1 cámara de Neubauer Cubreobjetos Papel seda 1 pipeta Pasteur 1 propipeta 1 piceta con agua destilada 3 tubos con tapón de rosca 1 bureta de 25 mL 1 pinzas para bureta 1 soporte 3 vasos de precipitados de 25 mL Celdas de vidrio para espectrofotómetro 1 gradilla para tubos 16 Tubos de ensaye de vidrio	Caldo dextrosa Sabouraud Agar Papa Dextrosa Caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) Tween 80 Fenol H_2SO_4 Glucosa Soluciones tampón pH 4 y pH 7. NaOH

Procedimiento

1. Preparación del arroz

1. Se utilizarán granos de arroz sin cascarilla pulido de grano largo (1 kg) se dejan remojando en agua a 10 a 15°C por 15 h. El arroz debe absorber el 30% (p/v) de su peso en agua.
2. Se filtran en una coladera de cocina eliminando el exceso de agua, se lava perfectamente hasta que el agua de lavado sea incolora.
3. Se adiciona un volumen de agua y se cocina al vapor en una olla de presión (121°C durante 10 min).

2. Preparación de cultivos iniciadores

Aspergillus oryzae (Cultivo de la colección NRRL (Northern Regional Research Laboratory USDA, USA))

1. Se inocularán con *A. oryzae* por picadura 75 mL de agar papa dextrosa (Anexo I) en matraces Erlenmeyer de 250 mL.
2. Se incubará a 30°C durante 5 a 7 días o hasta que sea abundante la esporulación.
3. Se empleará solución 0.1% (v/v) de Tween 80 para preparar la suspensión de esporas mediante agitación mecánica en parilla con un agitador magnético.
4. Se determinará el número de esporas mediante conteo directo al microscopio en cámara de Neubauer (Anexo II).

Saccharomyces cerevisiae (Cultivo de la colección NRRL (Northern Regional Research Laboratory USDA, USA))

1. Se inocularán con 2 a 3 asadas de *S. cerevisiae* en 100 mL de caldo dextrosa Sabouraud (Anexo I) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.
2. Se incubará a 30°C durante 2 días.

Lactobacillus sake (Cultivo de la colección NRRL B (Northern Regional Research Laboratory USDA, USA))

1. Se inocularán con 2 a 3 asadas de *L. sake* en 50 mL de caldo MRS (Anexo I) en un matraz Erlenmeyer de 100 mL.
2. Se incubará a 30°C durante 1 día.

3. Cultivo en medio sólido: Koji

1. Aproximadamente un 20% del arroz cocido se coloca en un matraz Erlenmeyer a formar una capa delgada que cubra totalmente el fondo, se inocula con esporas de *A. oryzae* hasta tener 1×10^6 esporas/g de arroz.
2. Se incuba a 30°C durante 48 h o hasta que el micelio (color blanco) cubra los granos de arroz.

4. Preparación de Moto

1. Mezclar el Koji (20%) con el resto del arroz cocido (80%) y agua (130% (v/p) con respecto al arroz).
2. Inocular con un 5% (v/p) de la suspensión celular de *L. sake*, mezclar.
3. Incubar la mezcla a 30°C durante 336 horas.
4. Tomar una muestra y determinar pH y acidez total titulable (expresada como ácido láctico).

5. Preparación de Moromi

1. Inocular con un 10% (v/p) de la suspensión celular de *S. cerevisiae*, mezclar.
2. Incubar la mezcla a 30°C durante 336 horas, mezclar cada 48 h tomando una muestra de 50 mL cada vez para determinar azúcares solubles totales y alcohol.

6. Sake

1. El Moromi es filtrado a través de un lienzo de algodón (pañalina) para remover levaduras, residuos de Koji y arroz.
2. Este sake joven contiene todavía levaduras y partículas suspendidas (almidón) por lo que se deja reposar en una botella de vidrio con tapón de corcho por una semana.
3. Se filtra nuevamente el sake y se pasteuriza a una temperatura de 60-65°C para inactivar enzimas remanentes de la fermentación.

4. Se almacena a 15°C por aproximadamente 3 meses a 1 año para madurar y ajustar la fragancia.

7. Análisis de muestras

Se realizarán las siguientes determinaciones siguiendo los procedimientos que se presentan en el Anexo II.

7.1. pH

7.2. Determinación de la acidez total titulable

7.3. Determinación de carbohidratos solubles totales.

7.4. Determinación del contenido de alcohol.

8. Elaboración del reporte

1. Realizar un diagrama de flujo del proceso de elaboración de sake
2. Elaborar una tabla donde se presente el pH y acidez de la fermentación Moto.
3. Elaborar gráficas de contenido de carbohidratos solubles, alcohol a través del tiempo de fermentación en Moromi.
4. Realizar una evaluación sensorial en donde deberás describir los siguientes parámetros dulzor, acidez, etc contestando el cuestionario (Anexo III).

Cuestionario

1. ¿Qué microorganismos son los cultivos iniciadores que se emplean en cada etapa? Explica las características que le confieren al producto.
2. ¿Qué enzimas intervienen en el proceso de sacarificación en la etapa Koji para la elaboración de sake?
3. ¿Qué modificaciones propondrías para mejorar el proceso de elaboración del sake? Explica en cada caso.
4. Explica qué tienen en común el proceso de elaboración de cerveza y sake.

Práctica 9

Elaboración y caracterización de cerveza

*“Todo está en el estado mental.
Porque muchas carreras se han perdido antes de haberse
corrido, y muchos cobardes han fracasado, antes de haber
su trabajo empezado.”*
(Rudyard Kipling)

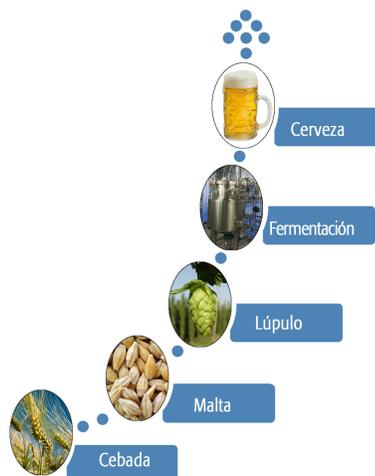
Objetivo

El alumno identificará las principales variables del proceso de elaboración de cerveza.

Introducción

La cerveza es la bebida resultante de la fermentación alcohólica, mediante levaduras seleccionadas, de un mosto procedente de malta de cebada, sola o mezclada con otros productos amiláceos transformables en azúcares por digestión enzimática, adicionado con lúpulo y/o sus derivados y sometido a un proceso de cocción. La malta puede ser sustituida por malta de cereales, granos crudos que contengan féculas, así como azúcares, siempre que las sustancias añadidas no excedan del 50% en masa de la materia prima utilizada”.

En la cerveza, la buena calidad de cada uno de sus ingredientes es indispensable para la obtención de un buen producto final. El agua es un elemento esencial en su elaboración, por lo que debe de pura, potable, estéril, libre de sabores y olores extraños. La cebada es el cereal que facilita el malteado, su grano es rico en extracto y bajo en proteínas. El sabor amargo tan característico de la cerveza se lo debemos al lúpulo, una planta trepadora del género de las *Cannabinaceas*, originaria de Japón. La flor del lúpulo es también la responsable de su intenso aroma, además de contribuir a la estabilidad de la espuma, esa corola blanca, espesa y consistente, que caracteriza a una cerveza bien servida (Brányik *et al.*, 2012).



Materiales y equipos

Materiales de casa	Equipo
1 kg de cebada 1 recipiente de plástico de 3 a 5 L de capacidad 1 coladera de cocina 1 lienzo de algodón o pañalina de aproximadamente 3 metros 1 olla de presión 1 botella de vidrio con tapón de corcho o tapa de rosca de 1 L Algodón Cerillos o encendedor Cinta adhesiva de enmascarar (masking tape) Cuaderno de registros Detergente Papel aluminio Papel sanitario Papel estraza Bolígrafo Marcador negro, o azul o verde Reloj Cubrebocas Tela pañalina Tijeras 1 lienzo de franela o algodón Plástico (película de polietileno)	2 Balanzas granatarias 2 Balanzas analíticas 2 Autoclaves con base, canastilla y válvula 1 Incubadora 1 Refrigerador 3 parrillas con calentamiento y agitación 1 microscopio óptico 1 Potenciómetro 1 espectrofotómetro
Materiales	Reactivos
1 termómetro 1 embudo Büchner 1 matraz Kitasato de 1 L 1 matraz Erlenmeyer de 2000 mL 9 matraces Erlenmeyer de 250 mL 1 matraz Erlenmeyer de 100 mL 1 vaso de precipitados de 1 L 1 probeta de 50 mL 3 espátulas 4 agitadores magnéticos 1 frasco de dilución 3 pipetas graduadas de 1 mL 2 pipetas graduadas de 5 mL 1 cámara de Neubauer Cubreobjetos Papel seda 1 pipeta Pasteur 1 propipeta 1 piceta con agua destilada 3 tubos con tapón de rosca 1 bureta de 25 mL 1 pinzas para bureta 1 soporte 3 vasos de precipitados de 25 mL Celdas de vidrio para espectrofotómetro 1 gradilla para tubos 16 Tubos de ensaye de vidrio	Caldo dextrosa Sabouraud Agar Papa Dextrosa Caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) Tween 80 Fenol H_3PO_4 concentrado Glucosa Soluciones tampón pH 4 y pH 7. NaOH

Procedimiento

1. Proceso de Malteado

1. La cebada se limpiará para eliminar piedras, fragmentos de metal y residuos de la cosecha. Se clasificarán según el tamaño para asegurar una adecuada germinación y modificación durante el malteado.
2. La cebada se sumergirá en agua (*circa* 12-15 °C) por 36 a 48h para aumentar el contenido de humedad del grano hasta un 45% (p/v). Se cambiará el agua cada 24 h, dejando entre intervalos de cambios de agua los granos escurridos al aire libre por 6 a 8 h.
3. El grano se filtrará para eliminar el exceso de agua y se dejará germinar *in situ* en una charola extendiendo los granos en una cama delgada a una temperatura de 10 a 21°C durante *circa* 6 días. Durante la germinación, enzimas endógenas hidrolizan proteínas, alfa-glucanos y hemicelulosa en la pared celular de la cebada.
4. La germinación se dará por concluida cuando las raicillas de la cebada se desarrollan pero no brotan.

2. Secado y tostado de la malta

1. La malta se secará a una temperatura entre 50°C durante 24 h. El propósito de secar la malta es reducir el contenido de humedad de una manera controlada a 4 a 5% (p/v). Asimismo detiene la actividad enzimática y el desarrollo del embrión para asegurar que no haya pérdidas por crecimiento y respiración. El tiempo y temperatura de secado determinan el color y aroma de las maltas dando lugar a diferentes tipos de cervezas.
2. Posteriormente se eliminarán las raicillas que hubieran brotado frotando los granos entre ellos. Se molerá hasta que pase por malla 60.

3. Sacarificación

1. Se colocarán 5 L de agua acidificándose con ácido fosfórico concentrado hasta pH 6 se calentará a 40°C.
 2. Se agregará lentamente y agitando 1kg de malta molida, se elevará la temperatura a 50°C por 1 h. Posteriormente se elevará nuevamente la temperatura hasta 65°C por 1 h, seguida de un incremento a 70°C por 30 min.
 3. Este mosto será filtrado en papel Whatman No. 1 o 4 en un embudo Büchner.
 4. Los sólidos serán lavados con agua caliente hasta completar el volumen inicial (1L). Esta agua de lavado será filtrada.
 5. Al mosto filtrado se le adicionará el extracto de lúpulo (0.175g es opcional) se calentará a 90°C durante 1 h en agitación.
4. Preparación de cultivos iniciadores

Saccharomyces cerevisiae

1. Se inocularán con 2 a 3 asadas de *S. cerevisiae* en 100 mL de caldo dextrosa Sabouraud (Anexo I) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.
2. Se incubará a 30°C durante 2 días.

5. Fermentación

1. Se colocará el mosto en el fermentador (Anexo III) a una temperatura de 12°C inoculando con 5% (v/v) del cultivo de *S. cerevisiae* durante 1 semana cuidando la producción de CO₂.
2. Se tomará una muestra cada 24 h cuidando la presión del CO₂ producido.
3. Una vez concluida la fermentación se disminuye la temperatura a 6°C se deja reposando por 2 días.
4. Se separa la levadura sedimentada

6. Maduración

1. Se colocará la cerveza a madurar en el fermentador a una temperatura de 12°C por 1 semana cuidando la producción de CO₂.
2. Se disminuirá la temperatura a -1°C durante 2 días, separando la levadura que se sedimenta.
3. En estas condiciones se puede madurar la cerveza hasta 3 semanas.

