

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



APLICACIÓN DE PRINCIPIOS DE MICROESCALA EN LA ENSEÑANZA DE TÉCNICAS DE
MONITOREO DE UN PROCESO DE FERMENTACIÓN MICROBIANA

TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD PASANTIA DE INVESTIGACIÓN

PRESENTADO POR

HERMINIA EUNICES HERRERA DE CUADRA

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

OCTUBRE 2025

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO JUAN ROSA QUINTANILLA

SECRETARIO GENERAL

LICENCIADO PEDRO ROSALÍO ESCOBAR CASTANEDA

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANA

MAESTRA NANCY ZULEYMA GONZÁLEZ SOSA

SECRETARIA

LICENCIADA EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCIÓN GENERAL DE PROCESOS DE GRADO

DIRECTORA GENERAL (AD-HONOREM)

MAESTRA KATYA LISSETTE MARTÍNEZ DE PALACIOS

ASESORAS

MAESTRA EVELYN PATRICIA VÁSQUEZ RODRÍGUEZ

MAESTRA ROSARIO DE JESÚS CRUZ AGUILAR

INVESTIGADORA TITULAR

DOCTORA TANIA ETHEL CUADRA ZELAYA

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Agradezco primero a Dios que me ayudo a poder culminar mi carrera y llegar hasta este punto de la vida, a mis padres que en ningún momento dudaron de mí y me apoyaron para poder cumplir mis metas desde muy pequeña, a mi esposo que ha sido un apoyo fundamental a lo largo de mi formación, a cada uno de mis maestros que fue una pieza clave para mi formación, a Dra. Tania Cuadra por estar conmigo en este proceso apoyándome y compartiendo su conocimiento, a Maestra Evelyn y Maestra Rosario por su valioso aporte para la realización de este trabajo de investigación.

Este logro está dedicado a mis padres por su incasable labor para que su pequeña hija pudiera cumplir sus sueños y hacerlos sentir orgullosos, a mi esposo porque estuvo siempre motivándome en los momentos que sentía que ya no podía más y sin duda a mi niña interior, ahora puedo decirte lo logramos, estamos a un paso de convertirnos en química farmacéutica y si, de la Universidad de El Salvador.

ÍNDICE GENERAL

	Pág. N°
RESUMEN	
CAPITULO I	
1.0 INTRODUCCIÓN	12
CAPÍTULO II	
2.0 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo general:	15
2.2 Objetivos específicos:	15
CAPÍTULO III	
3.0 MARCO TEÓRICO	17
3.1 Aplicación de las fermentaciones	17
3.1.1 Definición de fermentación	17
3.1.1.2 Oxidación acética	18
3.1.3 Características de las cáscaras de piña	20
3.2 Monitoreo de procesos de fermentación microbiana	20
3.2.1 Técnicas de microescala aplicables en el laboratorio	21
3.2.1.2 Ventajas de las técnicas a microescala:	22
3.3 Identificación molecular:	22
3.3.1 Importancia de la identificación molecular en estudios de fermentación	22
CAPÍTULO IV	
4.0 DISEÑO METODOLÓGICO	25
CAPÍTULO IV	
5.0 PRODUCTO FINAL	29
5.1 Instrucciones técnicas.	29
5.1.1 Estructura de las instrucciones técnicas.	29
5.2 Informe de resultados.	30
5.2.1 Informe de resultados de los monitoreos microbiológico del proceso de fermentación.	30
5.2.2 Informe de resultados de los monitoreos fisicoquímicos del proceso de fermentación.	35
5.3 Identificación de microorganismos aislados.	43
5.3.1 Informe de resultados identificación molecular de levaduras aisladas durante el proceso de fermentación	43
CAPÍTULO VI	
6.0 CONCLUSIONES	47
CAPÍTULO VII	
7.0 RECOMENDACIONES	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°		Pág. N°
1	Sesiones del proceso de fermentación con las herramientas de monitoreo que cada una de las fases conlleva.	26
2	Resultados obtenidos en agar GYC, en la figura del lado izquierdo se observan colonias sin halo, lado derecho colonias con halo claro.	31
3	Resultados obtenidos en agar MRS	31
4	Resultados obtenidos en agar Chromocult, en lado izquierdo de la figura se puede observar colonias de color rojo, en el lado derecho de la figura se observan colonias beige a blancas.	31
5	Grafico Biomasa vs Tiempo, <i>los datos del grafico los contiene la tabla 4 ubicada en el anexo 3</i>	33
6	Graficas que muestran la evolución temporal de los parámetros monitoreados durante el proceso de fermentación con diferentes instrumentos. A) Densidad, B) Concentración de azúcares (°Brix) medidos con densímetro, C) Concentración de azúcares (°Brix) medidos con brixometro, D) Inferencia de la cantidad de etanol medido con densímetro. <i>Los datos de cada grafico están en las tablas 5, 6 y 7 ubicadas en el anexo 3.</i>	36
7	Graficas que muestran la evolución temporal de los parámetros monitoreados durante el proceso de fermentación con diferentes instrumentos. E) Etanol medido con Espectrómetro Infrarrojo, F) pH medido con tiras reactivas de papel, G) pH medido con pH metro, H) Acidez, determinada por medio de micro titulación. <i>Los datos de cada grafico están en las tablas 7 y 8 ubicadas en el anexo 3.</i>	37
8	Gel de electroforesis.	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°		Pág. N°
1	Resultados obtenidos en el monitoreo microbiológico del proceso fermentativo por los diferentes equipos de laboratorio	30
2	Tabla resumen de parámetros iniciales y finales.	35
3	Comparación de condiciones y resultados fermentativos	42
4	Resultados obtenidos del recuento en placa en agar DRBC	77
5	Mediciones de densidad durante el desarrollo de la fermentación	78
6	Mediciones de grados brix durante el desarrollo de la fermentación.	79
7	Mediciones de etanol con diferentes instrumentos durante el desarrollo de la fermentación	80
8	Mediciones de pH con diferentes instrumentos durante el desarrollo de la fermentación	81
9	Mediciones de acidez por micro titulación en los tiempos cero, catorce y veintiocho días.	82

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N°		Pág. N°
1	Guía de laboratorio	55
2	Tablas	76
3	Instrucciones técnicas	84

RESUMEN

El aprovechamiento de residuos agroindustriales, como las cáscaras de piña (*Ananas comosus*), para la producción de vinagre mediante fermentación acética, representa una estrategia sostenible orientada a reducir el impacto ambiental generado por los desechos orgánicos y a fomentar la economía circular. Las cáscaras de piña, comúnmente descartadas tras el procesamiento industrial, presentan un alto contenido de azúcares fermentables, especialmente en variedades dulces, además de ácidos orgánicos, fibra dietética, vitaminas y minerales, lo que las convierte en un sustrato adecuado para procesos biotecnológicos fermentativos.

Este bioproceso se desarrolló a pequeña escala en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de El Salvador, con la participación de los estudiantes de la cátedra de Microbiología Aplicada IV durante el año 2024. Aunque el proceso se llevó a cabo de manera artesanal, requirió un monitoreo riguroso y un control continuo para garantizar la calidad, inocuidad y eficiencia de la producción.

En este contexto, la aplicación de técnicas microbiológicas y fisicoquímicas a microescala desempeñó un papel fundamental, ya que permitió evaluar con precisión el comportamiento del proceso fermentativo, optimizando recursos y asegurando resultados reproducibles y confiables.

La implementación de diversas técnicas de monitoreo permitió analizar parámetros clave como el pH, grados Brix, densidad, potencial alcohólico, formación de etanol, acidez y recuento microbiano. Para ello se emplearon volúmenes reducidos de muestra, equipos portátiles o de bajo costo y procedimientos rápidos, garantizando eficiencia y reproducibilidad. Entre las técnicas aplicadas se incluyeron: el recuento de microorganismos en medios selectivos, la medición de azúcares con brixómetro, la determinación de densidad y grados Brix con densímetro, la cuantificación de etanol mediante vinómetro, microtitulaciones, espectroscopía infrarroja, tiras reactivas para pH y tinciones de Gram para la identificación microscópica de microorganismos aislados.

El uso de la microescala no solo redujo significativamente el consumo de reactivos y materiales, sino que también disminuyó la generación de residuos peligrosos, mejoró la bioseguridad en el laboratorio y facilitó la evaluación simultánea de múltiples condiciones experimentales. Asimismo, este enfoque tuvo un impacto positivo en el rendimiento y control del producto final, demostrando su eficacia técnica y didáctica.

En síntesis, la fermentación acética a partir de cáscaras de piña constituye una alternativa biotecnológica de bajo costo, sostenible y ambientalmente amigable. La aplicación de técnicas de monitoreo a microescala mejora el control y la calidad del proceso, al tiempo que fortalece su enseñanza práctica, brindando a estudiantes y docentes una herramienta efectiva y accesible para comprender los principios de los procesos biotecnológicos. Este enfoque promueve el aprendizaje de tecnologías limpias y sostenibles, fomentando el uso responsable de recursos renovables desde la formación académica.

CAPÍTULO I

1.0 INTRODUCCIÓN

En El Salvador se generan aproximadamente 4 226,48 toneladas de residuos sólidos por día, de los cuales cerca del 39,29 % corresponde a residuos orgánicos. Este elevado volumen de desechos constituye un desafío ambiental y sanitario relevante, pero también representa una oportunidad para su aprovechamiento mediante estrategias de valorización biotecnológica sostenibles.

Entre los residuos orgánicos más abundantes destacan las cáscaras de piña (*Ananas comosus*), las cuales superan en cantidad a la pulpa consumible. Estas cáscaras poseen un alto contenido de azúcares fermentables, ácidos orgánicos, fibra dietética, vitaminas y minerales, lo que las convierte en una materia prima idónea para ser transformada en productos de valor agregado, como el vinagre, a través de procesos fermentativos microbianos.