7. Análisis de la muestra

Los análisis se realizan de acuerdo a las técnicas que se presentan en el Anexo II, utilizando los reactivos preparados en el Anexo I. Se determinarán los siguientes parámetros en cada muestra:

1. Cuento diferencial de levaduras viables y no viables por tinción simple con azul de metileno.
2. Azúcares reductores
3. Grado alcohólico

8. Evaluación sensorial de los productos

Consiste en la degustación del producto entre los integrantes de todos los equipos y se realizará una encuesta con escala hedónica para su evaluación o se complementará una ficha de cata (Anexo III).

9. Elaboración del reporte

1. Elaborar un diagrama de flujo
2. Tablas de resultados
 1. Tablas de resultados 1 Se presentan los resultados directos de los análisis de azúcares reductores, de grado alcohólico.
 2. Tabla de resultados 2. Cuento de levaduras viables y no viables de todas las muestras, indicando las alícuotas y diluciones manejadas en cada análisis.
 3. Tabla de resultados 3 Se anotan los datos calculados: resultados de los conteos de levaduras viables y totales (viables + no-viables) en unidades de log (número de levaduras/mL) y ln (número de levaduras/mL).
 4. Tabla de resultados 4.; Concentración de azúcares reductores en % (p/v), y contenido alcohólico, en % (v/v).

3. Gráficas

Utilizando los datos calculados de las Tablas de resultados 3 y 4 se realizarán las gráficas indicadas en los siguientes incisos, con ayuda del programa de computación Excel, para graficar los datos.

1. Gráficas por cultivo. Se presentará una gráfica indicando en las abscisas el tiempo en h; y en las ordenadas, el contenido alcohólico en % (v/v), la concentración de azúcares reductores en % (p/v), y el conteo de levaduras totales en log (número de microorganismos/mL), o ln (número de microorganismos/mL).
 2. Gráfica de crecimiento microbiano. Se presentarán en una sola figura, las curvas de crecimiento microbiano contra tiempo, de los cultivos provenientes de dos niveles de temperatura. En esta gráfica se evaluará el efecto de la temperatura en cada fase de las curvas de crecimiento microbiano.
 3. Gráficas de consumo de azúcares reductores. De manera similar a las anteriores, se presentará en una sola figura la curva de contenido de azúcares reductores (%) contra el tiempo de la fermentación.
 4. Gráficas de producción de alcohol. Se presentará la curva de formación de alcohol, indicando en las abscisas el tiempo en h, y en las ordenadas el contenido alcohólico en % (v/v).
- ### 4. Parámetros cinéticos
1. Estos se llevarán a cabo después de calcular las ecuaciones ajustadas de línea recta, utilizando solo los datos que corresponden a la fase exponencial de las Tablas de resultados No. 2 y 3. Las ecuaciones ajustadas y los parámetros cinéticos que se indican a continuación se escribirán en el Tabla No. 5.
 2. Tasas de rendimiento. Tomando los datos máximos y mínimos de los parámetros de cada cultivo, se calcularán las tasas de rendimiento de producto con respecto a sustrato, de biomasa con respecto a sustrato y de producto con respecto a biomasa.
 3. Con los datos ajustados de la fase exponencial de las curvas de levaduras viables se calculará la velocidad específica de crecimiento microbiano. Con datos obtenidos en el mismo intervalo de tiempo, se calcularán las tasas específicas de consumo de sustrato y de formación de producto (valores ajustados). En base a un análisis de la gráfica de producción de alcohol se calcularán los valores de productividad máxima y productividad total de etanol. Cada equipo

calculará los parámetros de su cultivo, y se intercambiarán los resultados con el equipo que trabajo a diferente temperatura.

4. Analice los resultados y explique las fases de las curvas de crecimiento microbiano y las fases de producción, con especial énfasis en la fase exponencial de crecimiento y la tropofase para etanol. Con base a estas observaciones se decidirá a qué modelo de formación de producto pertenece cada cultivo.
5. Analice las curvas y los parámetros cinéticos calculados para determinar el efecto de la temperatura en las tasas de consumo del sustrato y formación de etanol, y sus rendimientos. Compare los resultados experimentales con los de la bibliografía.

Cuestionario

1. Explica ¿qué determinaciones de control de calidad se realizan a la malta?
2. Además de las cebadas ¿qué granos se emplean en la elaboración de cerveza qué características les confiere?
3. ¿Cuántos tipos de cerveza existen y qué diferencias existen entre ellas?
4. ¿Qué modificaciones se llevan a cabo en cada etapa del proceso de elaboración de cerveza? Explica en cada caso.

Capítulo 6. Fermentación acética

Práctica 10

Determinación del efecto de la aireación en la fermentación acética

“Un mal escritor puede llegar a ser un buen crítico, por la misma razón que un pésimo vino también puede llegar a ser un buen vinagre.”

(François Mauriac)



Objetivo

El alumno identificará el efecto de la aireación en la producción de ácido acético.

Introducción

El vinagre se forma a partir de mostos alcohólicos, por transformación del etanol en ácido acético. También se forman pequeñas cantidades de aldehídos, ésteres y cetonas que contribuyen al aroma y sabor del producto (Acosta-Artiles *et al.*, 1993). Esta transformación la realizan las bacterias acéticas en un cultivo aerobio. Las bacterias acéticas son aerobias Gramnegativas o de Gram variable, elipsoidales a bacilares. En la actualidad se reconocen doce géneros en la familia Acetobacteraceae: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas*, *Gluconacetobacter*, *Asaia*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neoasaia*, *Granulibacter*, *Tanticharoeniay Ameyamaea* (Sengun y Karabiyikli 2011). El mosto alcohólico necesario para la elaboración de vinagre puede tener diferentes orígenes como: azúcar de caña, frutas, malta, miel, (Müller, 1981). A partir de mostos con 4.5 - 12% (p/v) de etanol se obtienen productos de 6- 12% (p/v) de ácido acético durante la fermentación. Después se ajusta la acidez diluyendo hasta un contenido de 3 - 4% (p/v), en la presentación comercial (Müller, 1981; Bázquez, 1993).

Existen varios tipos de vinagre que difieren de las materias primas empleadas y tecnologías de producción. Hay dos métodos de producción de vinagre: el tradicional y el sumergido. En este último, el tiempo de producción es más corto (24 a 48h), se lleva a cabo un control estricto de aireación, las bacterias se desarrollan en la superficie formando películas donde la concentración de oxígeno es más alta. En los métodos tradicionales, la oxidación inicia en un cultivo madre de vinagre que es no definido obtenido de un lote previo (retroalimentación) (Sengun y Karabiyikli 2011).

Las bacterias acéticas requieren un control muy eficiente de las condiciones ambientales y de la composición del medio, debido a que cuando la concentración de ácido acético es elevada ($\geq 6\%$, p/v) estas bacterias son severamente afectadas por las deficiencias de oxígeno disuelto, por los cambios bruscos de temperatura y por la escasez de sustrato. Estas bacterias también son sensibles a la fuerza de corte de los agitadores, por lo que se recomienda que la agitación provenga del burbujeo intenso del aire inyectado (Bázquez, 1993; Hakmat y Vortmeyer, 1992; Park, 1989).

Materiales y equipos

Materiales de casa	Equipo
1 charola profunda 1 trozo de hilaza blanca (3 m) Algodón Cerillos o encendedor Cinta adhesiva tipo masking Cuaderno de registros Detergente Papel aluminio Papel sanitario Papel estraza Bolígrafo Marcador negro, o azul o verde Reloj Cubrebocas Tela pañalina Tijeras 1 lienzo de franela o algodón.	1 Baño de temperatura controlada 1 Cronómetro 1 Flujómetro de burbuja de jabón de 60 mL 1 Fermentador aerobio con jarra de vidrio y tapa de acero inoxidable 1 Autoclave, 1 Canastilla para autoclave 1 Base para canastilla de autoclave 1 Balanza granataria digital 1 Bomba de aireación 1 Congelador 3 Parrillas de calentamiento y agitación electrorregulables 1 Potenciómetro 1 Refrigerador
Materiales	Reactivos
1 asa bacteriológica 2 barras de agitación magnéticas 2 embudos de 7 cm de diámetro 5 espátulas pequeñas de acero inoxidable 2 filtros esterilizables de Nylon 3 frascos de 120 mL de capacidad nominal con tapa de rosca 1 gradilla 1 jeringa esterilizable de 25 mL 1 jeringa esterilizable de 60 mL 2 matraces Erlenmeyer de 250 mL 1 mechero Fischer con manguera 1 mechero bunsen con manguera 1 piceta 1 pinza para bureta 3 pinzas tipo Mohr con tornillo (para manguera) 4 pipetas graduadas de 1 mL 1 pipeta graduada de 2 mL 3 pipetas graduadas de 10 mL 2 pipetas Pasteur 1 probeta de 250 mL 1 probeta de 1000 mL 1 soporte universal 1 tubo en T de vidrio 1 termómetro de -10 a 50°C 1 tramo de manguera para pecera de 30 cm de longitud 2 tramos de mangueras esterilizables Nalgene de 50 cm de longitud 3 tramos de manguera de esterilizable Nalgene de 15 cm de longitud 3 tubos de cultivo medianos con rosca 1 tubo de cultivo mediano sin rosca 2 vasos de precipitados de 50 mL 1 vaso de precipitados de 600 mL 1 vaso de precipitados de 1000 mL 1 cilindro de acero inoxidable para esterilizar pipetas	Acetato de sodio Citrato de amonio Etanol de 96% (v/v) Extracto de levadura Glucosa Agua destilada KH_2PO_4 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Peptona de caseína Soluciones amortiguadoras de referencia, pH 4.0 y 7.0 Solución de fenol 5% (p/v) Ácido sulfúrico concentrado Hidróxido de sodio Etanol 1 ampollita (inyectable) de vitaminas y minerales de cualquier marca comercial.

Procedimiento

Se evaluará el efecto de la intensidad de la aireación en la producción de ácido acético, manejando dos niveles de aireación (Tabla 5). El primer equipo de alumnos utilizará un fermentador sin aireación y el segundo equipo usará un fermentador con un sistema de aireación forzada. Se determinará la velocidad de aireación en el segundo. Cada equipo preparará su medio de cultivo y el inóculo de bacterias acéticas, con el nivel de aireación asignado. Se realizarán muestreos de acuerdo al cronograma propuesto, además de llevarse a cabo los análisis correspondientes. En la Figura 3 se presenta un resumen del procedimiento a seguir en la práctica.

Tabla 5. Niveles de aireación para la fermentación acética en medio alcohólico.

Equipo	Nivel de aireación (vvm*)
1	0
2	0.04 – 0.33

$$*L_{\text{aire}} / (L_{\text{medio}} \text{ min})$$

1. Preparación de cultivo iniciador

Acetobacter aceti (Cultivo de la colección NRRL B (Northern Regional Research Laboratory USDA, USA))

1. Se inocularán con 2 a 3 asadas de *Acetobacter aceti* en 100 mL de caldo de jugo de tomate-etanol estéril (Anexo I) en un matraz Erlenmeyer de 100 mL.
2. Se incubará a 30°C durante 2 días.

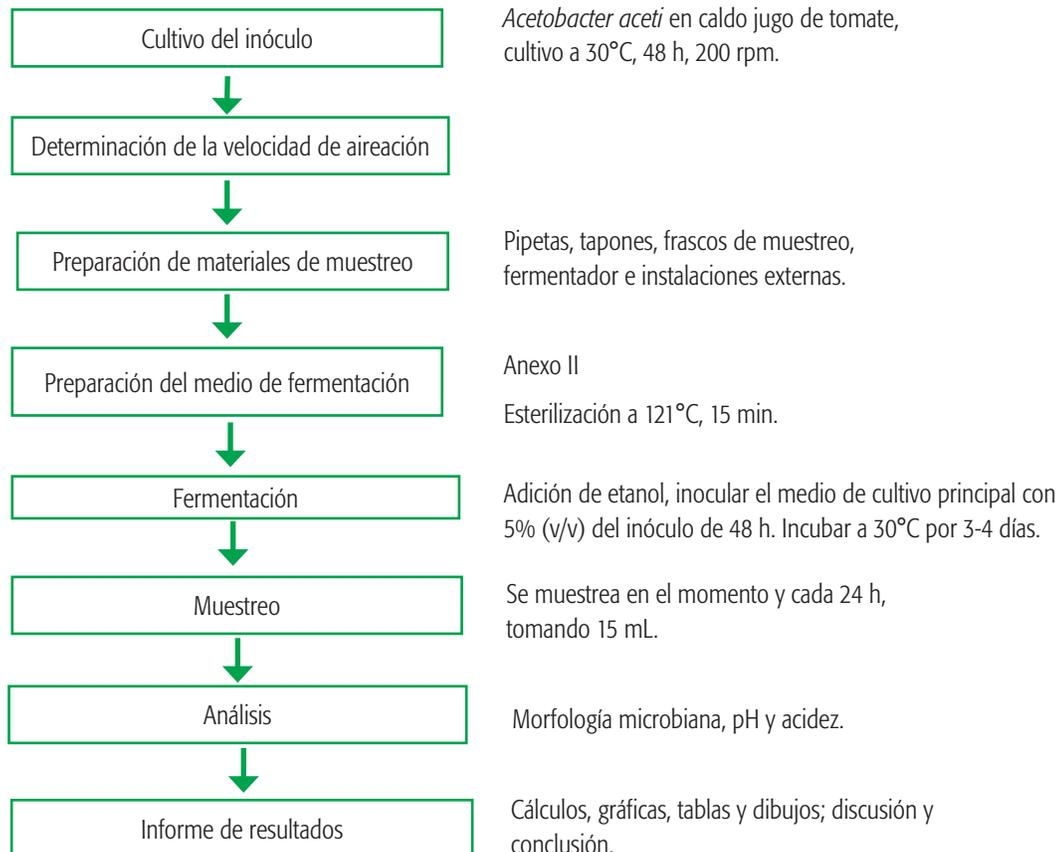


Figura 3. Diagrama de actividades para el desarrollo de la práctica de determinación del efecto de la aireación en la fermentación acética.