La fermentación es un proceso catabólico de oxidación incompleta que permite la obtención de energía en ausencia de oxígeno. Los distintos tipos de fermentación se diferencian por los productos finales obtenidos. En la fermentación alcohólica, las levaduras —principalmente del género *Saccharomyces*— y algunas bacterias metabolizan los azúcares simples para producir etanol y dióxido de carbono en condiciones de anaerobiosis. Posteriormente, durante la fase de oxidación acética, bacterias de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* utilizan el etanol como sustrato y, en presencia de oxígeno, lo transforman en ácido acético, base del vinagre.

En el presente trabajo de investigación se desarrollaron técnicas de microescala orientadas al monitoreo de una fermentación microbiana dirigida a la producción de vinagre, empleando cáscaras de piña como sustrato principal. El proceso fue ejecutado como parte de un examen práctico en la cátedra de Microbiología Aplicada IV de la Universidad de El Salvador, con el propósito de integrar la enseñanza teórica y experimental en microbiología industrial.

El desarrollo experimental se estructuró en cuatro sesiones principales:

1. Fermentación alcohólica: fase inicial en la que los microorganismos nativos de la piña metabolizaron los azúcares del caldo fermentativo para producir etanol. En esta etapa se determinaron las condiciones iniciales del proceso y se recolectaron muestras en distintos tiempos para su análisis posterior.
2. Oxidación acética: se efectuó un filtrado y aireación controlada del cultivo para favorecer el crecimiento de bacterias acéticas, responsables de oxidar el etanol a ácido acético.
3. Monitoreo físicoquímico: se evaluaron parámetros como pH, grados Brix, densidad, acidez y formación de etanol, utilizando diferentes instrumentos y técnicas de microescala.

4. Identificación de microorganismos aislados: realizada por la pasante de investigación, quien aplicó técnicas moleculares siguiendo las instrucciones técnicas diseñadas para dicha fase.

En total se elaboraron doce instrucciones técnicas que guiaron la medición de los cambios fisicoquímicos y microbiológicos del proceso, evidenciando fenómenos como la disminución de azúcares, la variación de densidad, la reducción del pH y la formación de etanol, biomasa y ácido acético. La implementación de estas técnicas de microescala facilitó la comprensión del comportamiento microbiano y fisicoquímico del sistema, promoviendo competencias prácticas en microbiología industrial y contribuyendo a la sostenibilidad mediante la reutilización de residuos orgánicos.

CAPÍTULO II

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

Aplicar principios de microescala en la enseñanza de técnicas de monitoreo de un proceso de fermentación microbiana.

2.2 Objetivos específicos:

- 2.2.1** Diseñar instrucciones técnicas para monitorear cambios fisicoquímicos y microbiológicos a través de técnicas a microescala de un proceso de producción de vinagre (fermentación alcohólica y oxidación acética).
- 2.2.2** Sintetizar los resultados obtenidos de la aplicación de las técnicas a microescala en el monitoreo fermentativo estudiado, plasmándolos en un informe.
- 2.2.3** Proponer un proceso para la identificación molecular de aislados de levaduras.

CAPÍTULO III

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 Aplicación de las fermentaciones

3.1.1 Historia y Definición de fermentación

La fermentación es uno de los procesos biotecnológicos más antiguos utilizados por la humanidad. Sus orígenes se remontan a civilizaciones ancestrales que, sin comprender su base científica, aprovecharon la acción de microorganismos presentes en el entorno para transformar alimentos y bebidas. Existen evidencias arqueológicas que indican que hacia el año 7000 a.C., en regiones de China, Mesopotamia y Egipto, ya se elaboraban productos fermentados como vino, cerveza y pan a partir de frutas y cereales ^(1,2). Durante muchos siglos, la fermentación fue considerada un fenómeno puramente químico o incluso un proceso de “putrefacción controlada”. No fue hasta el siglo XIX cuando Louis Pasteur demostró que la fermentación era el resultado de la actividad metabólica de microorganismos vivos, principalmente levaduras y bacterias, estableciendo así la relación directa entre la vida microbiana y la transformación de los sustratos orgánicos ⁽³⁾. Este hallazgo marcó un punto de inflexión en la microbiología y la bioquímica, sentando las bases para el desarrollo de la biotecnología moderna y las industrias alimentarias y farmacéuticas.

Desde la perspectiva bioquímica, la fermentación se define como un proceso catabólico anaeróbico mediante el cual determinados microorganismos obtienen energía al transformar compuestos orgánicos, principalmente azúcares, en productos más simples, liberando energía en forma de ATP. A diferencia de la respiración aeróbica, la fermentación no requiere oxígeno molecular como aceptor final de electrones ^(4,5).

El proceso inicia con la glucólisis, ruta metabólica en la que una molécula de glucosa se degrada en piruvato, generando una ganancia neta de ATP y NADH. En ausencia de oxígeno, el piruvato es reducido a diferentes productos finales, como etanol, ácido láctico o ácido acético, según la especie microbiana y la vía metabólica empleada. Este mecanismo permite la regeneración del NAD⁺, indispensable para mantener activa la glucólisis y, por tanto, la producción continua de energía ^(6,7).

La fermentación representa, además, un proceso clave tanto en la naturaleza como en la industria biotecnológica, al permitir la producción de alimentos, bebidas, biocombustibles, enzimas, ácidos orgánicos y metabolitos secundarios con alto valor económico y funcional ⁽⁸⁾.

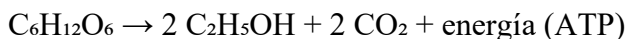
3.1.1.1 Fermentación alcohólica

En la primera etapa del proceso se lleva a cabo la fermentación alcohólica, un fenómeno bioquímico catalizado por la acción de levaduras, principalmente del género *Saccharomyces*. Durante esta fase, las levaduras metabolizan los azúcares simples presentes en el sustrato, tales como glucosa, fructosa y sacarosa, transformándolos en etanol y dióxido de carbono bajo condiciones anaerobias ^(9,10).

Las levaduras son microorganismos eucariotas unicelulares ampliamente distribuidos en la naturaleza, presentes en ambientes como el suelo, la superficie de los frutos e incluso en la piel humana. Su versatilidad metabólica les permite adaptarse tanto a condiciones aeróbicas como anaeróbicas. En ausencia de oxígeno, obtienen energía a través de la fermentación, un proceso que convierte los carbohidratos en compuestos más simples, liberando pequeñas cantidades de ATP suficientes para mantener su metabolismo celular activo ⁽¹¹⁾.

Desde el punto de vista bioquímico, la fermentación alcohólica inicia con la glucólisis, ruta metabólica que ocurre en el citoplasma celular. En esta, una molécula de glucosa (C₆H₁₂O₆) se descompone en dos moléculas de piruvato (CH₃COCOOH), generando una ganancia neta de dos moléculas de ATP y dos de NADH. Posteriormente, bajo condiciones anaeróbicas, el piruvato es descarboxilado a acetaldehído por la enzima piruvato descarboxilasa, liberando dióxido de carbono. A continuación, el acetaldehído se reduce a etanol por acción del alcohol deshidrogenasa, proceso que permite regenerar el NAD⁺ requerido para mantener activa la glucólisis ⁽¹²⁾.

El proceso global de la fermentación alcohólica puede expresarse mediante la siguiente ecuación:



Este mecanismo no solo es fundamental para el metabolismo de las levaduras, sino que también constituye la base de numerosos procesos biotecnológicos de interés industrial, tales como la elaboración de pan, vino, cerveza y biocombustibles. La eficiencia fermentativa de las levaduras, junto con su tolerancia al etanol y su capacidad para crecer en diversos sustratos, las convierte en organismos modelo en la biotecnología moderna ⁽¹³⁾.

3.1.1.2 Oxidación acética

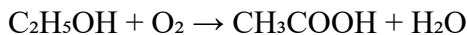
La oxidación acética es un proceso biotecnológico de naturaleza aeróbica mediante el cual el etanol producido durante la fermentación alcohólica es transformado en ácido acético (CH₃COOH) por la acción

de bacterias acéticas, principalmente de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* ^(14,15). Este proceso constituye la base microbiológica de la producción de vinagres y otros productos fermentados en los que el ácido acético actúa como componente principal o como agente conservante.

Las bacterias acéticas son microorganismos Gram negativos, estrictamente aerobios y de metabolismo quimioorganotrófico, lo que significa que requieren oxígeno molecular como aceptor final de electrones para la oxidación incompleta de los alcoholes y azúcares. A diferencia de otros microorganismos fermentativos, estas bacterias no degradan completamente el etanol a dióxido de carbono y agua, sino que detienen la oxidación en la etapa de formación de ácido acético, acumulando este compuesto en el medio de cultivo ^(16,17).

Desde el punto de vista bioquímico, la oxidación acética se desarrolla en dos etapas principales. En la primera, el etanol es oxidado a acetaldehído mediante la enzima alcohol deshidrogenasa dependiente de pirroloquinolina quinona (PQQ). Posteriormente, el acetaldehído se oxida a ácido acético por acción de la acetaldehído deshidrogenasa. Ambas enzimas se encuentran asociadas a la membrana citoplasmática y están acopladas al sistema de transporte de electrones, lo que permite la generación de energía en forma de ATP ⁽¹⁸⁾.

La reacción global puede representarse como:



Este proceso requiere una adecuada aireación y control de temperatura, ya que las bacterias acéticas son sensibles a las condiciones ambientales. En bioprocesos industriales, se emplean sistemas de cultivo sumergido o de superficie que permiten mantener una alta disponibilidad de oxígeno, favoreciendo la eficiencia de la conversión. La oxidación acética tiene gran relevancia en la industria alimentaria, especialmente en la producción de vinagre, y también se aplica en la biotecnología ambiental y en la obtención de compuestos orgánicos de valor agregado ⁽¹⁹⁾.

3.1.2 Sustratos útiles para las fermentaciones alcohólicas y oxidación acética

Los microorganismos juegan un papel fundamental en los procesos fermentativos, ya que son los encargados de la transformación y conservación de los alimentos. Para ello, se emplean sustratos ricos en azúcares simples, como frutas, jugos, residuos de frutas y verduras, entre otros. Estos proporcionan la materia prima para que las levaduras produzcan etanol y las bacterias ácido-acéticas lo conviertan en ácido acético.