2. Preparación de materiales para fermentación y muestreo

1. Esta actividad se realiza antes de la fermentación principal. En casa se hierven durante 30 min 3 frascos de 120 mL, con sus respectivas tapas, en un baño maría.
2. Posteriormente, se retiran del agua con cuidado, se escurren sobre el agua hirviendo, se cierran inmediatamente con precaución, y se dejan enfriar lentamente. Estos se preparan uno o varios días antes de la fermentación.
3. Se esterilizan 3 pipetas graduadas de 10 mL, 3 tubos de ensayo con tapón roscado vacíos y un embudo chico, en autoclave a 121°C, durante 15 min.

3. Preparación de los fermentadores

En el Anexo IV se presenta el diseño de los fermentadores que se emplearán para esta práctica.

1. Para los fermentadores sin y con aireación forzada se preparan pequeños tapones de algodón largos y poco apretados, además se colocará gasa por fuera de las salidas amarrándolas con hilaza, que servirán para la esterilización del medio de cultivo.
2. A los orificios centrales del fermentador se les colocará tapones de algodón con gasa largos y poco apretados, además se amarrarán con hilaza. Después cubrir la tapa del fermentador con papel estraza antes de esterilizar.

4. Determinación del flujo de aireación

En el Anexo IV se muestra un diagrama del fermentador para determinar el flujo de aireación (Fig 7).

1. Para los fermentadores que requieran aireación forzada se armarán los 4 fermentadores, cada uno conteniendo 600 mL de agua.
2. Se conectará una manguera de Nalgene de 50 cm a la bomba de aireación, la cual se unirá a una manguera de pecera, con ayuda de una pipeta Pasteur corta. La manguera de pecera se conectará a la entrada del distribuidor de aire de 5 vías.
3. En una de las salidas del distribuidor se colocará otra manguera de pecera, varios fermentadores se pueden conectar a las otras salidas del distribuidor de aire. En el extremo de la manguera de pecera, se conectará un filtro de nylon, y en la salida del filtro se conectará una manguera de Nalgene de 50 cm.
4. En caso de encontrar algún problema al realizar las conexiones se puede flamear ligeramente el extremo de la manguera. Este procedimiento se puede aplicar cuando sea necesario.
5. Las mangueras de Nalgene de todos los fermentadores que vayan a compartir la misma bomba de aire se conectarán a uno de los tubos metálicos largos de cada fermentador.
6. En cada uno de los fermentadores se llevará a cabo la medición del flujo de aireación. En la salida de un tubo corto metálico del fermentador se unirá una manguera de Nalgene de 50 cm, en cuyo extremo se conectará un flujómetro de burbuja de jabón de 60 mL, sostenido con un soporte universal.
7. Todos los demás tubos de salida y entrada de los fermentadores se sellarán con tapones de algodón y gasa, ligeramente flojos, menos el otro tubo corto del fermentador al que le están midiendo el flujo. Este tubo se sellará con un tapón de hule delgado.
8. Comenzar el funcionamiento de la bomba y con las válvulas del distribuidor de aire se ajustarán los flujos de aireación de cada fermentador, de tal manera que se obtenga un flujo de aire intenso, pero sin que brinque agua.
9. A cada fermentador medir el flujo de aireación con el flujómetro entre 6 y 10 veces, cambiando el flujómetro en cada caso.
10. Una vez concluida esta actividad, desconectar los fermentadores y las mangueras, vaciar el agua en la tarja y lavar todo el material. El distribuidor de aire permanecerá conectado a las mangueras de pecera evitando mover la calibración de las válvulas.

5. Preparación del medio de fermentación

1. El medio de cultivo basal para realizar la fermentación acética con *Acetobacter aceti* se prepara días antes del inicio de la fermentación de acuerdo a la composición que se presenta en el Anexo I.

2. Por separado se esterilizan los dos tapones de rosca del fermentador, dos tramos de mangueras esterilizables de 50 cm, tres tramos de mangueras esterilizables de 15 cm, dos filtros de Nylon (según sea el caso), un tubo en T de vidrio, un tubo grande de ensayo sin rosca con tapón de algodón y 6 tramos de hilaza de 10 cm cada uno, envueltas separadamente en papel de estraza, que van a ser utilizados durante el cultivo principal.
3. Los extremos de los tubos que estén expuestos, se tapan externamente con algodón y gasa, amarrándolos con hilaza, antes de envolver en papel.
4. El día en que va a iniciar la fermentación se lavan perfectamente las manos desinfectando con alcohol, usar cubrebocas y limpiar la mesa con fenol al 5% (v/v).
5. Se coloca el fermentador entre mecheros o en campana de flujo laminar, se vacía la solución del matraz Erlenmeyer estéril en la jarra de fermentación a través del orificio central con rosca, con ayuda de un embudo estéril. Luego se retira el embudo y se adicionan 36 mL de etanol, con una pipeta estéril de 10 mL. Se tapa y se mezcla con ayuda de la barra de agitación. **Tener precaución de no acercarse demasiado a la jarra a los mecheros en esta operación, porque el etanol es altamente inflamable.**

6 Inoculación

1. La fermentación inicia cuando se inocula asépticamente el medio con 30 mL del cultivo de 48 h de *Acetobacter aceti* con una pipeta estéril de 10 mL, a través del orificio central con rosca, con ayuda de un embudo estéril, y se coloca asépticamente el tapón de acero inoxidable con rosca.
2. Se anota la fecha y la hora exacta del inicio de la fermentación.
3. Se mezcla el mosto inoculado sobre una parrilla de agitación.

7 Fermentación

1. Los fermentadores se trasladarán al cuarto de cultivo **dentro de una charola** y se introducirán al baño maría, previamente preparado (30°C).
2. Los fermentadores con aireación se conectan a la manguera de pecera del distribuidor de aire, a través del filtro de nylon. Se amarran todas las conexiones y se arranca el funcionamiento de la bomba de aire y la agitación magnética de la parrilla que está abajo del baño maría.
3. Los fermentadores sin aireación no se agitan durante el cultivo.
4. La incubación se realiza a 30°C durante 3 a 4 días, colocando los fermentadores en un baño maría con temperatura controlada y muestreando.

8. Muestreo

1. Para la muestra del tiempo 0 h de cultivo, se toma con ayuda de una pipeta estéril de 10 mL una alícuota de 15 mL a través del orificio central y al final se coloca asépticamente el tapón de acero inoxidable con rosca. La muestra se vierte en un vaso de precipitados para analizarla el mismo día (Anexo V).
2. Después de tomar la muestra del tiempo cero, se conecta asépticamente la manguera flexible estéril de Nalgene de 50 cm a la salida de uno de los tubos metálicos largos del fermentador, y en el otro extremo de la manguera se conecta un tubo de vidrio en T. A continuación, en las dos vías del tubo en T de vidrio, se conectarán dos mangueras flexibles estériles de Nalgene de 15 cm.
3. En el extremo de la manguera que sale de la vía de 90° se conecta un filtro de nylon dirigiendo la flecha del flujo de aireación hacia el fermentador, seguida de una manguera estéril de 15 cm y una jeringa estéril de 60 mL. Durante la fermentación, la otra manguera estéril corta de Nalgene permanecerá tapada con algodón y gasa. Las mangueras se cerrarán con las tres pinzas Mohr de tornillo.
4. Para los fermentadores que requieran aireación (fermentador # 2) se conecta asépticamente otra manguera flexible estéril de Nalgene de 50 cm a la salida de uno de los tubos metálicos largos del fermentador, y en el otro extremo de la manguera se conecta un filtro de nylon dirigiendo la flecha del flujo de aireación hacia el fermentador.
5. Antes de sacar el fermentador de la zona estéril y cada una de las conexiones se deberá amarrar con hilaza o con una abrazadera. El conjunto de conexiones se colocarán y se amarrará sobre la tapa del fermentador.

6. Previo a la toma de muestras durante la fermentación, se describe la apariencia del mosto: color, turbidez, formación de natas y/o sedimentos, olor.
7. El fermentador con aireación continuará conectado a la bomba y con agitación, mientras que el fermentador sin aireación se saca del baño maría y se agita con ayuda de la barra magnética y parrilla eléctrica.
8. Posteriormente se conecta una jeringa estéril de 25 mL en el extremo de la manguera de Nalgene de 15 cm, a la cual previamente ya se le había retirado su tapón de algodón y gasa. Esta conexión se mantiene por debajo del nivel del fermentador mientras que la jeringa estéril de 60 mL se mantiene elevada. En este momento se abren las pinzas Mohr del fermentador y la de la jeringa estéril de 60 mL, y con ayuda de la misma comenzamos a sustraer aire hasta que inicie el flujo del caldo de cultivo por las mangueras (Anexo V).
9. A continuación se cierra la pinza Mohr de la jeringa de 60 mL y se abre la pinza de la jeringa de 25 mL, con la cual se tomará una alícuota de 15 mL. Después se cierra su pinza Mohr y se desconecta la jeringa de 25 mL para coleccionar la muestra: 3 mL van al tubo mediano con rosca y 12 mL al frasco de muestreo (Anexo V). Las muestras se congelan.
10. Para regresar el exceso de caldo de cultivo que quedó en las mangueras hay que elevar todas las mangueras para que el líquido fluya por gravedad. Al final se inyecta un poco de aire con la jeringa de 60 mL, abriendo previamente su pinza Mohr. Una vez concluida esta actividad se cierran todas las pinzas.
11. Se sumerge el extremo de la manguera que está libre en una solución de etanol al 25 % contenida en un tubo de cultivo mediano sin rosca, durante 10 minutos.
12. Por último, se colocan las pinzas Mohr y se amarran todas las tuberías a la parte superior del fermentador.

9. Análisis de muestras

1. Se realizan los siguientes análisis en cada muestra:
 - a. Observación de la morfología microbiana por la técnica de Gram *
 - b. Medición de pH
 - c. Acidez titulable expresada como ácido acético.
2. Los análisis pueden realizarse de acuerdo a las técnicas que se presentan en el Anexo III.

10. Elaboración del reporte

1. Elaborar un diagrama de flujo del proceso
2. Tablas de resultados
 1. Tabla de resultados 1. Se anotarán los datos directos de los tiempos medidos en segundos para que la burbuja de jabón recorriera el flujómetro (60 mL).
Cálculo de la velocidad de aireación
Los datos de la Tabla 1 se utilizarán para el cálculo de la velocidad de aireación (Anexo II).
 2. Tablas de resultados 2 y 3. Se anotará la numeración de las muestras; el período de fermentación correspondiente a cada una de ellas (h); los datos directos de los análisis de acidez titulable (alícuotas de las muestras tituladas y normalidad de la solución de NaOH) y las características de morfología microbiana de cada muestra y fermentador. Además anotar la apariencia del medio de cultivo.
 3. Tabla de resultados 4. Se anotarán los datos calculados de cada condición de cultivo (con y sin aireación): resultados de la acidez titulable, expresada como % (p/v) y mmol/l de ácido acético y el pH. En el título de esta Tabla se indicará el valor de la velocidad de aireación calculada, en unidades de volumen de aire por volumen de medio por minuto (v v m).
3. Gráficas
 1. Se realizarán las gráficas con los resultados de los Tabla 4.
 2. Gráficas por cultivo. Se presentará una gráfica por cada cultivo realizado a diferente nivel de aireación (Figura 1 y 2). En las abscisas estará el tiempo en h y en las ordenadas el contenido de ácido acético, en mmol/l o el pH.