3.1.3 Características de las cáscaras de piña

La generación de residuos a nivel mundial representa un problema ambiental de gran magnitud. Según un informe del Banco Mundial, en el año 2016 se produjeron aproximadamente 2,010 millones de toneladas de desechos sólidos ⁽²⁰⁾, de los cuales América Latina y el Caribe aportaron cerca de 231 millones de toneladas. En el caso particular de El Salvador, se estima una producción diaria de alrededor de 4,226.48 toneladas de residuos, de los cuales cerca del 39.29% corresponde a residuos orgánicos, principalmente procedentes de frutas, verduras y subproductos de origen animal ⁽²¹⁾.

Entre estos residuos orgánicos, las cáscaras de piña (*Ananas comosus*) destacan por su abundancia y por su alto valor nutricional y bioquímico. Representan aproximadamente el 40% del peso total de la fruta y contienen una amplia variedad de compuestos bioactivos, tales como antioxidantes naturales (flavonoides, ácido ascórbico y compuestos fenólicos), fibras dietéticas, azúcares fermentables y enzimas de importancia industrial, como la bromelina ^(22,23). Estos componentes no solo les confieren propiedades funcionales y nutricionales, sino que también las convierten en un recurso valioso para su aprovechamiento biotecnológico ^(24,25).

El uso de las cáscaras de piña como materia prima permite el desarrollo de diversos procesos de valorización, entre ellos la producción de vinagre mediante fermentaciones sucesivas —alcohólica y acética—, así como la obtención de bioetanol, compuestos antimicrobianos, aditivos alimentarios y enzimas de interés comercial ^(26,27). De esta manera, la reutilización de este residuo contribuye tanto a la reducción del impacto ambiental como al fomento de una economía circular, consolidándola como un insumo sostenible y multifuncional en la industria alimentaria y biotecnológica ⁽²⁸⁾.

3.2 Monitoreo de procesos de fermentación microbiana

Para garantizar la calidad de los productos fermentados, es fundamental realizar un monitoreo fisicoquímico y microbiológico, así como identificar y caracterizar los microorganismos involucrados en el proceso. Estas acciones permiten estandarizar la producción y asegurar que el producto final mantenga consistentemente sus características y niveles de calidad en cada ciclo fermentativo.

Existen diversos factores que pueden afectar un proceso fermentativo y que se deben ser monitoreados:

- Temperatura: es importante mantener una temperatura de entre 24-32°C para que los microorganismos responsables de la fermentación como las levaduras, trabajen de manera eficiente.

- Microorganismos utilizados: pueden utilizarse microorganismos nativos del sustrato o cultivos iniciadores, monitoreándolos por medio de la aplicación de la técnica de recuento en placa.
- pH: este puede monitorearse con tiras reactivas de pH o un pH metro, a medida que el proceso de fermentación avance el pH disminuye, esto contribuye a inhibir el crecimiento de microorganismos no deseados.
- Porcentaje de etanol: depende de las características del producto final. ⁽²⁹⁾

El monitoreo continuo de estos factores en el proceso es esencial.

Establecer métodos y procedimientos uniformes para la realización del proceso fermentativo es fundamental, ya que esto contribuye significativamente a obtener productos de alta calidad, seguros para los consumidores y con buen rendimiento económico. Si el proceso y el producto final no se monitorean, no existe la posibilidad de mejora continua, perdiendo la oportunidad de optimización que puede representar mejoras importantes a largo plazo.

3.2.1 Técnicas de microescala aplicables en el laboratorio

Existen diversas técnicas de microescala útiles para el monitoreo de procesos fermentativos, especialmente en contextos educativos e investigativos donde se busca optimizar recursos sin comprometer la calidad del análisis. Se describen a continuación algunas de ellas:

Microgota extendida: La técnica implica depositar una microgota (5–10 μL) de una dilución de la muestra sobre una placa de Petri con medio de cultivo sólido, y extenderla suavemente con un asa o esparcidor. Tras la incubación, pueden observarse colonias aisladas que permiten el recuento y aislamiento de microorganismos. ⁽³⁰⁾

Micropipetas: Las micropipetas son herramientas fundamentales en la microbiología a microescala, ya que permiten medir y transferir volúmenes muy pequeños de líquidos (generalmente entre 1 μL y 1000 μL) con alta precisión y exactitud. Su uso adecuado es esencial para garantizar la reproducibilidad de los experimentos microbiológicos, especialmente en fermentaciones donde se requiere un monitoreo fisicoquímico y microbiológico exacto. ⁽³¹⁾

La microtitulación es una técnica analítica que consiste en realizar titulaciones utilizando volúmenes muy pequeños de reactivos, generalmente en el rango de microlitros a mililitros. Es muy útil en el monitoreo fisicoquímico de procesos fermentativos, donde el volumen de muestra disponible puede ser limitado y se busca reducir el consumo de reactivos y generación de residuos. ⁽³²⁾

El refractómetro o brixómetro es un instrumento óptico utilizado para medir la concentración de azúcares totales disueltos en líquidos, expresado en grados Brix (°Brix), donde 1 °Brix equivale a 1 gramo de sacarosa en 100 gramos de solución, para su medición se emplean aproximadamente 10 µL de muestra.⁽³³⁾ Las técnicas a microescala son adaptaciones de los métodos o técnicas convencionales utilizadas en microbiología. Con estas se busca la reducción de muestra, reactivos y materiales empleados en el análisis.

3.2.1.2 Ventajas de las técnicas a microescala:

- Reducción de costos: al utilizarse menores volúmenes del caldo fermentativo, menos reactivos y medios de cultivo para el análisis.
- Mayor eficiencia: permite realizar muestreos frecuentes sin agotar el caldo fermentativo.
- Seguimiento del crecimiento bacteriano: mediante recuento en placa con diluciones seriadas a microescala.
- Menor generación de residuos y mayor seguridad: menos residuos tóxicos y menor exposición a vapores.
- Sostenibilidad educativa: permite mayor participación de los estudiantes y fomenta prácticas más responsables ambientalmente.

3.3 Identificación molecular:

La identificación molecular de levaduras es una herramienta fundamental para el estudio microbiológico moderno, especialmente en contextos biotecnológicos y de fermentación. A diferencia de los métodos clásicos basados en características morfológicas y fisiológicas, los cuales suelen ser insuficientes debido a la variabilidad fenotípica de muchas especies, las técnicas moleculares permiten una discriminación precisa, reproducible y rápida de los microorganismos. Esto ha hecho que su uso se consolide como un estándar en microbiología industrial, alimentos y biología molecular.

3.3.1 Importancia de la identificación molecular en estudios de fermentación

En procesos fermentativos, como los que se desarrollan en alimentos y bebidas de origen vegetal o frutal, la identificación precisa de las levaduras involucradas es crucial para:

- Caracterizar comunidades nativas responsables de la fermentación.
- Determinar el papel tecnológico de cada especie (producción de etanol, aroma, tolerancia a estrés, etc.).
- Diferenciar levaduras beneficiosas de especies contaminantes.
- Seleccionar cepas con propiedades deseables para cultivos iniciadores (starters).

- Comprender la interacción entre levaduras y bacterias, como ocurre en fermentaciones destinadas a la producción de vinagre.

La aplicación de herramientas moleculares permite una comprensión más profunda de los procesos fermentativos y contribuye al diseño de estrategias de control microbiológico y optimización productiva.

CAPÍTULO IV

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

La presente pasantía consistió en los siguientes tipos de estudio:

Teórico: se consultaron diferentes libros que pertenecen a la Biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, manuales de equipos, así como diferentes páginas web con fines educativos, para la elaboración de las instrucciones técnicas.

Experimental: las instrucciones técnicas elaboradas previamente fueron aplicadas en un experimento de producción de vinagre (fermentación alcohólica y acética), llevado a cabo en 4 sesiones como se puede observar en la Figura N°1.

Descriptivo: porque se describe la evolución de los diferentes parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en los experimentos realizados.

Se elaboraron 12 instrucciones técnicas que permitieron la realización del monitoreo de los diferentes parámetros de la fermentación:

- Recuento y almacenamiento de microorganismos.
- Azúcares totales.
- pH.
- Etanol.
- Acidez.
- Identificación y aspectos técnicos como centrifugación y reanimación de inóculo para identificación.