4. Parámetros cinéticos.

1. Con los datos que corresponden a la acidez de la tropofase de cada cultivo (Figuras) y los resultados de la Tabla 4 se calculan los valores de productividad de ácido acético que se presentarán en la Tabla 5.
2. Los datos de velocidad de aireación obtenidos ($v \text{ v m}$) se comparan con los de la bibliografía, para determinar la eficiencia de los fermentadores utilizados en la fermentación aerobia.
3. De la Tabla 3 y 4 y las Figura 1 y 2 se determinan objetivamente si la producción de ácido guarda relación con la disminución del pH.
4. De los Tablas 3 y 4, de las Figura 1 y 2 de los parámetros cinéticos calculados se analiza el efecto de los dos niveles de aireación en la velocidad de producción de acidez, comparando los resultados entre ellos y con los de la bibliografía.

Cuestionario

1. ¿Explique qué factores afectan la fermentación acética?
2. ¿Cuáles son las características morfológicas de las bacterias acéticas?
3. Describa las rutas metabólicas para producción de ácido acético.
4. Resuma las principales aplicaciones del ácido acético en los diversos sectores de la industria.

Referencias

- Acosta-Artiles, A., Diaz-Romero, C. y Hardison de la Torre, A. (1993). Caracterización fisicoquímica de distintos tipos de vinagre. Acidez, extractos seco y cenizas. *Alimentaria*, 245, 99-103.
- Aidoo K. E., Hendry, R. y Wood, B. J. B. (1984). Mechanized fermentation systems for the production of experimental soy sayce koji. *Journal Food Technology*, 19, 389-198.
- Amerine, M. A. y Ough, C. S. (1976). *Análisis de vinos y mostos*. Zaragoza, España: Acribia.
- Ams, M (2004). *El libro del sauerkraut*. Industrial Kadex S.A. Ediciones Cedel. 2nd Ed. 98 pp.
- AOAC. (1980). *Analyses of the Association of Official Analytical Chemist the Association of Analytical Chemist*. Washington.
- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In S. Salminen, A. Von Wright, & A. Ouwehand (Eds.), *Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects* (pp. 1–66). New York: Marcel Dekker
- Bárzana-García, E., García-Garibay, M., Quintero Ramírez, R., López-Munguía, A. (1993). *Ácidos orgánicos en biotecnología alimentaria*. México: Limusa.
- Munguía, A. (1993). *Ácidos orgánicos en biotecnología alimentaria*. México, D.F., Limusa.
- Beck, J. E. (1960). Determination of carbon dioxide in wine. *Journal of the AOAC*, 43 (3), 652-654.
- Bergeret, G. (1970). *Conservas vegetales. Frutas y Hortalizas*. Montevideo, Uruguay: Instituto del libro.
- Beganović, J., Pavunc, A. L., Gjuračić, K., Spoljarec, M., Sušković, J., Kos, B. (2011). Improved sauerkraut production with probiotic strain *Lactobacillus plantarum* L4 and *Leuconostoc mesenteroides* LMG 7954. *Journal of Food Science*, 76, M124-M129.
- Brányik, T., Silva, D. P., Baszczynski, M., Lehnert, R., Almeida Silva, J.B. (2012). review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production. *Journal of Food Engineering* 108 (2012) 493–506.
- Chin, H. W. y Lindsay, R. C. (1993). Volatile sulfur compounds formed in disrupted tissues of different cabbages cultivars. *Journal Food Science*, 58 (4), 835-841.
- Crueger, W. (1989). *Biotecnología. Manual de Microbiología Industrial*. Zaragoza, España: Acribia.
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology* 33: 1-10.
- Dubois, M., Gillies, K., Hamilton, J., Rebers, P., Smith, F. (1956). Colorimetric method for the determination of sugar and related substances. (Vol. 28). *Anal. Chemistry*.
- Duffus, C., Slaughter, C. (1985). *Las semillas y sus usos*. México, D.F.: AGT Editor.
- Feng, X. L. (2007). Production of volatile compounds by *Rhizopus oligosporus* during soybean and barley tempeh fermentation. *Journal Food Microbiology*, 133-141.
- Hamada, T., Sugishita, M., Fukushima, Y., Fukase, T. y Motay, H. (1991). Continuous production of soy-sauce by a bioreactor system. *Proc. Bioscience*, 26, 39-45.
- Hensley, S. (2008). *Sauerkraut's Incredible ascination*. Trafford Publishing.
- Hernández, L. M. A. (1998). Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. *Rev. Cubana Aliment. Nutr.*, 12 (1), 7-55.
- Higashikawa, F., Noda, M., Awaya, T., Nomura, K., Oku, H., Sugiyama, M. (2010). Improvement of constipation and liver function by plant-derived lactic acid bacteria: a double-blind, randomized trial. *Nutrition*, 26, 367-374.
- Kaufmann, K., Schöneck, A. (2002). *Making Sauerkraut and pickled vegetables*. Home Alive Books.
- Lichtenstein, A. H., Goldin, B. R. (2004). Lactic acid bacteria and intestinal drug and cholesterol metabolism. In S. Salminen, A. Von Wright, & A. Ouwehand (Eds.), *Lactic acid bacteria microbiological and functional aspects* (pp. 507–514). New York: Marcel Dekker

-  Liu, S., Han, Y, Zhou Z. (2011). Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International* 44: 643–651
-  Mantello, S. R. (2007). Materias primas: Yogurt: Proceso de elaboración del yogurt y selección de la leche. Recuperado el 2012, de <http://www.mundohelado.com>
-  Medwid, E. D. y Grant, D. W. (1984). Germination of *Rhizopus oligosporus* sporangiospores. *Appl. Environment Microbiology* , 1067-1071.
-  Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars . *Analytical Chemistry* , 426-428.
-  Müller, G. (1981). *Microbiología de los alimentos vegetales* (Vol. 31). Zaragoza, España: Acribia.
-  Oishi, K., Tominaga, M., Kawato, A., Abe, Y., Imayasu, S., Nanba, A. (1992). Development of on-line sensing and computer-aided control systems for sake brewing. *Journal Biotechnology*, 53-74.
-  Park, Y. S., Ohtake, M. F., Fukaya, M., Okumura, H., Kawamura, Y., Toda, K. (1989). Effects of dissolved oxygen and acetic acid concentrations on acetic acid production in continuous culture of *Acetobacter aceti*. *Journal Fermented Bioeng.* , 96-101.
-  Park, Y. S., Ohtake, M. F., Fukaya, M., Okumura, H., Kawamura, Y., Toda, K. (1989). Enhancement of acetic production in a high cell-density culture of *Acetobacter aceti*. *Journal Ferment. Bioeng.* , 315-319.
-  Park, Y. S., Ohtake, M. F., Okumura, H., Kawamura, Y., Toda, K. (1989). Effect of dissolved oxygen and acetic acid concentrations on acetic acid production in continuous culture of *Acetobacter aceti*. *Journal Ferment. Bioeng.* , 96-101.
-  Peñas, E., Pihlava, J. M. Vidal-Valverde , C., Frias J. (2012). Influence of fermentation conditions of *Brassica oleracea* L. var. *capitata* on the volatile glucosinolate hydrolysis compounds of sauerkrauts. *LWT- Food Science and Technology* 48:16-23.
-  Peres, CM, Peres, C., Hernandez-Mendoza, A., Malcata,FX. (2012). Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria with an emphasis on table olives. *Trends in Food Science & Technology* 26: 31-42.
-  Pinney, T., (2012). *The markers of American wine a record of two hundred years*. University of California, Press Ltd. Ed. Library of Congress Cataloging in Publication Data.
-  Ramesh, C. Chandan. (2006). *Yogurt and Fermented Milks*. Segunda edición. Ed. Wiley-Blackwell.
-  Sato, K., Nagatani, M. y Sato, S. (1982). A method of supplying moisture to the medium in a solid-state culture with forced aeration. *Journal Ferment. Technol.* 607-610.
-  Sengun, I. Y., Karabiyikli, S. (2011). Importance of acetic acid bacteria in food . *Industry Food Control*, 647-656.
-  Shochu, J. S. (2011). *Makers Association A*. Recuperado el 15 de mayo de 2012, del *Comprehensive Guide to Japanese Sake*: <http://www.japansake.or.jp>
-  Stansbury, P. F., Whitaker, A., Hall, S. (1999). *Principles of Fermentation Technology*. Butterworth Heinemann Pub. 2nd Ed. U.K.
-  Steinkraus, K. H. (1994). Nutritional significance of fermented foods. *Food Res. Int.* , 259-267.
-  Sun, Y., Furusaki, S. (1990). Continuous production of acetic acid using immobilized *Acetobacter aceti* in a three-phase fluidized bed reactor. *J. Ferment. Bioeng.* , 102-110.
-  Tamime, A. Y.; Robinson, R. K. (2007). *Tamime and Robinson's Yoghurt - Science and Technology* (3rd Edition). Woodhead Publishing.
-  Wang, H. L. (1981). Oriental soybean foods. *Food Prod. Dev.* , 29-34.
-  Wang, H. L., Hesseltine, C. W. (1979). *Mold-modified foods* *Microbial Technology*. Academic Press , 96-109.
-  Willey, J., Sherwood, L. M., Woolverton, C.J., (2008), Prescott, Harley y Klein's *Microbiología* 7a Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana de España, S. L.

-  Wood, B. J., Cardenas, O.S., Yong, F.M., McNulty, D.W. (1973). Lactobacilli in production of soy sauce, sour-dough bread and parisian barm. Lactic acid bacteria in beverages and food proceedings of a symposium , 325-330.
-  Yakotsuka, T. (1981). Recent advances in shoyu research. The quality of foods and beverages chemistry. Academic Press , 171-196.
-  G., Charalambow y Inglett, G. (ed.) Vol. II. Academic Press.N.Y., U.S.A. pp. 171-196.

Normas Oficiales Mexicanas, reglamentos y marco legal

-  Instructivo del funcionamiento interno y operativo para regular el uso de los servicios e instalaciones de los laboratorios de docencia de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud aprobado por el Consejo Académico en la sesión 314 el 9 de noviembre de 2009.
-  Norma Oficial Mexicana (NOM). NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 (antes NOM-087-ECOL-SSA1-2002). Protección Ambiental - Salud Ambiental - Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos - Clasificación Y Especificaciones De Manejo.
-  NOM-100-STPS-1994 Seguridad-Extintores contra incendio a base de polvo químico seco con presión contenida-Especificaciones.
-  NOM-087-ECOL-SSA-2002, Residuos biológico infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.
-  NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas.
-  NOM-113-STPS-2009, Seguridad-Equipo de protección personal-Calzado de protección-Clasificación, especificaciones y métodos de prueba.
-  NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal-Selección, uso y manejo en los centros de trabajo.
-  NOM-002-STPS-2010, Condiciones de seguridad-Prevención y protección contra incendios en los centros de trabajo.
-  Ley de Protección Civil para el Distrito Federal Nuevo Ordenamiento (Publicado en la Gaceta Oficial del Distrito Federal el 23 de julio de 2002)
-  NOM-181-SCFI-2010, Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba.

Guía para la elaboración del reporte

Elementos del reporte de práctica:

1. Portada.

Incluye el título de la práctica, el nombre de los autores, número de equipo y de la institución, fecha en que se presenta el reporte.

2. Índice del reporte.

Incluye los títulos de apartados y sub apartados, así como su ubicación (número de páginas).

3. Resumen

Constituye una versión concisa del planteamiento del problema, objetivos, métodos, resultados más importantes y las conclusiones. Su extensión máxima deberá ser de 320 palabras.

4. Introducción.

Incluye los antecedentes y/o conocimientos fundamentales del tema, marco teórico.

Su extensión máxima deberá ser de 2 cuartillas. Se deben citar las referencias correspondientes.

5. Objetivos general y Objetivos particulares

6. Materiales y Métodos.

Describe como fue llevada a cabo la práctica, con tal claridad que pueda ser reproducida completamente puede incluir: descripción del sistema en estudio, tablas de condiciones, esquemas, diagramas de flujo.

Se resume cada paso en el desarrollo de la práctica. Cuando se emplean métodos o procedimientos ya descritos en la literatura, se deben citar las referencias correspondientes.