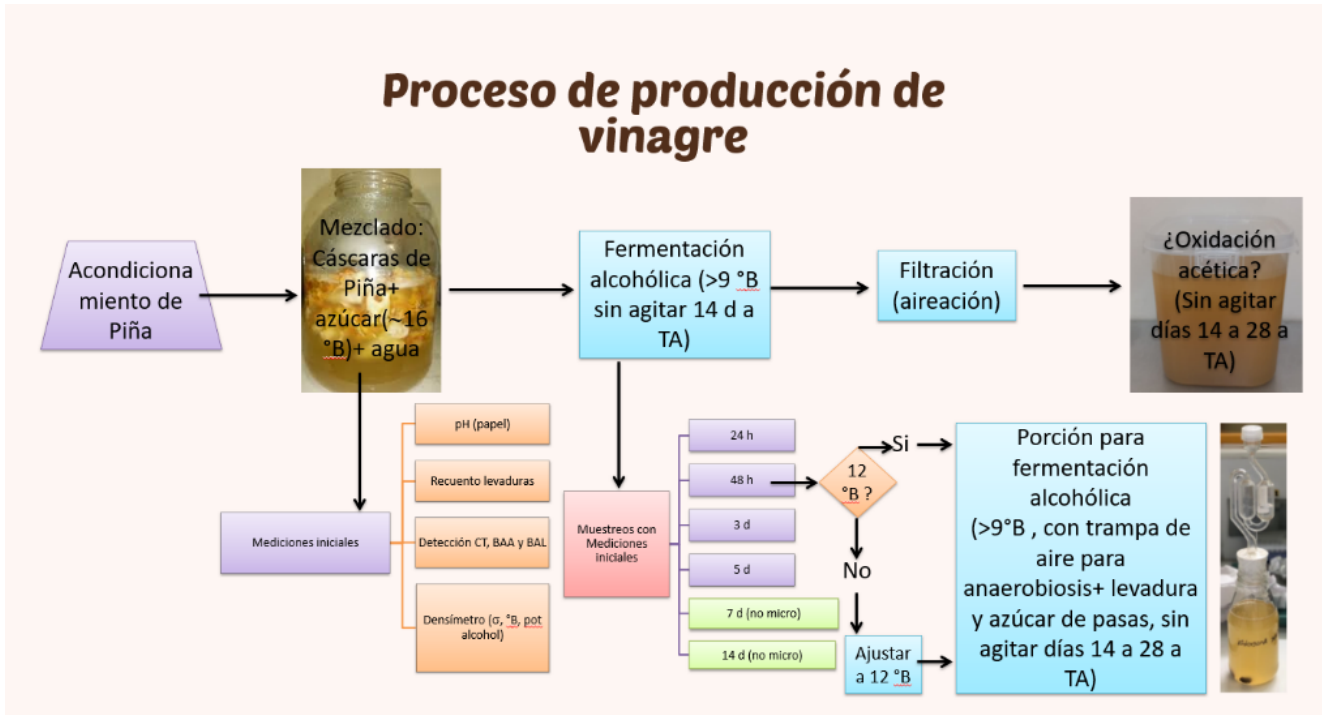


Figura N°1: Sesiones del proceso de fermentación con las herramientas de monitoreo que cada una de las fases conlleva.

Fuente Elaboración propia.

Se realizaron fermentaciones en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Química y Farmacia que se describen en el anexo N°2, se desarrollaron aplicando los anexos N°3, como puede observarse en la Figura N°1 la fermentación conlleva 4 sesiones, las primeras 3 sesiones de estas fueron realizadas tanto por la pasante de investigación como por todos los estudiantes de la cátedra de Microbiología Aplicada IV y una cuarta sesión realizada únicamente por la pasante de investigación, las cuales consistieron en:

- **Sesión 1 (Fermentación alcohólica):** esta sesión consistió en el acondicionamiento de la piña realizado desde casa, el montaje de la fermentación, la medición de parámetros iniciales, la separación de una porción de 250mL de caldo para continuar con una fermentación anaeróbica, y los muestreos de los tiempos 1,2,3,5,7,14 días.
- **Sesión 2 (Oxidación acética):** en esta sesión se realizó la filtración para favorecer la aireación del cultivo para continuar con la oxidación acética y se llevaron a cabo el procesamiento de las

muestras para las mediciones microbiológicas: recuento de levaduras, verificación de cambios en la diversidad de microorganismos y aislamiento de microorganismos de interés.

- **Sesión 3 (Monitoreo fisicoquímico del proceso):** en esta sesión se llevaron a cabo el procesamiento de las diferentes muestras para las mediciones fisicoquímicas que permitieron verificar la evolución del sustrato durante todo el proceso las cuales son: determinación de azúcares totales, pH, acidez y etanol.

- **Sesión 4 (Identificación molecular de cepas seleccionadas):** esta sesión estaba orientada en la extracción del ADN de levaduras aisladas en la sesión 2 para su correspondiente identificación, esta sesión fue llevada a cabo únicamente por la pasante de investigación.

El monitoreo de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos permitió conocer un poco mejor las variables que afectan el proceso, las cuales se plasmaron en un informe que se pretende sea un soporte para modificaciones del manual de la Microbiología Aplicada IV, contribuyendo a una ejecución eficiente que implique el aprendizaje significativo de los estudiantes.

CAPÍTULO V

5.0 PRODUCTO FINAL

5.1 Instrucciones técnicas.

5.1.1 Estructura de las instrucciones técnicas.

Las instrucciones técnicas fueron elaboradas con el fin de facilitar al estudiante la comprensión de las diferentes técnicas de monitoreo aplicadas a lo largo del proceso fermentativo.

Estructura de las instrucciones técnicas:

- Introducción: breve explicación sobre el fundamento o definición de la instrucción técnica.
- Materiales: todo aquello que se requiera para realizar la instrucción técnica.
- Procedimiento: paso a paso de como ejecutar la instrucción técnica.

Las instrucciones técnicas tanto para monitoreo microbiológico como para monitoreo fisicoquímico las cuales se encuentran detalladas en el Anexo N° 3 del manual y son las siguientes:

Instrucciones técnicas para monitoreo microbiológico:

- IT-MICRO-01: Instrucción técnica de recuento de levaduras por la técnica de microgota.
- IT-MICRO-02: Instrucción técnica para la determinación de la diversidad de microorganismos presentes en la fermentación, por medio de agares selectivos.
- IT-MICRO-03: Instrucción técnica para la identificación de levaduras aisladas por técnicas moleculares.
- IT-MICRO-04: Reanimación de levaduras a partir de crio viales.
- IT-MICRO-05: Instrucción técnica para la preparación de inoculación de un gel de electroforesis.
-

Instrucciones técnicas para monitoreo fisicoquímico:

- IT-CFQ-01: Instrucción técnica para la medición de azúcares totales, potencial de alcohol y densidad con densímetro.
- IT-CFQ-02: Instrucción técnica para la medición de azúcares totales con brixómetro.
- IT-CFQ-03: Instrucción técnica para la medición de pH con pHmetro portátil.
- IT-CFQ-04: Instrucción técnica para la medición de etanol con alcoholímetro.
- IT-CFQ-05: Instrucción técnica para la medición de etanol con IR.
- IT-CFQ-06: Instrucción técnica para centrifugación de muestra.
- IT-CFQ-07: Instrucción técnica para la determinación de acidez por micro titulación.

5.2 Informe de resultados.

5.2.1 Informe de resultados de los monitoreos microbiológico del proceso de fermentación.

Tabla N°1: Resultados obtenidos en el monitoreo microbiológico del proceso fermentativo por los diferentes equipos de laboratorio, aplicando la técnica IT-MICRO-01.

Tiempo de muestreo (días)	Agar GYC	Agar MRS	Agar Chromocult	Microorganismos probables presentes
0	<p>Colonias blancas, pequeñas, redondas y brillantes y sin halo (1, 3, 5,8,10)</p> <p>Colonias blancas, pequeñas, viscosas con halo (2,4,6,9)</p> <p>Ausencia de crecimiento (7)</p>	<p>Colonias blancas pequeñas a medianas, redondas (1, 2,7, 8,9,10)</p> <p>Colonias verdes. puntiformes lisas (3,5)</p> <p>Colonias de color azul (4)</p> <p>Colonias grisáceas (4)</p> <p>Ausencia de crecimiento (6)</p>	<p>Colonias redondas, medianas, de color violeta (violeta, azul oscuro, o celestes) con halo del mismo color (1,4,5)</p> <p>Colonias pequeñas de color blanco a beige o crema (1,2,3,5,6,7,8,10)</p> <p>Colonias rojas o rosadas (1, 2, 3,6,8,9,10)</p>	<p>Levaduras BAL No coliformes Coliformes E. coli</p>
1	<p>Colonias blancas a beige traslúcidas, a veces viscosas con halo claro (1, 2,4, 5,7,8,9,10)</p> <p>Colonias blancas, pequeñas, redondas y brillantes y sin halo (3,6)</p>	<p>Colonias de color azul (1, 3, 4, 5,8)</p> <p>Colonias pequeñas (puntiformes) blancas (2,3,6,7,8,9,10)</p> <p>Colonias grisáceas (4)</p> <p>Colonias verdes puntiformes lisas (7)</p>	<p>Colonias medianas y pequeñas de color blanco a beige. (1,5,6,7,8)</p> <p>Colonias rojas a rosadas (2,3,6,9)</p> <p>Colonias redondas, medianas, de color violeta con halo del mismo color (4)</p> <p>No se observó crecimiento (10)</p>	<p>Levaduras BAL No coliformes Coliformes</p>
5	<p>Colonias blancas, pequeñas, redondas y brillantes y sin halo (7,3,6)</p> <p>Colonias blancas a beige traslúcidas, con halo claro (1, 2,4, 5,8,9,10)</p>	<p>Colonias pequeñas (puntiformes) blancas (2,7)</p> <p>colonias pequeñas (puntiformes) azules (3,5)</p> <p>Colonias verdes. puntiformes lisas (7)</p>	<p>Colonias color crema (1, 2,3,5,7)</p>	<p>Levaduras BAL No coliformes</p>

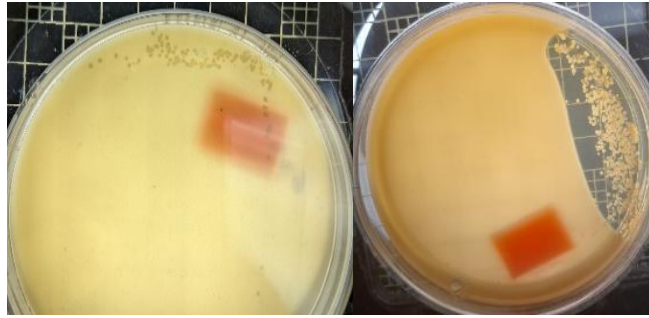


Figura N°2: Resultados obtenidos en agar GYC, en la figura del lado izquierdo tiempo cero días se observan colonias sin halo, lado derecho tiempo cinco días colonias con halo claro.