7. Resultados y discusión

En este apartado se describirán sus resultados mediante el uso de tablas, cuadros, gráficas, dibujos, diagramas o croquis. Cada uno de estos elementos debe ir numerado y acompañado de un texto o título explicativo. La discusión se efectuará haciendo referencia a los objetivos del trabajo y a los antecedentes obtenidos de la revisión de la bibliografía. En general se escribe en pasado. Esta es sin duda una de las partes más importantes del informe. Se deben citar las referencias correspondientes.

i. Tabla de resultados

En cada tabla se escribirá el título con el número correspondiente, los parámetros que se presentan, el factor que se estudia, el microorganismo y el tipo de medio. Cada fila y columna quedarán bien identificadas y con unidades.

ii. Gráficas

Utilizando los datos determinados en cada práctica se realizarán las gráficas con ayuda de un programa de computación (e.g. Excel). El formato recomendado es de dispersión x y, con puntos y líneas suavizadas.

En cada gráfica se escribirá el título con el número correspondiente y consecutivo, los parámetros que se presentan, el factor que se estudia, i.e. variable de respuesta, las condiciones de cultivo e.g. microorganismo y el tipo de medio. Cada curva y coordenada quedará bien identificado y con unidades.

iii. Cuestionario

Los cuestionarios deberán entregarse en el informe de cada práctica con la finalidad de que realicen investigación adicional sobre cada tema reforzando los conocimientos adquiridos.

8. Conclusiones y Recomendaciones.

En esta sección se derivan conclusiones y se presentarán como un resumen de la discusión de los resultados. Se declarará explícitamente si se cumplieron los objetivos planteados al inicio de la práctica y se mencionará puntualmente los aspectos más importantes aprendidos.

Se harán recomendaciones para otras prácticas, se analizarán las implicaciones de éstas.

9. Bibliografía.

Constituye las referencias empleadas para la elaboración del marco teórico y el análisis de los resultados, estas se organizan al final del cuerpo. La forma de organizar la literatura o referencias empleadas de forma general, se suele escribir el apellido del (los) autor(es), seguido de los nombres en abreviatura, el título del capítulo o nombre del trabajo, el nombre de la obra, el editor, la casa editorial, el sitio o lugar de publicación, el año de publicación y la(s) páginas de ubicación en el cuerpo de la obra. Cada uno de estos elementos suele ser separado por una coma.

En el caso de publicaciones periódicas (artículos) se incluirán el apellido del (los) autor(es), seguido de los nombres en abreviatura, el año de publicación, el título del trabajo, volumen, número entre paréntesis y la página inicial a final del artículo.

10. Apéndices/Anexos

Resultan útiles como material de apoyo, para describir en mayor detalle ciertos aspectos, sin distraer la lectura del texto principal.

Anexo I

"Aprender es descubrir lo que ya sabes. Actuar es demostrar que lo sabes."

(Richard Bach)

Medios de cultivo

Agar Papa Dextrosa

Para el cultivo de hongos patógenos y no patógenos particularmente dermatofitos, levaduras y microorganismos acidúricos

Compuesto	Cantidad (g)
Infusión de papa	4
Dextrosa	20
Agar	15
Agua destilada	1000 mL

Preparación. Suspender los componentes del medio en 1 L de agua destilada. Mezclar perfectamente, calentar con agitación frecuente y hervir durante 1 minuto hasta disolución completa. Esterilizar a 121°C por 15 min. Después de esteriliza, enfriar en baño de agua a 45°C, acidificar a un pH de 3.5 con ácido tartárico estéril al 10% (aproximadamente 1.4 mL de ácido tartárico por 100 mL de medio). Después de adicionar la solución, mezclar y medir pH con potenciómetro. Dejar solidificar una porción de medio. Hacer esto en cada lote de medio preparado. A fin de preservar las propiedades gelificantes del medio, no calentar después de agregar el ácido tartárico.

Agar Dextrosa Sabouraud.

Para el cultivo de hongos patógenos y no patógenos particularmente dermatofitos, levaduras y microorganismos acidúricos.

Compuesto	Cantidad (g)
Pluripeptona	10.0
Dextrosa	40.0
Agar	15.0
Agua destilada	1000 mL

Ajustar pH a 5.6 ± 0.2

Preparación. Suspender 65 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar hasta uniformar. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 minuto hasta disolver. Distribuir y esterilizar 15 minutos a 118-121°C. Mantener en lugar fresco, pues la exposición al calor hidroliza los componentes. Distribuir en placas o en tubos con cierre hermético.

Caldo Man Rogosa Sharpe (MRS)

El caldo MRS fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe para proveer un medio que pudiera evidenciar un buen crecimiento de lactobacilos y de otras bacterias ácido lácticas. Es utilizado para el cultivo y enriquecimiento de lactobacilos a partir de muestras clínicas y alimentos, especialmente lácteos.

Compuesto	Cantidad (g)
Peptona de carne	10
Extracto de carne	8
Extracto de levadura	4
Glucosa (Industrial)	20
Fosfato dipotásico	2
Acetato de sodio trihidratado	5
Citrato de amonio dibásico	2
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2
Sulfato de manganeso monohidratado	0.05
Sorbitánmonooleato (Tween 80)	1 mL
Agua destilada	1000 mL

Ajustar a pH 6.2 ± 0.2

Preparación. Suspender los ingredientes en el volumen de agua destilada a preparar. Enseguida mezclar a ebullición durante 1 ó 2 minutos. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C

Caldo Jugo de Tomate-Etanol

El medio de jugo de tomate se utiliza para el cultivo y la enumeración de especies de *Lactobacillus* y otros microorganismos acidófilos

Compuesto	Cantidad (g)
Jugo de Tomate	20
Extracto de levadura	10
Peptona	10
Glucosa	10
Etanol absoluto*	20 mL
Fosfatodipotásico	0.5
Fosfato monopotásico	0.5
Sulfato de magnesio	0.1
Cloruro de sodio	0.01
Sulfato ferroso	0.01
Sulfato de manganeso	0.01
Agua destilada	1000 mL

Preparación. Suspender los ingredientes en el volumen de agua destilada a preparar. Enseguida mezclar y ajustar a pH 6.1. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C

Medio de cultivo basal para realizar la fermentación acética con *Acetobacter aceti*.

Compuesto	Cantidad (g)
Acetato de sodio	1.0
Citrato de amonio	3.0
Extracto de levadura	2.0
Glucosa	3.0
Peptona de caseína	2.0
Sol. vitaminas y minerales* (mL)	2.0
Fosfato monopotásico	0.3
Sulfato de magnesio	0.2
Agua destilada	1000 mL

* Preparación comercial inyectable estéril

Preparación.

1. El volumen de trabajo dentro de cada fermentador es de 600 mL, el cual está constituido por el volumen del medio (95%) y el volumen del inóculo (5 %).
2. En un matraz Erlenmeyer de 500 mL se mezclan todos los componentes exceptuando las sales en 150 mL de agua. El mezclado se realiza con una parrilla de agitación magnética, a temperatura ambiente. Se ajusta el pH a 4.5 con soluciones de H₂SO₄ al 10 % (v/v) o NaOH al 10% (p/v), con ayuda de un potenciómetro calibrado.
3. En un vaso de precipitados de 1 L se prepara por separado la solución de las sales en 384 mL de agua destilada, siguiendo el procedimiento descrito para el medio anterior hasta el ajuste del pH.
4. La solución de sales y una barra de agitación magnética se introducen en el frasco fermentador. Se tapan todas las salidas del fermentador con pequeños tapones de algodón largos y poco apretados, además se coloca gasa en cada una de las salidas y posteriormente se amarran con hilaza. La tapa se envuelve en papel estraza antes de la esterilización.
5. Se esteriliza el matraz Erlenmeyer y el fermentador con los medios en autoclave a 121°C, durante 15 min.

Medio de caldo de glucosa:

Se adiciona agua en un vaso de precipitado y poco a poco se mezclan los siguientes componentes:

Composición del caldo de glucosa para realizar la fermentación alcohólica

Componentes	g/l H ₂ O
Orgánicos	
Extracto de levadura	2.0
Glucosa	120.0
Sol. de vitaminas y minerales (mL)	2.0
Inorgánicos	
K ₂ HPO ₄	1.0
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.4
MnSO ₄ •H ₂ O	0.1
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0
K ₂ SO ₃ *	0.05

*Se adiciona después de la esterilización.

Soluciones y colorantes

Solución de dicromato de potasio 0.114 M

En un matraz volumétrico de 1 L, colocar 400 mL de agua destilada y añadir cuidadosamente y resbalando por la pared 325 mL de H₂SO₄ concentrado. Colocar en un vaso de precipitado de 1 L, 400 mL de H₂O y disolver 33.768 g de K₂Cr₂O₇. Adicionar la disolución de dicromato al matraz volumétrico, mezclar la nueva disolución y aforar a 1 L con agua destilada.

Solución de sulfato ferroso amoniacal 0.35 M

En un matraz volumétrico de 1 L, colocar 500 mL de agua y 135.50 g de FeSO₄(NH₄)₂SO₄•6H₂O y disolver la sal. Posteriormente añadir 30 mL de H₂SO₄ concentrado. Aforar con agua destilada hasta la marca de aforo.

Indicador redox de ortofenantrolina ferrosa.

Se colocan en un matraz volumétrico de 100 mL, 50 mL de agua destilado y 0.695 g de sulfato ferroso heptahidratado. Disolver y posteriormente adicionar 1.485 g de o-fenantrolina. Mezclar y aforar con agua destilada hasta la marca de aforo.

Indicador de fenolftaleína-timolftaleína

Se colocan 0.5 g de cada indicador se disuelven en una mezcla de etanol agua (80:20) se mezcla y se afora.

Solución de ácido dinitrosalicílico (DNS)

Diluya 1 gramo de ácido 3,5 dinitrosalicílico, 1 g de NaOH, 0.05 g de sulfito de sodio anhidro y 0.02 g de fenol. Afore a 100 mL con agua destilada.

Cristal violeta

Este colorante se prepara en dos partes,

- a. Solución a: en un vaso de precipitados de 50 mL colocar 10 mL de alcohol etílico y disolver 1 g de cristal violeta. Solución b: en otro vaso se disuelven 0.4 g de oxalato de amonio en 40 mL de agua destilada.
- b. Mezclar cuidadosamente las soluciones a) y b)
- c. Guardar la mezcla en un frasco ámbar en oscuridad durante 24 h. Filtrar en papel Whatman No. 1 antes de utilizarlo.

Solución de yodo lugol

En un matraz volumétrico de 50 mL, disolver 0.333 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua destilada y enseguida agregar lentamente 0.166 g de yodo, mezclar completamente y aforar con agua destilada.

Solución decolorante alcohol-acetona

Colocar en una probeta de 50 mL, 30 mL de alcohol etílico y 20 mL de acetona, mezclar perfectamente.

Safranina

En un matraz volumétrico de 50 mL colocar 5 mL de alcohol etílico y disolver 0.125 g de safranina. Aforar con agua destilada.

Azul de metileno alcalino

Disolver 0.3 g de azul de metileno en 30 mL de alcohol etílico al 95% (v/v) y mezclarlo con 100 mL de solución de hidróxido de potasio al 0.01%

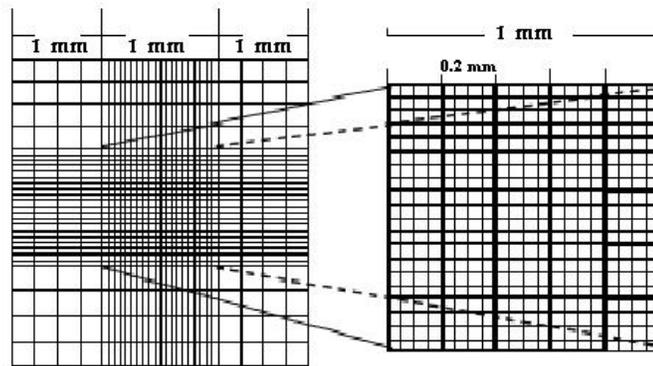
Anexo II

Técnicas

Técnica de cuenta directa en cámara de Neubauer

1. Lavar cuidadosamente la cámara de Neubauer sin frotar la zona brillante del centro y el portaobjetos. Secar con papel suave. Colocar el cubreobjetos sobre la zona central limitada por dos excavaciones laterales, donde se aprecia una zona cuadriculada en forma de cruz.
2. Diluir la suspensión de esporas hasta que sea posible realizar la cuenta. Tomar una alícuota de la dilución con pipeta Pasteur de punta fina y depositar una gota en la hendidura central de la cámara y, colocar el cubreobjetos dejando que la muestra se distribuya por capilaridad.
3. Colocar la cámara en la platina del microscopio y localizar con el objetivo seco débil (10X) la zona de cuenta que se muestra en la Figura 4. El cuadro central mide 1.0 mm por lado y al observar en objetivo seco fuerte (40X) se encuentra dividido en 5X5 cuadros pequeños de 0.2 mm por lado.
4. La cuantificación de esporas se hace generalmente en el cuadro central a 40X, contando en diagonal las esporas de 9 cuadros (que a su vez están divididos en 16 cuadros más pequeños). Al dividir el número de esporas/9, se obtiene el # esporas/cuadro de 0.2 mm de lado.
5. Se multiplica el # esporas/cuadro (de 0.2 mm) X 25 para obtener el # total de esporas/0.1 mm³ (cuadrante central 1mm por lado y la cámara tiene una profundidad de 0.1 mm) por lo que se deberá multiplicar por 10⁴ para obtener el # esporas/mL. Esta cuantificación deberá hacerse por duplicado.
6. Para cuantificar se empleará la ecuación 4 considerando el factor de dilución (FD)

$$\frac{\text{esporas}}{\text{ml}} = \left(\frac{\# \text{ esporas}}{9} \times 25 \times 10^4 \times FD \right) \quad (4)$$



a) Cuadro central (10 x)

b) Cuadro central (40 x)

Figura 4. Cuenta en Cámara de Neubauer.

Determinación del pH

La concentración de iones hidrógeno se expresa como pH, este se mide utilizando un potenciómetro que se calibra con soluciones tampón y los valores de pH de la muestra se determinan introduciendo directamente el electrodo en la muestra sin diluir a temperatura ambiente (AOAC, 1980).

1. Encender el potenciómetro.
2. Atemperar las soluciones tampón pH 4 y 7.
3. Calibrar el potenciómetro con las soluciones tampón siguiendo las instrucciones del fabricante.
4. Enjuagar el electrodo con agua destilada y secar el exceso de agua con papel absorbente.
5. Colocar la muestra mezclada contenida en un vaso de precipitados.
6. Colocar el electrodo sin que toque las paredes del vaso.
7. Esperar a que se estabilice la lectura del medidor y anotar el resultado.

Determinación de la acidez total titulable

Una alícuota de la solución que contiene el ácido se titula con una solución estándar de álcali hasta el punto en el cual una cantidad equivalente de la base añadida. Este punto final puede detectarse mediante indicadores o potenciométricamente (AOAC, 1980).

1. Calibrar el potenciómetro con las soluciones tampón pH 4 y pH 7.
2. Pesar 1 g de la muestra y diluir en 10 mL de agua destilada en un vaso de precipitados.
3. Se introduce el electrodo perfectamente limpio (lavado con agua destilada), agitando moderadamente con un agitador magnético en parrilla, se agrega lentamente la solución de NaOH (0.1 N) hasta un pH de 7.
4. Se registra el volumen de NaOH gastado (V) se asume que todo el ácido producido es ácido láctico se emplea la ecuación 5. Donde ATT (%) es la acidez total titulable, N es la Normalidad de la solución de NaOH y 0.009 son los miliequivalentes de ácido láctico.

$$\% \text{ ATT} = \frac{(V) (n) (0.009)}{\text{Volumen de la muestra}} \times 100 \quad (5)$$

Determinación de acidez volátil

1. Con una pipeta volumétrica de 10 mL tome una alícuota de la muestra y colóquelos en un matraz Erlenmeyer de 150 mL
2. Adiciones 3-4 gotas del indicador fenolftaleína al 1% (p/v)
3. Homogenice la muestra con agitación simple.
4. Coloque el titulante NaOH 0.1N en una bureta de 100 mL
5. Comience la titulación hasta visualizar el vire de incoloro a rosa o viceversa. La determinación de acidez volátil se lleva a cabo mediante la ecuación 6

$$\text{Ac. acético} \left(\frac{\text{g}}{\text{l}} \right) = \frac{(N) (\text{ml gastados NaOH}) (\text{milieq. del ácido})}{\text{alícuota}} \quad (6)$$

Determinación de acidez total (titulación)

1. Con una pipeta volumétrica de 10 mL tome una alícuota de la muestra y colóquelos en un matraz Erlenmeyer de 150 mL
2. Adiciones 3-4 gotas del indicador fenolftaleína al 1% (p/v)
3. Homogenice la muestra con agitación simple.
4. Coloque el titulante NaOH 0.1N en una bureta de 100 mL
5. Comience la titulación hasta visualizar el vire de incoloro a rosa o viceversa. La determinación de acidez total se lleva a cabo mediante la ecuación 7

$$Ac. \left(\frac{g}{l} \right) = \frac{(N) (ml \text{ gastados } NaOH) (milieq. \text{ del ácido})}{alícuota} \quad (7)$$

Determinación de carbohidratos solubles totales (Dubois *et al.*, 1956).

Todos los azúcares se deshidratan con ácido sulfúrico concentrado formando furfurales o alguno de sus derivados, a los que a su vez se condensan con fenoles presentes en la mezcla de reacción para dar compuestos de color naranja amarillento cuya intensidad se mide espectrofotométricamente (Dubois *et al.*, 1956).

1. Construir una curva estándar de glucosa a partir de una concentración de (100 µg/mL).
 - i. Pesar 100 mg de azúcar, disolverlo en agua destilada y llevarlo a un volumen de 1000 mL. Se recomienda que las concentraciones de la curva patrón sean de 0 a 100 µg/mL con intervalos de 20 µg/mL.
2. A cada uno de los tubos con las soluciones estándar se les adiciona 1.0 mL de una solución de fenol al 5 % (p/v) mezclar en vórtex.
3. Inmediatamente después se le agrega cuidadosamente 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se mezclan perfectamente los tubos y se dejan reposar por 10 min.
4. La absorbancia se lee a 490 nm. A partir de esta curva se interpolan las absorbancias determinadas en las muestras y se determina la concentración de azúcar tomando en cuenta el factor de dilución. En la Figura 5 se muestra una curva de calibración realizada para la determinación de carbohidratos totales.

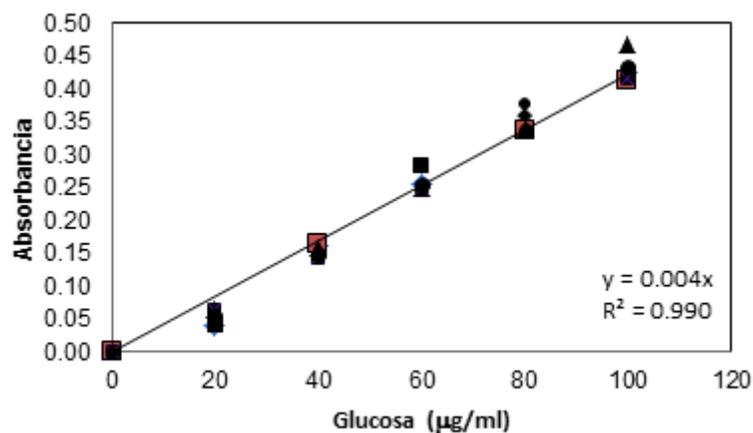


Figura 5. Curva estándar de glucosa para la determinación de carbohidratos solubles.

Determinación del contenido de alcohol

1. Tomar 25 mL de disolución problema de etanol y colóquelos en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, que contiene 25 mL de disolución de dicromato de potasio. Deje reposar en un baño a 60°C durante a 15 a 20 min con el fin de que la oxidación sea completa.
2. Para la titulación de una solución en blanco, mida 25 mL de agua destilada y colóquelos en un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenga 25 mL de disolución de dicromato de potasio. Deje reposar en un baño a 60°C durante a 15 a 20 min para que en caso de que exista materia orgánica en el agua, ésta se oxide por completo.
3. Titule con la disolución de sulfato ferroso amoniacal hasta una coloración verde a la luz del día. Después añada dos gotas del indicador ortofenantrolina ferroso y continua la titulación hasta que la solución cambie del color azulado a negro parduzco. La determinación del contenido de alcohol se lleva a cabo mediante la ecuación 8:

$$\% \text{ Alcohol volumétrico} = 25 - 25 \left(\frac{B}{A} \right) \quad (8)$$

donde: B es el volumen gastado de $\text{FeSO}_4 (\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en el blanco; A es el volumen gastado de sulfato ferroso amoniacal en la muestra.

Determinación de azúcares reductores por DNS (Miller 1959)

Solución patrón de glucosa:

Se preparó una solución de glucosa con una concentración de 1.0 g/L, para lo cual se disolvió 0.1g de glucosa en 90mL de agua destilada, y se aforó a 100mL

Curva patrón

A partir de la solución patrón de glucosa y agua destilada se preparan 10 tubos con diferentes concentraciones como lo indica la Tabla 6. El trabajo se hace por triplicado. A cada uno de los tubos, se le adicionó 1mL del reactivo DNS y se agitó con el vórtex. Se pusieron en un baño María durante 15 minutos, se dejaron enfriar y se agregaron 8mL de agua destilada. Utilizando como blanco una solución de agua con el reactivo DNS, se determinó la absorbancia de cada tubo a 575nm.

Tabla 6. Preparación de diluciones con varias concentraciones de glucosa para determinar azúcares reductores mediante la técnica reportada por Miller (1959).

Tubo	mL de sol. Patrón de glucosa	mL de agua destilada	volumen total	concentración (mg/l)
0	0	10	1	0
1	0.1	0.9	1	100
2	0.2	0.8	1	200
3	0.3	0.7	1	300
4	0.4	0.6	1	400
5	0.5	0.5	1	500
6	0.6	0.4	1	600
7	0.7	0.3	1	700
8	0.8	0.2	1	800
9	0.9	0.1	1	900
10	1	0	1	1000

Determinación de salinidad

Densímetro

1. Se coloca en una probeta de 1 L la salmuera preparada, y se introduce el salómetro teniendo cuidado de que no toque las paredes de la probeta y se mantenga flotando en el centro.
2. Se coloca al mismo tiempo un termómetro para corroborar la temperatura de la salmuera y poder coincidir con la temperatura a la que fue calibrado el salómetro.
3. Leer la lectura y apuntarla

Refractómetro

1. Se coloca una gota de la salmuera en el refractómetro y en contra luz se lee la medición marcada por el equipo. Tomar la lectura.

Determinación de cloruros con nitrato de plata

Valoración de la disolución de nitrato de plata

1. Con una pipeta volumétrica mida 10 mL de disolución de cloruro de sodio 0.01M y colóquela en un matraz Erlenmeyer de 125 mL
2. Agregue un mililitro de solución de cromato de potasio al 5% (p/v)
3. Titule lentamente con disolución de nitrato de plata 0.01M hasta que persista una coloración rojo-salmón en el líquido sobrenadante.
4. Efectúe la valoración tres veces.

Valoración de la muestra problema

1. Con una pipeta volumétrica mida 20 mL de muestra problema de cloruros y colóquela en un matraz Erlenmeyer de 125 mL. Verifique el valor de pH, si no está entre 6.5 y 10.3 adicione 1 g de carbonato de sodio y mida nuevamente el pH.
2. Agregue 1 mL de disolución de cromato de potasio al 5% (p/v)
3. Titule lentamente con la disolución normalizada de nitrato de plata 0.01 M, hasta que persista una coloración rojo-salmón en el líquido sobrenadante.
4. Efectúe la valoración tres veces.

Cuenta total estándar de bacterias ácido lácticas

1. Preparación de las diluciones decimales. Pesar 10 g del alimento en condiciones asépticas. Transferir a un vaso de licuadora previamente lavado y desinfectado con alcohol, agregar 90 ml de solución salina estéril (0.9 % p/v) y licuar por un minuto. Esta dilución corresponderá a 10^{-1} . Tomar 0.1 ml de la dilución 10^{-1} y transferir a un tubo que contiene 0.9 ml de solución salina estéril (10^{-2}). Esta operación se repetirá para preparar tantas diluciones decimales como sea necesario (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}).
2. Inocular 0.1 ml de cada dilución en placas de agar MRS, extendiendo homogéneamente sobre la superficie con una varilla de vidrio en ángulo previamente esterilizada. Incubar a 30°C por 24 a 48 h.
3. Seleccionar las placas que contengan entre 30 y 300 colonias. Contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas. Determinar las unidades formadoras de colonia (UFC) por g considerando el número de colonias por el inverso de la dilución entre el volumen de muestra inoculado.

Tinción simple (azul de metileno)

1. Cubrir el frotis con 1 gota de azul de metileno durante 60 segundos.
2. Eliminar el exceso de colorante con la piceta de agua destilada y dejar secar al aire.

Tinción diferencial (GRAM)

Preparación del frotis

1. Con la ayuda de un mechero, flamear un asa bacteriológica y esperar que enfríe.
2. Tomar un poco de muestra con el asa (previamente flameada) teniendo cuidado de no llevarse toda la colonia.
3. Depositar la muestra contenida en el asa en la parte central de un portaobjetos, mediante movimientos giratorios de tal forma que al terminar la extensión, tengamos como producto una espiral en la parte media de la lámina
4. Esperar que seque al aire la muestra
5. Fijar la muestra con la llama de un mechero, teniendo en cuenta que el calor no debe ser directo (sólo se pasa por la llama), puesto que el calor excesivo puede cambiar la morfología celular de las bacterias a observar.