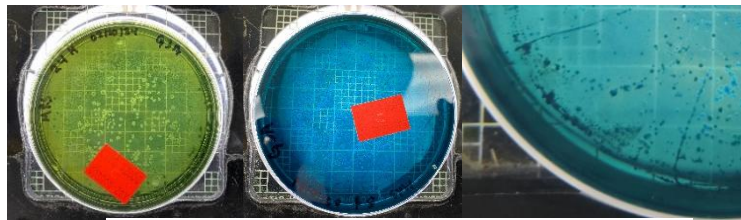


Figura N°3: Resultados obtenidos en agar MRS

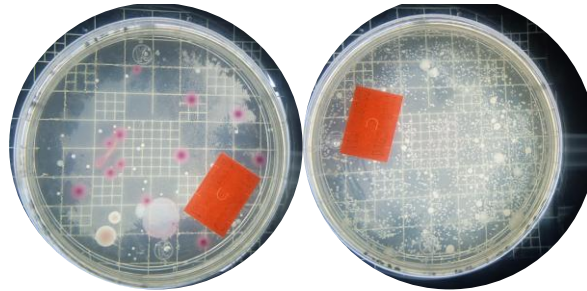


Figura N°4: Resultados obtenidos en agar Chromocult, en lado izquierdo de la figura se puede observar colonias de color rojo en el tiempo cero días, en el lado derecho de la figura se observan colonias beige a blancas en el tiempo cinco días.

Discusión de resultados de la determinación de la diversidad microbiana presente en el caldo de fermentación, aplicando la instrucción técnica IT-MICRO-02.

Detección de bacterias ácido acéticas en gar GYC: El agar GYC es un medio selectivo utilizado principalmente para el aislamiento y recuento de bacterias acéticas y levaduras presentes en productos fermentados. Su composición incluye glucosa como fuente de carbono, extracto de levadura como fuente de nitrógeno y vitaminas, y carbonato de calcio (CaCO_3) como indicador de la producción de ácidos orgánicos. Durante el crecimiento bacteriano, las bacterias acéticas oxidan el etanol a ácido acético, lo que

genera un halo transparente alrededor de las colonias debido a la disolución del CaCO_3 , fenómeno característico de este grupo microbiano ^(34,35).

En las observaciones correspondientes al tiempo 0 horas, se evidenció la presencia de colonias compatibles con levaduras, lo cual coincide con las condiciones de pH del medio fermentativo (≈ 5.5), dentro del rango óptimo de crecimiento para estos microorganismos, que se sitúa entre pH 5.0 y 6.0 ⁽³⁶⁾. En contraste, a los 5 días (ver Figura N°2), los resultados mostraron una predominancia de bacterias acéticas, identificables por la formación de halos claros. No obstante, en algunos casos no fue posible observar dicha característica, posiblemente debido a dificultades en el aislamiento, errores en la técnica de siembra o diferencias en la fuente de carbohidratos, factores que pudieron favorecer el desarrollo de levaduras sobre las bacterias acéticas.

Detección de bacterias ácido lácticas en agar MRS: El agar MRS está formulado para el aislamiento y cultivo de bacterias ácido-lácticas (BAL), tales como *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Este medio contiene fuentes de carbono y nitrógeno (glucosa, peptona y extracto de levadura), así como acetato de sodio, citrato de amonio y sales de magnesio y manganeso, que inhiben el crecimiento de microorganismos competidores y favorecen el desarrollo de BAL. Su pH inicial (~ 6.2) desciende progresivamente con la producción de ácido láctico, generando condiciones de auto-selección favorables para estas bacterias ⁽³⁷⁾.

Los resultados obtenidos mostraron un incremento progresivo del crecimiento de bacterias ácido-lácticas conforme avanzó el tiempo de fermentación, observándose una mayor densidad de colonias a los 5 días en comparación con los tiempos iniciales 0 y 24 horas (ver Figura N°3). Este comportamiento se asocia con la disminución del pH del caldo fermentativo, que alcanza valores óptimos para la proliferación de estas bacterias en las fases más avanzadas del proceso.

Detección de bacterias coliformes en agar Chromocult: El agar Chromocult es un medio cromogénico diferencial diseñado para la detección y enumeración de bacterias coliformes y *Escherichia coli* en muestras de alimentos y agua. Contiene sustratos enzimáticos específicos (X-Gal y Salmon-GAL) que permiten diferenciar las colonias en función de la actividad de las enzimas β -galactosidasa y β -glucuronidasa. Las colonias coliformes típicas adquieren una coloración rosada o roja, mientras que *E. coli* desarrolla una coloración violeta a azul oscuro, y las bacterias no coliformes se presentan blancas o incoloras ^(38,39,40).

En los resultados obtenidos, se evidenció una presencia predominante de coliformes en el tiempo 0 horas (ver Figura N°4), lo que indica contaminación inicial del sustrato. Sin embargo, a medida que avanzó la fermentación y el medio se volvió más ácido, estas bacterias fueron inhibidas por el descenso del pH, observándose una reducción significativa en 24 horas y su ausencia total a los 5 días, donde únicamente se detectaron colonias blancas, circulares y convexas, características de microorganismos no coliformes.

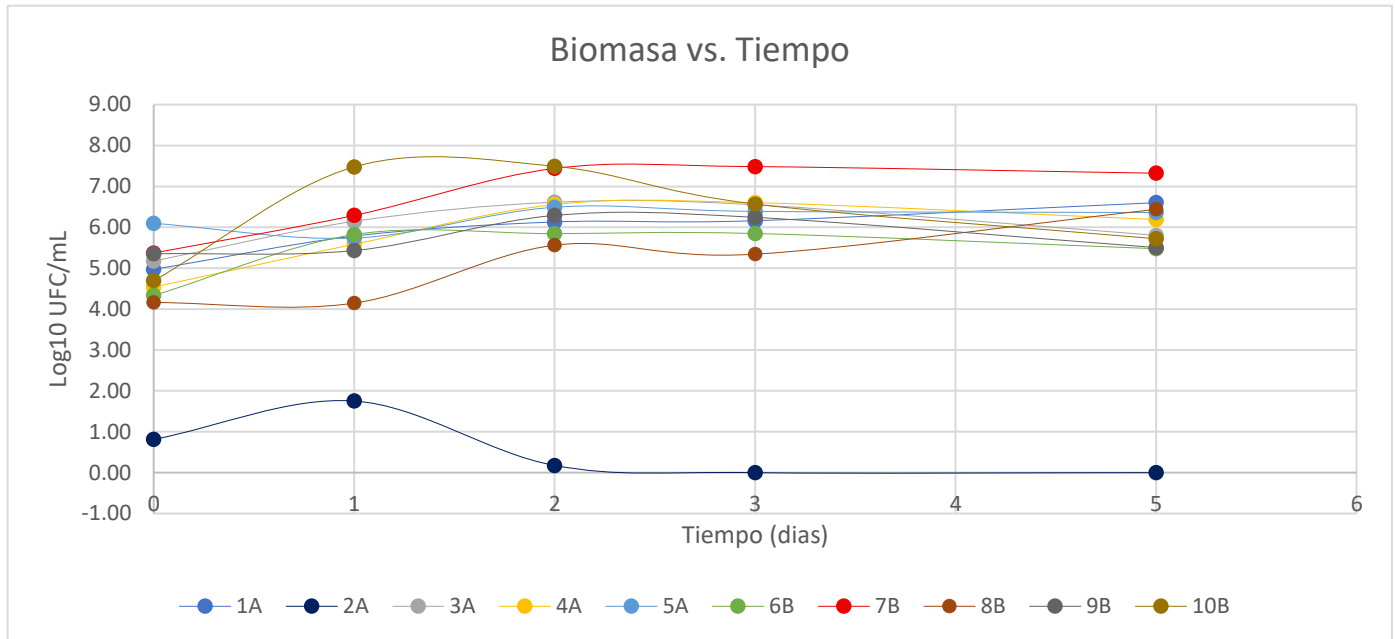


Figura N°5: Gráfico Biomasa vs Tiempo, los datos del gráfico los contiene la Tabla N°4 ubicada en el anexo N°3

La producción de etanol se considera un metabolito primario de excreción porque es un subproducto inevitable y directo del metabolismo de crecimiento (la vía metabólica que impulsa la multiplicación celular) ⁽⁴¹⁻⁴³⁾. Por esta razón, la cinética de producción de etanol es directamente paralela al aumento de la biomasa microbiana ⁽⁴²⁾, como se evidencia al comparar el gráfico de Biomasa vs. Tiempo (Figura N°5) y el gráfico de Producción de Etanol por IR ⁽³³⁾. Mientras las células están en su fase exponencial, consumen sustrato activamente para crecer y, simultáneamente, excretan etanol ^(41,42).

En teoría, una mayor biomasa debería resultar en un mayor consumo de sustrato y una mayor producción de etanol ^(43,44). Sin embargo, esta relación debe interpretarse con precaución, especialmente en fermentaciones que alcanzan altas densidades celulares. Factores adversos como la inhibición por producto (el exceso de etanol acumulado), la disponibilidad de nutrientes, la cepa utilizada, el pH y la temperatura del medio pueden actuar como factores limitantes ^(45,46). En fermentaciones espontáneas, el

control deficiente de estos factores puede llevar a una disminución en la tasa metabólica o, incluso, a la muerte celular, desacoplando la relación lineal entre la biomasa y la producción de etanol ⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾.

5.2.2 Informe de resultados de los monitoreos fisicoquímicos del proceso de fermentación, obtenidos de la aplicación de las instrucciones técnicas IT-CFQ-01, IT-CFQ-02, IT-CFQ-03, IT-CFQ-04, IT-CFQ-05, IT-CFQ-06, IT-CFQ-07.

Tabla N°2: Tabla resumen de parámetros iniciales y finales.