Tinción

6. Adicionar la muestra con una gota de cristal violeta (Gram) y deja actuar al colorante por 1 minuto.

Enjuague

7. Al transcurrir el minuto, enjuagar la lámina con agua corriente. Para realizar el lavado, se debe tener en cuenta que el chorro de agua NO debe caer directamente sobre la muestra, ésta debe caer sobre la parte superior de la lámina que no contiene muestra. El chorro debe ser con corriente suave. El enjuague se debe realizar poniendo el portaobjetos en posición inclinada hacia abajo

Fijación

8. Una vez enjuagado el portaobjetos, aplicar la solución de yodo-lugol durante 1 minuto.
9. Enjuagar

Decoloración

10. Pasado el minuto de haber actuado el mordiente, decolorar con etanol-cetona (40/60 v/v), hasta que ya no escurra colorante.
11. Enjuagar con agua para quitar los residuos de decolorante.

Tinción de contraste

12. Cubrir la muestra con una gota de safranina dejar actuar durante 1 minuto.
13. Pasado el minuto correspondiente, enjuagar con agua y secar en la forma anteriormente descrita.

Determinación de la velocidad de aireación en sistemas aerobios: cultivo sólido (TEMPEH) y fermentación acética

Los datos de los tiempos medidos (s) para que la burbuja de jabón recorriera el flujómetro (60 mL) se utilizarán para el cálculo de la velocidad de aireación.

Se calcula el flujo de aireación con la ecuación 9:

$$F = \left(\frac{V_a}{t * 0.0166} \right) \quad (9)$$

donde: F es el flujo de aire ($L_{\text{aire}}/\text{min}$), V_a es el volumen de aire en el flujómetro de 60 mL ($V_a = 0.06 L_a$), t es el tiempo promedio de las mediciones en s, 0.0166 es el factor de conversión de segundos a minutos.

Se calcula la velocidad de aireación mediante la ecuación 10:

$$F_A = \left(\frac{F}{V_c} \right) \quad (10)$$

donde: V_A es la velocidad de aireación en $v \cdot m [L_a / (L_c \cdot \text{min})]$ y V_c es el volumen del medio de cultivo

Determinación de O_2 alimentado cada día, CO_2 producido diariamente y coeficiente respiratorio en cultivo en medio sólido (Tempéh)

Para el cálculo de la cantidad de CO_2 producido se utilizan las ecuaciones 11-17

a) Cálculo de meq en la muestra:

$$meq_{\text{muestra}} = V_{\text{muestra}} N_{\text{NaOH}} - V_{\text{HCl}} N_{\text{HCl}} \quad (11)$$

b) Cálculo de meq en el blanco de aireación:

$$meq_{\text{blanco}} = V_{\text{blanco}} N_{\text{NaOH}} - V_{\text{HCl blanco}} N_{\text{HCl}} \quad (12)$$

c) Cálculo del flujo de CO_2 producido por día:

$$F_{CO_2} = \left(\frac{mg_{CO_2}}{\text{día}} \right) = (meq_{\text{muestra}} - meq_{\text{blanco}}) \times meq_{CO_2} \times \left(\frac{V_T}{V_m} \right) \quad (13)$$

donde: F_{CO_2} es el flujo de aireación de CO_2 (mg/día), V_m es volumen de NaOH de la muestra (NaOH 2 N) a titular (mL), N_{NaOH} es la normalidad del NaOH (2 N) de recolección (meq/mL) (se debe conocer la normalidad exacta), V_{HCl} es el volumen de HCl gastados para titular la muestra (mL), N_{HCl} es la normalidad del HCl (1N) titulante (meq/mL) (se debe conocer la normalidad exacta), V_b es el volumen de NaOH a titular como blanco (mL), V_{HClb} es el volumen de HCl gastados para titular el blanco (mL), meq $_{CO_2}$ son los miliequivalentes de CO_2 (0.022 g/meq) en la reacción de conversión de CO_2 a HCO_3^- , V_T es el volumen total de NaOH del matraz de recolección (100 mL).

a) Cálculo de moles de CO_2 producido por día.

$$M_{CO_2} = \left(\frac{F_{CO_2}}{n_{CO_2}} \right) \quad (14)$$

Despejamos n, obteniendo:

$$n_{CO_2} = \left(\frac{F_{CO_2} \times 0.001}{M_{CO_2}} \right) \quad (15)$$

donde: n_{CO_2} es el número de moles de CO_2 , F_{CO_2} es el flujo de aireación de CO_2 en g/día, M_{CO_2} es el peso molecular de CO_2 (44 g/mol), 0.001 = factor de conversión de miligramos a gramos.

b) Cálculo de moles de O_2 que pasan por los fermentadores cada día.

Se calcula el flujo de aire en $L_a/día$.

$$F_{aire} = \left(\frac{V_{aire}}{(t \times 1.157 \times 10^{-5})} \right) \quad (16)$$

donde: F_{aire} es el flujo de aire, $L_{aire}/día$, V_{aire} es volumen de aire en el flujómetro $60 \text{ mL} = 0.06 L_a$, t = Promedio de las mediciones de tiempo, s, 1.157×10^{-5} es el factor de conversión de segundos a días.

Considerando que por cada litro de aire, el 21% es O_2 , se calcula el volumen de O_2 , en $L_{O_2}/día$.

Después se calculan los moles de O_2 por día, despejando n_{O_2} de la ecuación de los gases ideales. La presión corresponde a la atmosférica de la Cd. de México, y la temperatura es la del medio de cultivo, en K. Utilizar las unidades apropiadas para la constante R, de la ecuación de los gases.

c) Para el cálculo del coeficiente respiratorio se utiliza la siguiente relación:

$$C_R = \left[\frac{n_{CO_2}}{n_{O_2}} \right] \quad (17)$$

dónde: C_R es el cociente respiratorio,

n_{O_2} son los moles de O_2 alimentados diariamente,

n_{CO_2} son los moles de CO_2 emitidos diariamente

Anexo III

Evaluación sensorial de las hortalizas encurtidas

Se cuentan los vegetales de cada condición de cultivo (°S) que esté reportando. Cada lote se clasifica en categorías de acuerdo a color, sabor olor, firmeza): muy agradable (10), agradable (7.5 a 7), poco agradable (5), desagradable (3), poco desagradable (1.5) y muy desagradable(0); anotando el puntaje correspondiente de cada lote.

Lote	Color	Olor	Sabor	Firmeza	Total
15					
30					

Evaluación sensorial del yogurt

Se clasifica en categorías de acuerdo a color, sabor olor, firmeza como muy agradable (10), agradable (7.5 a 7), poco agradable (5), desagradable (3), poco desagradable (1.5) y muy desagradable (0); anotando el puntaje correspondiente de cada producto.

Producto (Equipo)	Color	Olor	Sabor	Firmeza	Total
1					
2					
3					
4					
5					

Evaluación sensorial del sake

Nombre		Fecha					
Muestra No.		Fecha					
Apariencia	Color	Color bajo	Amarillo pálido		Oro	Ámbar	Ámbar oscuro
	Claridad (luminosidad)	Claro <input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Oscuro <input type="radio"/>	
Nariz	Intensidad Características	No detectable				Fuerte	
	Plátano	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
	Manzana	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
	Verde/herbáceo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
	Cereal	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
	Caramelo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Paladar		Seco		Medio		Dulce	
	Dulzor	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
	Cuerpo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
	Final/retrogusto	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Características		No detectable				Fuerte	
	Acidez	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
	Umami*	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
	Amargo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	
Conclusiones	Calidad	Pobre <input type="radio"/>	Aceptable <input type="radio"/>	Bueno <input type="radio"/>	Muy bueno <input type="radio"/>	Excelente <input type="radio"/>	

* Es sabroso, retrogusto prolongado, induce la salivación y una sensación aterciopelada

Evaluación sensorial del vino

Ficha de cata modelo

Identificación del vino
Fecha de cata
1. Vista
Color
Intensidad
Evolución
Limpidez
Brillo
2. Olfato
Intensidad
Descripción
Tipo
Naturaleza
Defectos
3. Gusto
Descripción
Inicio
Evolución
Final
Estructura
Taninos
Acidez
Sabores de boca
Persistencia aromática
Defectos
Conclusión

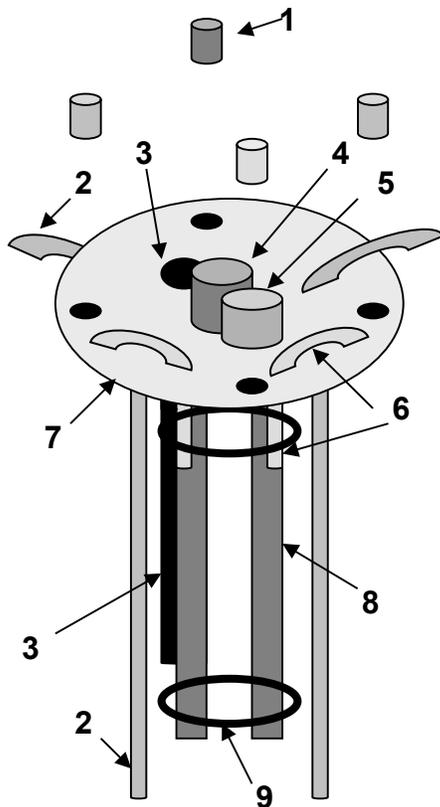
Evaluación sensorial de la cerveza

Identificación de la cerveza
Fecha de cata
1. Vista
Turbidez
Color
Brillo
2. Olfato
Intensidad
Amargo
Defectos
3. Gusto
Descripción
Inicio
Evolución
Final
Estructura
Taninos
Acidez
Sabores de boca
Persistencia aromática
Defectos
Conclusión

Anexo IV

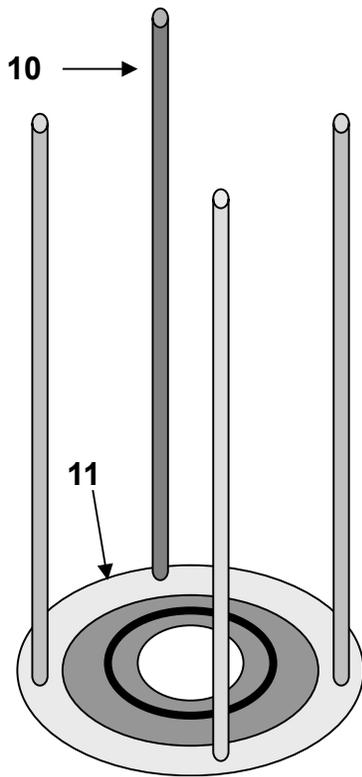
Diseño de los fermentadores utilizados en la enseñanza de la asignatura de Tecnología de Fermentaciones Alimentarias (Escamilla Hurtado, 2010)

Para cumplir los objetivos del curso práctico de esta asignatura se construyeron fermentadores con tapas y bases de acero inoxidable, con jarras de vidrio Pyrex y baños María de acrílico con sistemas de aireación y de muestreo. A los fermentadores se les puede adaptar uno o dos sensores (electrodos) para medición de parámetros, como pH, potencial redox, concentración de oxígeno disuelto (Figura 6a, 6b, 6c).



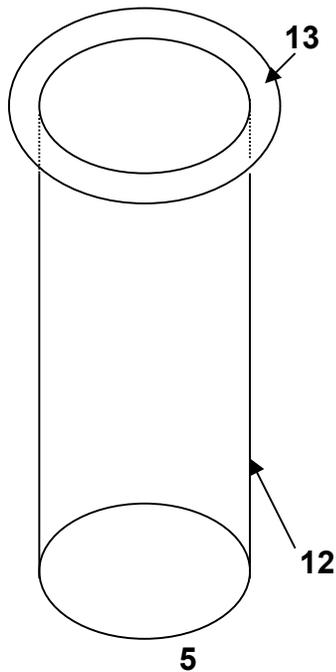
1. Tornillos para ajustar la base y la tapa (4). 1.2 x 1.6 mm
2. Tubos largos (2). Sección recta: 180 x 6 mm. Sección curva exterior: 57 x 6 mm.
3. Pozo ciego para termómetro (1): 138 x 1.2 mm
4. Tapón de rosca para orificio central (1): 30 x 12 mm
5. Tapón de rosca para orificio lateral (1): 25 x 20 mm
6. Tubos cortos (2). Sección recta: 26 x 6 mm. Sección curva exterior: 57 x 6 mm.
7. Tapa cilíndrica (1): 13 x 140 mm (Diámetro). Con orificios y una canalización concéntrica en cara inferior, de 95 mm, para O-ring.
8. Mamparas (4): 168 x 11 mm.
9. Abrazaderas de mamparas (2): 11 x 73 (Diám.) mm.