Equipos/tiempo (días)	°Brix (g sacarosa/100g sln)		Biomasa (Log10UFC/mL)		Etanol (%V/V)		Acidez (g de ácido/100mL sln)	
	0	28	0	28	0	28	0	28
PRE	14.02	5.78	5.3	5.78	0.3	7.4	0.06	0.78
1	13.2	0	4.97	6.6	1.8	7.7	0.54	1.12
2	14.8	5.8	0.81	DNPC	2.1	5.1	0.71	10.4
3	12	4.5	5.18	5.8	0.2	6.9	0.17	4.74
4	13.8	6	4.51	6.19	0.3	5.6	0.17	5.65
5	13.6	4.6	6.1	6.36	0.1	7.6	0.06	3.16
6	14	5.6	4.33	5.48	0.2	6	0.28	2.7
7	13.8	4.2	5.37	7.32	2.8	10	0.11	4.05
8	13.6	5.8	4.16	6.44	0.2	5.6	0.06	4.17
9	13.8	5.6	5.35	5.51	0	4.6	0.23	3.84
10	15.2	6.9	4.69	5.72	0.4	7.1	0.17	4.05

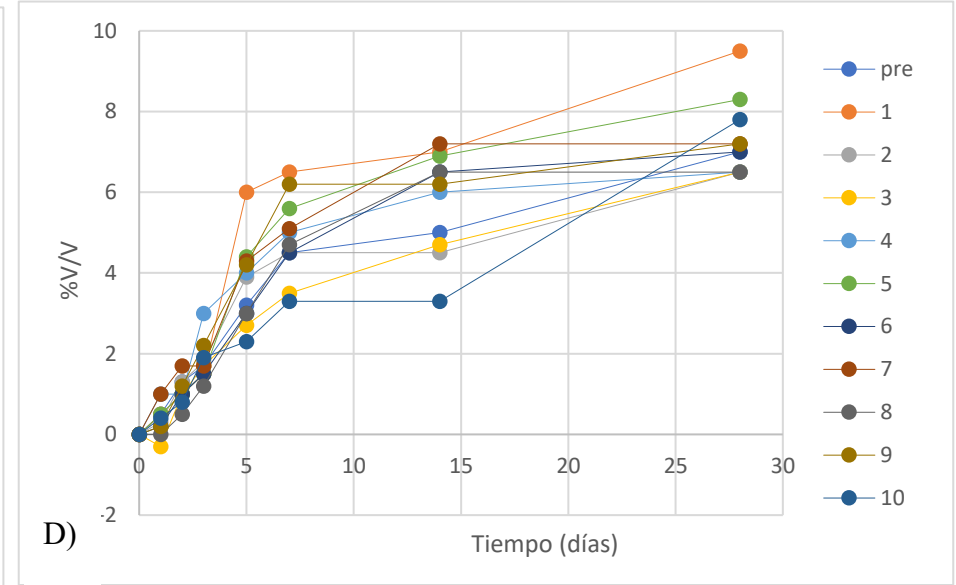
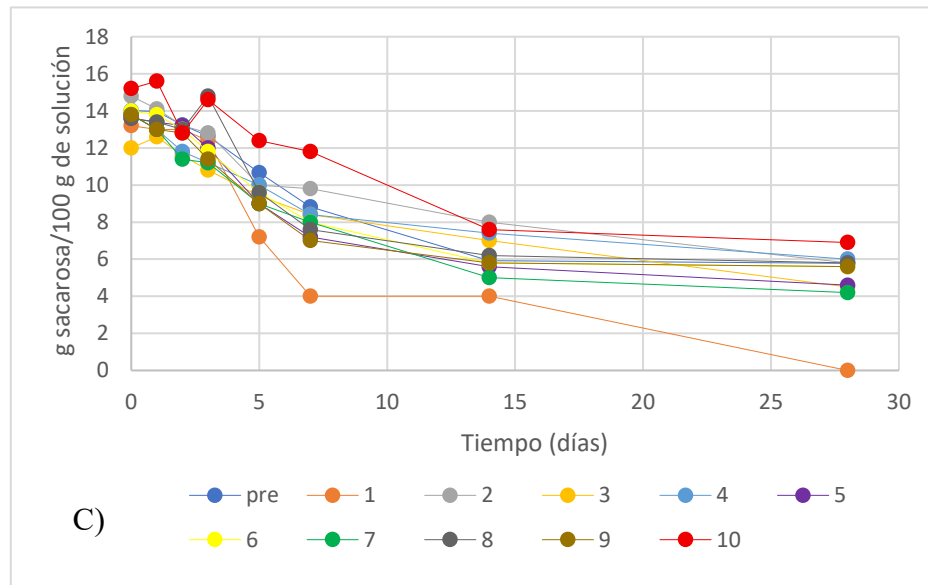
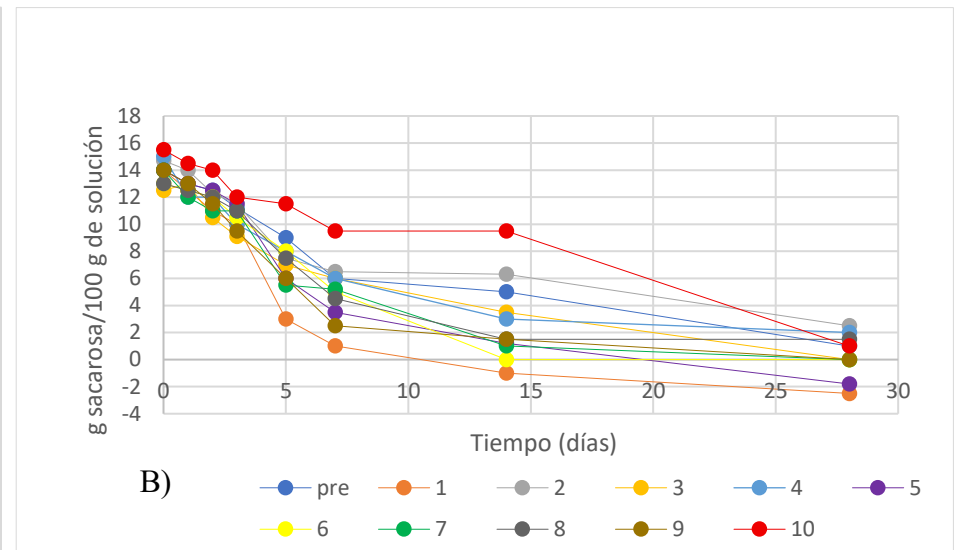
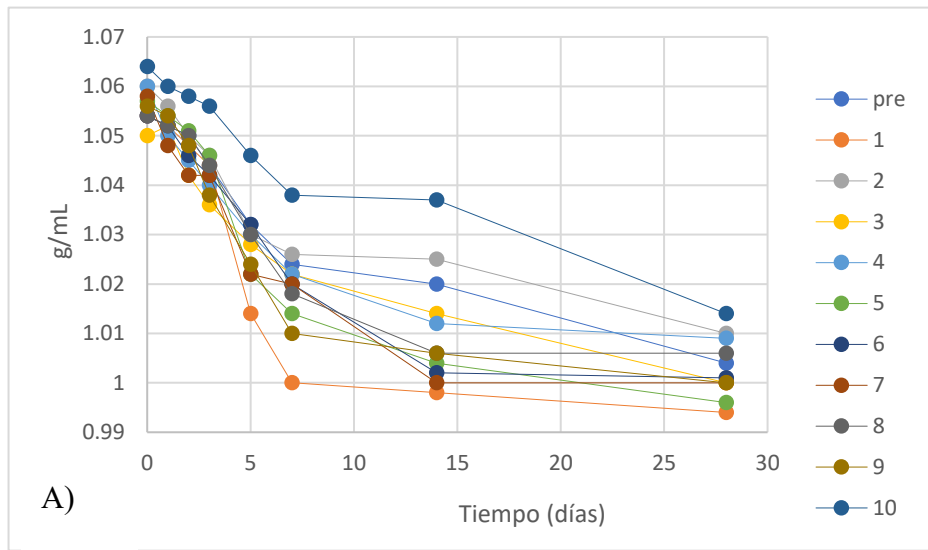


Figura N°6: Graficas que muestran la evolución temporal de los parámetros monitoreados durante el proceso de fermentación con diferentes instrumentos. A) Densidad, B) Concentración de azúcares (°Brix) medidos con densímetro, C) Concentración de azúcares (°Brix) medidos con brixómetro, D) Inferencia de la cantidad de etanol medido con densímetro. Los datos de cada grafico están en las tablas N°5, N°6 y N°7 ubicadas en el anexo 3.

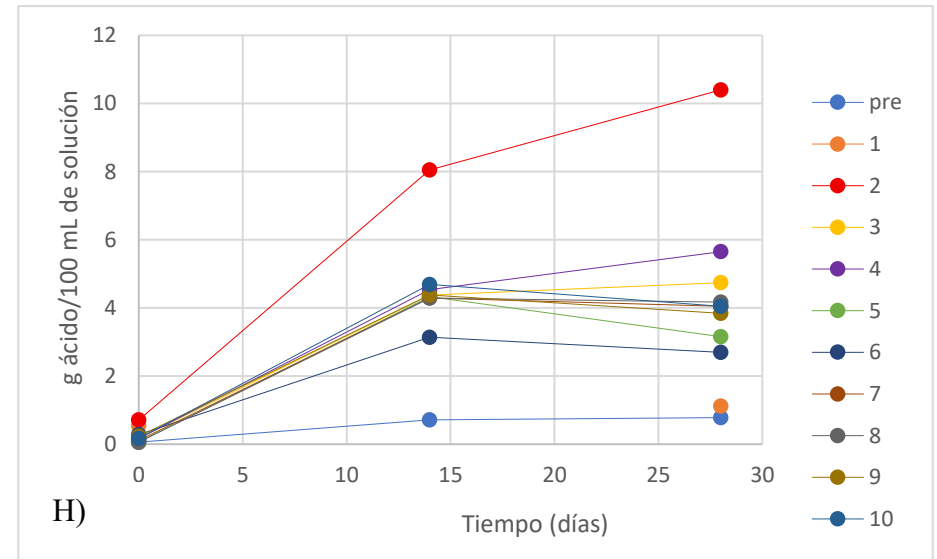
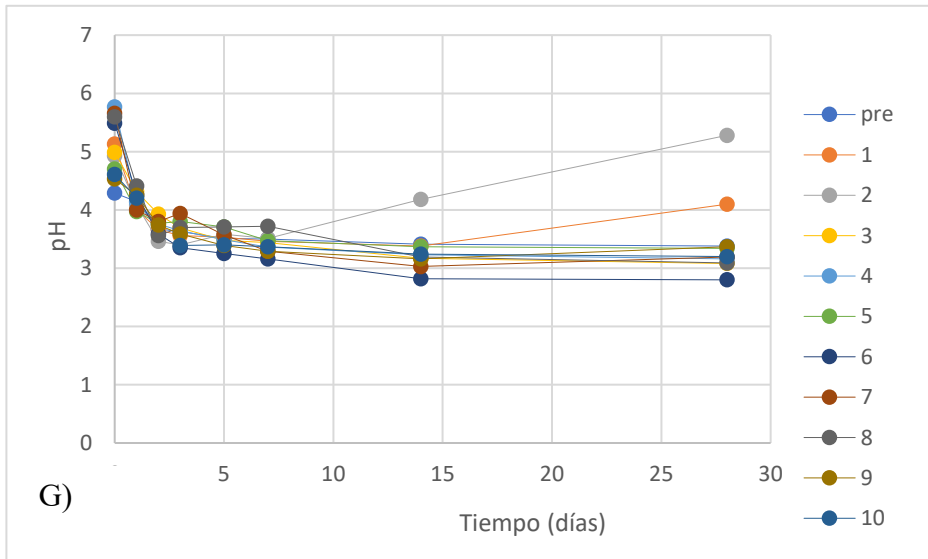
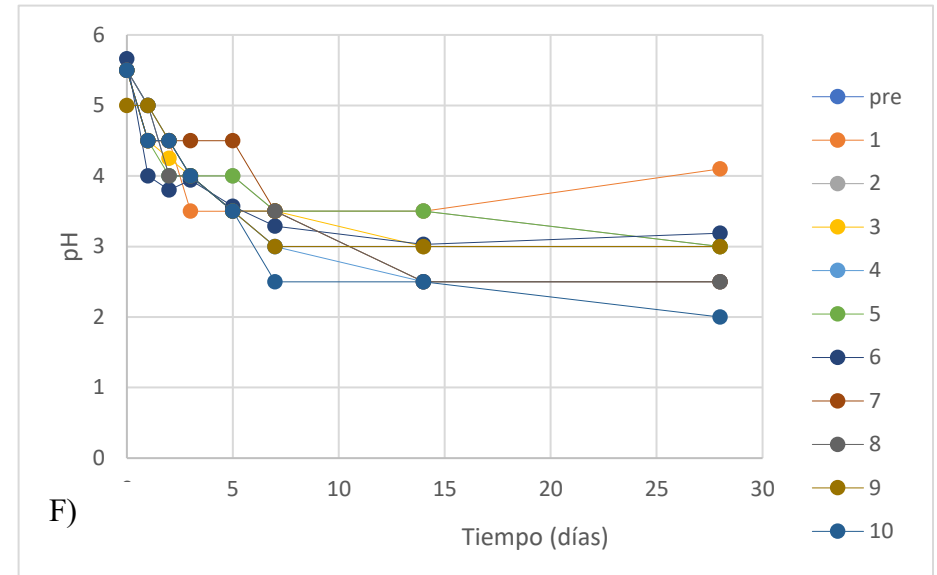
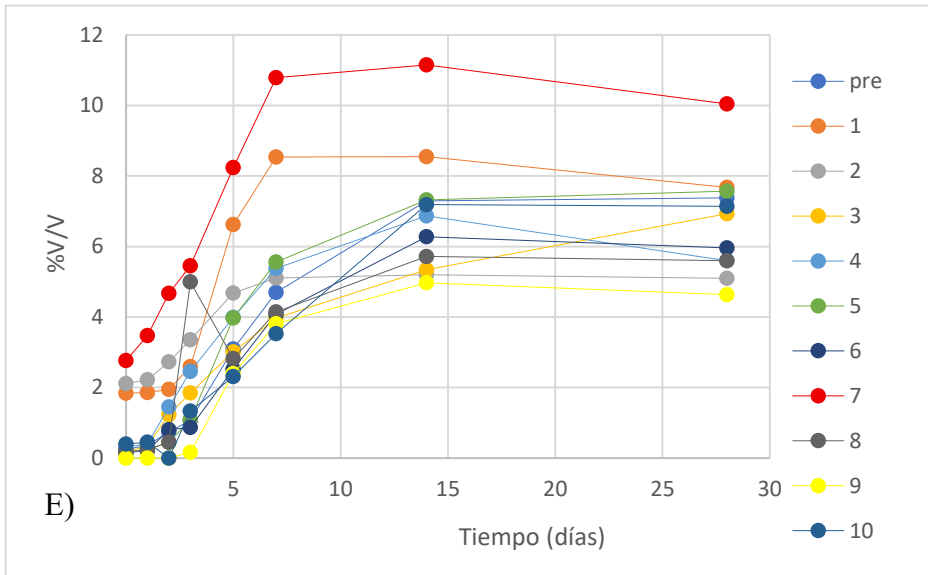


Figura N°7: Graficas que muestran la evolución temporal de los parámetros monitoreados durante el proceso de fermentación con diferentes instrumentos. E) Etanol medido con Espectrómetro Infrarrojo, F) pH medido con tiras reactivas de papel, G) pH medido con pH metro, H) Acidez, determinada por medio de micro titulación. Los datos de cada grafico están en las Tablas N°7 y N°8 ubicadas en el anexo 3.

Porcentaje de rendimiento de ácido acético y etanol:

Calculando gramos de ácido acético

Datos:

Tiempo= 0 días

Volumen gastado de NaOH=0.02 mL

Normalidad del NaOH= 0.5

$$\frac{g \text{ de ácido}}{100 \text{ mL}} = \frac{mL \text{ de NaOH} * N * 60 * 100}{1000 * mL \text{ de muestra}}$$

$$\frac{g \text{ de ácido}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.02 \text{ mL de NaOH} * 0.5 N * 60 * 100}{1000 * 1.0 \text{ mL de muestra}}$$

$$\frac{g \text{ de ácido}}{100 \text{ mL}} = 0.06$$

Convirtiendo a %P/P usando densidad

$$0.06 \frac{g \text{ de ácido}}{100 \text{ mL}} * \frac{1 \text{ mL de sln}}{1.054 \text{ g de sln}} = 0.057 \frac{g \text{ de ácido}}{100 \text{ g sln}}$$

Tiempo= 14 días

Volumen gastado de NaOH=0.24 mL

Normalidad del NaOH= 0.5

$$\frac{g \text{ de ácido}}{100 \text{ mL}} = \frac{mL \text{ de NaOH} * N * 60 * 100}{1000 * mL \text{ de muestra}}$$

$$\frac{g \text{ de ácido}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.24 \text{ mL de NaOH} * 0.5 N * 60 * 100}{1000 * 1.0 \text{ mL de muestra}}$$

$$\frac{g \text{ de ácido}}{100 \text{ mL}} = 0.72$$

Convirtiendo a %P/P usando densidad

$$0.72 \frac{g \text{ de ácido}}{100 \text{ mL}} * \frac{1 \text{ mL de sln}}{1.054 \text{ g de sln}} = 0.706 \frac{g \text{ de ácido}}{100 \text{ g sln}}$$

Calculando porcentaje de rendimiento:

$$Y \frac{x}{s} = - \frac{Pf - Po}{Sf - So}$$

$$Y \frac{x}{s} = - \frac{(0.706 - 0.057) \frac{g \text{ de ácido}}{100 g \text{ sln}}}{(5.920 - 14.020) \frac{g \text{ de sacarosa}}{100 g \text{ sln}}}$$

$$Y \frac{x}{s} = 0.080 \frac{g \text{ de ácido}}{g \text{ de sacarosa}}$$

Calculando porcentaje de etanol:

Convirtiendo a %P/V usando densidad

Tiempo= 0 días

$$0.25 \frac{mL \text{ de etanol}}{100 mL \text{ sln}} * \frac{1 mL \text{ de sln}}{1.054 g \text{ de sln}} = 0.237 \frac{mL \text{ de etanol}}{100 g \text{ sln}}$$

Tiempo= 14 días

$$7.29 \frac{mL \text{ de etanol}}{100 mL \text{ sln}} * \frac{1 mL \text{ de sln}}{1.020 g \text{ de sln}} = 7.147 \frac{mL \text{ de etanol}}{100 g \text{ sln}}$$

Calculando porcentaje de rendimiento:

$$Y \frac{x}{s} = - \frac{Pf - Po}{Sf - So}$$

$$Y \frac{x}{s} = - \frac{(7.147 - 0.237) \frac{mL \text{ de etanol}}{100 g \text{ sln}}}{(5.920 - 14.020) \frac{g \text{ de sacarosa}}{100 g \text{ sln}}}$$

$$Y \frac{x}{s} = 0.85 \frac{mL \text{ de etanol}}{g \text{ de sacarosa}}$$

Análisis de parámetros fisicoquímicos durante la fermentación

Al inicio de la fermentación, la densidad del medio es elevada debido a la alta concentración de azúcares presentes en el sustrato. A medida que las levaduras metabolizan estos azúcares para transformarlos en etanol y dióxido de carbono, la cantidad de solutos disueltos disminuye, lo que provoca un descenso progresivo de la densidad (Figura N°6 A). Este comportamiento constituye un indicador indirecto del avance del proceso fermentativo.

Conforme el etanol se acumula, la densidad continúa disminuyendo, ya que este compuesto posee una densidad menor que la del agua (0.789 g/cm^3). En consecuencia, en etapas avanzadas de la fermentación pueden registrarse lecturas muy bajas o incluso negativas al interpretar la escala del densímetro en grados Brix o grados alcohólicos.

Durante las mediciones realizadas con el densímetro, los valores de grados Brix descendieron de manera continua, llegando a registrar valores negativos (Figura N°6 B). Esto se explica porque el densímetro mide la densidad del líquido y no la concentración de azúcares directamente. Además, su lectura puede verse influenciada por la composición del medio, especialmente por la presencia de etanol, que reduce la densidad del sistema. Aunque este instrumento es de uso frecuente en fermentaciones artesanales, no está diseñado para determinar azúcares de forma específica, por lo que únicamente permite observar tendencias generales del proceso.