Figura 6a. Estructura geométrica, dimensiones y especificaciones para la construcción de un fermentador.
Tapa de acero inoxidable T-304, calibre 18.



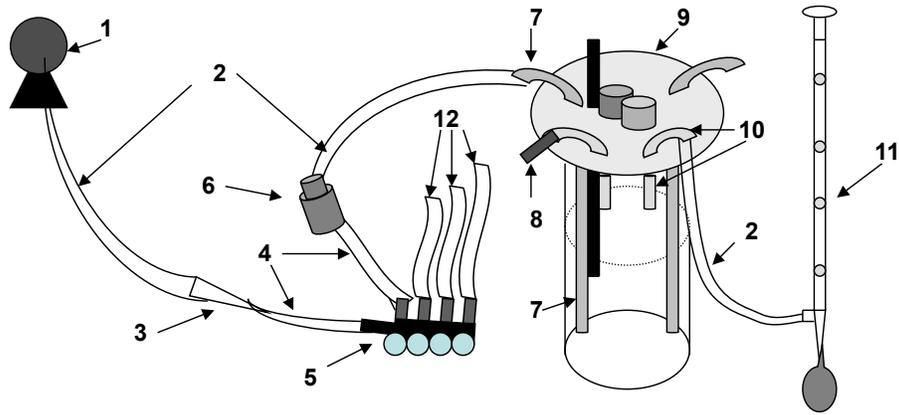
- 10. Tubos con rosca superior (4): 220 x 6 mm.
- 11. Base cilíndrica (1): 13 x 140 mm (Diámetro). Con una depresión concéntrica de 8 x 850 (Diámetro) mm, y una canalización concéntrica en cara superior, de 78 mm, para O-ring.

Figura 6b. Estructura geométrica, dimensiones y especificaciones para la construcción de un fermentador. Base de acero inoxidable T-304, calibre 18.



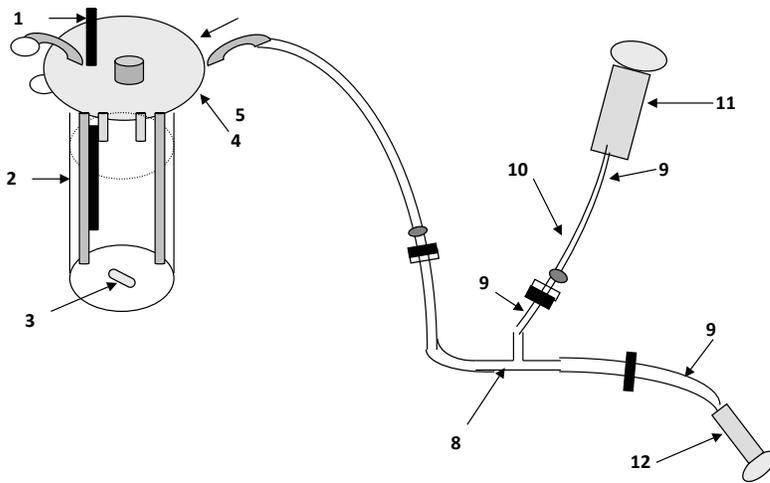
- 12. Cuerpo cilíndrico: 200 x 86 mm (Diámetro Externo).
- 13. Pestaña concéntrica de 11 (espesor) x 102 mm (Diámetro Externo).

Figura 6c. Estructura geométrica, dimensiones y especificaciones para la construcción de un fermentador. Jarra de vidrio Pyrex, de 3 mm de espesor. Capacidad nominal: 1000 mL.



- | | |
|--|--|
| 1. (1) Bomba de aire (compresora). | 7. (1) Tubo metálico largo para aireación |
| 2. (3) Mangueras de Nalgene de 50 cm. | 8. (1) Tapón de hule látex largo y delgado |
| 3. (1) Pipeta Pasteur corta. | 9. Esquema simplificado del fermentador |
| 4. (2) Mangueras flexibles de plástico para pecera de 20 cm. | 10. (1) Tubo metálico corto para el flujómetro |
| 5. (1) Distribuidor de aire de 5 vías. | 11. (1) Flujómetro de burbuja |
| 6. (1) Filtro de aire de Nylon | 12. Mangueras de pecera se conectan |

Figura 7. Sistema para determinar el flujo de aireación (Fermentación acética).



- | | |
|--|--------------------------------------|
| 1. (1) Termómetro | 7. (3) Pinzas Mhor de tornillo |
| 2. Esquema simplificado del fermentador | 8. (1) Tubo de vidrio en T |
| 3. (1) Barra magnética | 9. (3) Mangueras de Nalgene de 15 cm |
| 4. (3) Tapones de algodón y gasa | 10. (1) Filtro para aire de nylon |
| 5. (1) Tubo metálico largo para muestreo | 11. (1) Jeringa de 60 mL |
| 6. (3) Manguera de Nalgene de 50 cm | 13. (1) Jeringa de 25 mL |

Figura 8. Sistema de muestreo (Fermentación alcohólica).

Anexo V

Acervo fotográfico

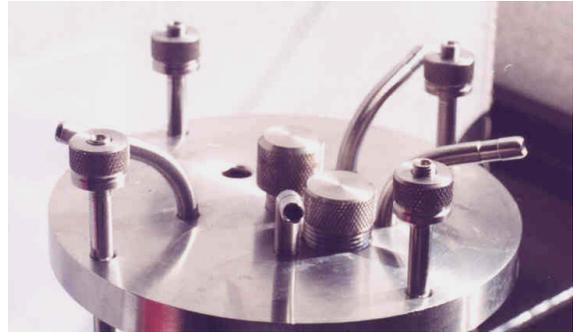
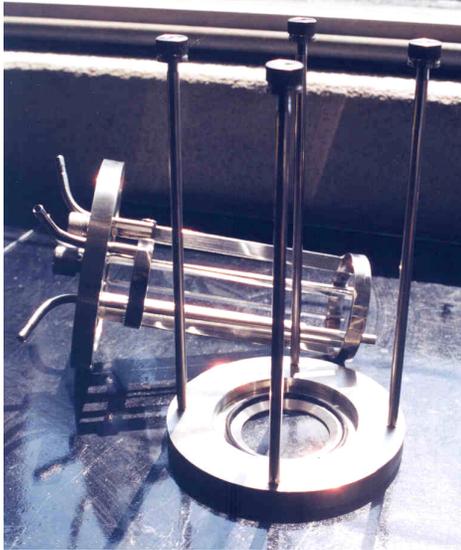


Figura 9. Fotografías de los fermentadores a utilizar en las sesiones prácticas.

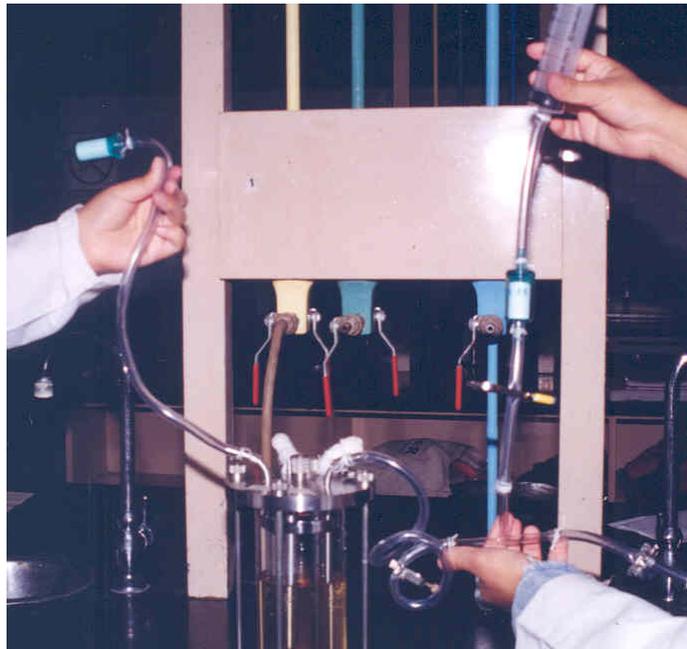
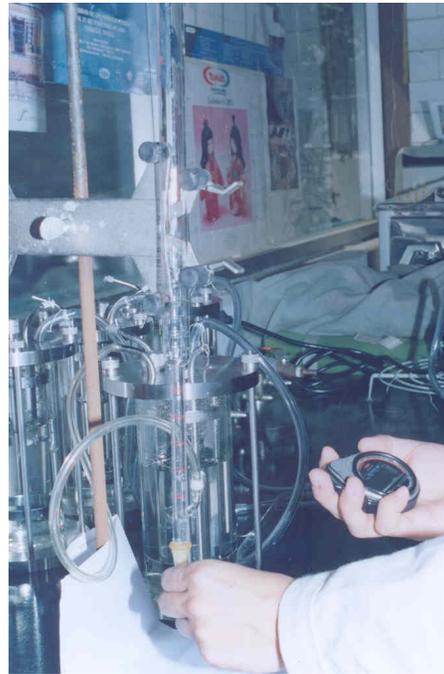
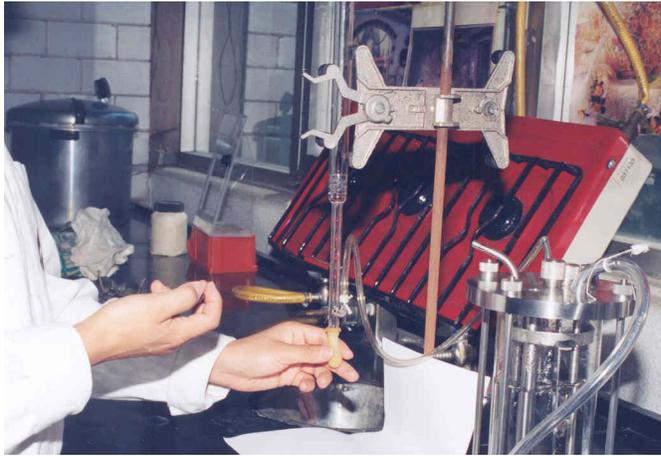


Figura 10. Fotografías del arreglo de los fermentadores para determinar el flujo de aireación para el sistema aerobio (fermentación acética).

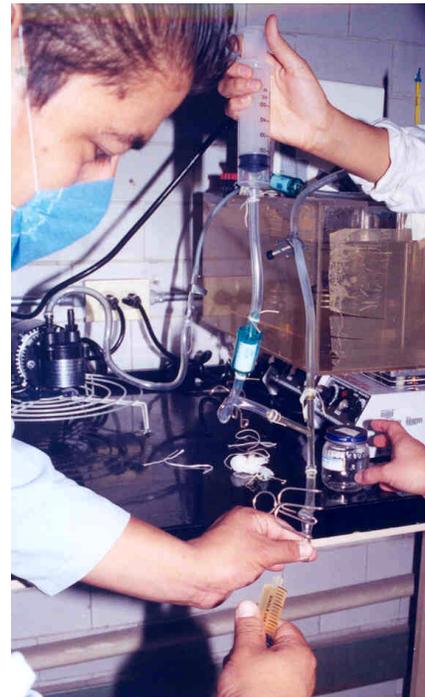
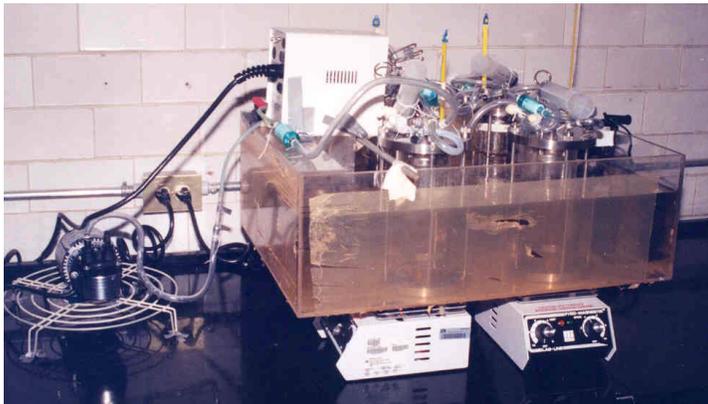


Figura 11. Fotografías del arreglo de los fermentadores para muestreo e incubación en el sistema aerobio (fermentación acética).



Figura 12. Fotografías del arreglo de los fermentadores para muestreo e incubación en el sistema anaerobio (fermentación alcohólica).

Manual de prácticas de laboratorio. Tecnología de Fermentaciones Alimentarias

Se terminó de imprimir en septiembre de 2013,
con un tiraje de 200 ejemplares, más sobrantes para reposición.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Av. San Rafael Atlixco No.186, Col. Vicentina
C.P. 09340, Del. Iztapalapa, México D.F.
Tel.: (01) 58044600