En contraste, el brixómetro o refractómetro es el instrumento más adecuado para la medición directa del contenido de azúcares, ya que se basa en el principio de refracción de la luz, ofreciendo una lectura más precisa y específica (Figura N°6 C). Además, presenta la ventaja de requerir solo una pequeña gota de muestra, mientras que el densímetro necesita un volumen considerablemente mayor para obtener resultados confiables.

Durante el proceso fermentativo, la disminución de la densidad observada mediante el densímetro permite inferir la conversión de azúcares en alcohol y estimar el incremento del contenido etanólico (Figura N°6 D). No obstante, debe considerarse que este instrumento no mide el alcohol de manera directa, sino que detecta los cambios en densidad, los cuales pueden verse afectados por otros factores, como la presencia de ácidos, glicerol, compuestos volátiles o azúcares residuales no fermentables. Por esta razón, el densímetro es útil para el seguimiento del proceso y la estimación del rendimiento alcohólico, pero la determinación del contenido real de etanol requiere métodos analíticos más específicos, como la espectroscopía infrarroja (IR).

En la Figura N°7 E se observa la producción de etanol registrada por todos los equipos de trabajo. A pesar de la variabilidad asociada al uso del equipo, se aprecia una producción rápida de etanol entre las 48 horas y los 14 días, seguida por una etapa de estabilidad durante el resto del proceso.

El pH del medio también mostró variaciones características del proceso fermentativo. Se observó un descenso rápido durante los primeros siete días, manteniéndose estable en las etapas posteriores. Este comportamiento sugiere una mayor producción de etanol entre los 7 y 14 días, como se muestra en la Figura N°7 G, periodo en el cual la actividad microbiana alcanza su punto máximo y los metabolitos ácidos generados inicialmente se equilibran con la formación de compuestos neutros o alcohólicos.

Por su parte, la Figura N°7 F ilustra la medición del pH mediante tiras reactivas, las cuales, aunque presentan menor precisión que el pHmetro, resultan herramientas útiles para evaluaciones rápidas y orientativas, especialmente en prácticas a microescala, donde la simplicidad y el bajo costo del método facilitan la enseñanza y el monitoreo del proceso.

En la Figura N°7 H, se observa que la producción de ácido probablemente ocurrió entre los 7 y 14 días del proceso fermentativo. No obstante, esta afirmación no puede confirmarse plenamente, ya que no se realizó una medición del parámetro en el día 7. A partir de los 14 días, el nivel de acidez se mantiene estable, lo que indica que el sistema alcanzó un estado de equilibrio.

La fermentación se inició con un valor aproximado de 13.8 °Brix, disminuyendo progresivamente hasta 4.8 °Brix al final del proceso. Esta reducción se debe al consumo de azúcares simples por parte de las levaduras, que los transforman en etanol y dióxido de carbono. La presencia activa de levaduras fue confirmada mediante recuentos microbianos (Figura N°5), evidenciando su capacidad para utilizar monosacáridos y disacáridos como fuente principal de carbono y energía.

Durante la fermentación, el metabolismo microbiano generó diversos subproductos, entre ellos etanol, dióxido de carbono y ácidos orgánicos (como el pirúvico y el láctico). Se estimó que aproximadamente el 50 % de los azúcares consumidos se convirtió en etanol, mientras que el resto se destinó a la formación de biomasa microbiana y otros productos secundarios. Asimismo, se determinó que por cada gramo de sacarosa consumida durante los primeros 14 días se produjeron en promedio 0.080 g de ácido acético y 0.85 mL de etanol, confirmando que el proceso se orientó principalmente hacia la fermentación alcohólica. La acidificación del medio, evidenciada por la disminución del pH, se relaciona con la formación de estos ácidos orgánicos, mientras que la densidad del caldo mostró una tendencia decreciente: inicialmente cercana a la del agua (1.000 kg/m^3), y posteriormente próxima a la densidad del etanol (789 kg/m^3) durante la fase alcohólica.

Tras 28 días de fermentación, la acidez total del medio fue determinada mediante titulación con NaOH 0.5 N, confirmándose que el proceso favoreció la formación de etanol como producto predominante. Al comparar los resultados obtenidos por los diez equipos de laboratorio con el ensayo realizado por la pasante de investigación, se evidenciaron diferencias atribuibles al tipo de azúcar utilizado y al grado de madurez de la fruta. Aunque la mayoría de los ensayos comenzaron con valores cercanos a 14 °Brix, se observaron variaciones en los niveles finales de etanol y acidez, dependientes de las condiciones específicas de cada fermentación. Los resultados de los equipos 6B, 7B y 10B se presentan en la Tabla N°3.

Tabla N°3: Comparación de condiciones y resultados fermentativos

Equipo	Tipo de fruta	Tipo de azúcar	Producción de etanol	Perfil de olor	Observaciones clave
6B	Piña madura	Azúcar morena	Baja	Diferente	Posible influencia de vitaminas en azúcar morena
7B	Piña madura	Azúcar blanca	Alta	Olor a fermentado	Condiciones estándar, sin anomalías reportadas.
10B	Piña menos madura	Azúcar refinada	Alta	Olor a fermentado	El tipo de azúcar pudo favorecer el proceso pese a menor microbiota en la fruta

Influencia del tipo de azúcar y madurez de la fruta en la fermentación: los resultados obtenidos sugieren que el tipo de azúcar empleado ejerce una influencia significativa sobre la eficiencia del proceso fermentativo y las características organolépticas del producto final.⁽⁴⁷⁾ El uso de azúcar morena aporta no solo sacarosa, sino también compuestos minerales y vitaminas del complejo B, los cuales pueden modificar el perfil metabólico de las levaduras y bacterias implicadas, afectando la velocidad de producción de etanol y el perfil sensorial del fermentado⁽⁴⁸⁾. En contraste, el empleo de azúcar refinada, caracterizada por su mayor pureza y disponibilidad metabólica, puede favorecer una fermentación más eficiente, incluso cuando la microbiota inicial de la fruta es menos activa⁽⁴⁹⁾.

Asimismo, el grado de madurez de la fruta constituye un factor determinante en la disponibilidad de azúcares simples y en la composición microbiana inicial del sustrato, influyendo directamente en el desarrollo y desempeño del proceso fermentativo. Por ello, la consideración de estas variables resulta

esencial en el diseño de ensayos comparativos, especialmente en contextos académicos y formativos, donde se busca comprender la interacción entre los aspectos biológicos y tecnológicos del proceso.

Aislamiento e identificación de bacterias ácido-acéticas en agar GYC: uno de los objetivos del proceso fermentativo fue el aislamiento de bacterias ácido-acéticas, para lo cual se empleó el agar GYC (Glucose Yeast Extract Calcium Carbonate). Este medio es considerado un estándar en el aislamiento de bacterias acéticas, ya que permite detectar microorganismos productores de ácido acético mediante la formación de un halo transparente alrededor de las colonias, resultado de la neutralización del carbonato de calcio por los ácidos orgánicos producidos ^(50,51).

En el agar GYC, la dextrosa actúa como fuente de carbono y energía, mientras que el extracto de levadura aporta vitaminas, especialmente del complejo B, necesarias para el crecimiento bacteriano. En este caso, se adicionó etanol al medio para ejercer una presión selectiva, favoreciendo el crecimiento de bacterias acéticas sobre otros microorganismos. Si bien algunos aislamientos presentaron colonias con halos característicos, tras la purificación e identificación mediante galería API, no se obtuvieron resultados coincidentes con perfiles de bacterias ácido-acéticas. Esto podría explicarse por el hecho de que la galería API utilizada no está diseñada específicamente para este grupo bacteriano, limitando la capacidad de identificación precisa.

5.3 Identificación de microorganismos aislados.

5.3.1 Informe de resultados identificación molecular de levaduras aisladas durante el proceso de fermentación

Se realizó una primera extracción de ácidos nucleicos utilizando el reactivo TRIzol™, siguiendo las indicaciones de la instrucción técnica IT-MICRO-03. Al finalizar el procedimiento, se observó la formación de pellets de gran tamaño, lo que indicó una posible ineficiencia en el proceso de lisis celular. Ante esta situación, el material obtenido se conservó para una segunda extracción, implementando una modificación en la etapa de incubación con el reactivo TRIzol™. Con el objetivo de favorecer el proceso de lisis, la muestra se incubó en un baño de agua a 65 °C durante 15 minutos y posteriormente se continuó el protocolo. Sin embargo, a pesar de esta modificación, los pellets obtenidos continuaron siendo de gran tamaño, lo que motivó la realización de una tercera extracción con ajustes adicionales al procedimiento. En esta tercera extracción, se trabajó únicamente con el pellet almacenado de la muestra 1 (de un total de seis muestras procesadas inicialmente). A dicho pellet se le adicionaron 1,000 µL de agua destilada estéril,

y se homogeneizó mediante vórtex para mejorar la dispersión. Posteriormente, se distribuyeron 200 μ L de la suspensión en cuatro tubos estériles, los cuales se centrifugaron a 5,000 Hz durante 3 minutos. A cada tubo se le añadió 1 mL de reactivo TRIzol™ y se incubaron en un baño de agua a 65 °C durante distintos intervalos de tiempo:

- Tubo 1: 15 minutos
- Tubo 2: 30 minutos
- Tubo 3: 45 minutos
- Tubo 4: 60 minutos

Durante el periodo de incubación, los tubos se mezclaron suavemente cada 5 minutos para favorecer la acción del reactivo. Una vez transcurridos los 60 minutos (al retirar el tubo 4 del baño), se procedió a realizar la extracción de ADN siguiendo la instrucción técnica IT-MICRO-03.

Concluida la extracción, se preparó un gel de electroforesis siguiendo los lineamientos de la instrucción técnica IT-MICRO-05 para verificar la presencia de ADN en las muestras. El gel se elaboró conforme al protocolo técnico y se corrió durante 30 minutos. Posteriormente, se colocó en una cámara con luz UV para visualizar las bandas obtenidas. Sin embargo, únicamente fue visible el marcador de peso molecular, sin evidenciarse presencia de ADN en las muestras, como se muestra en la Figura N°8.

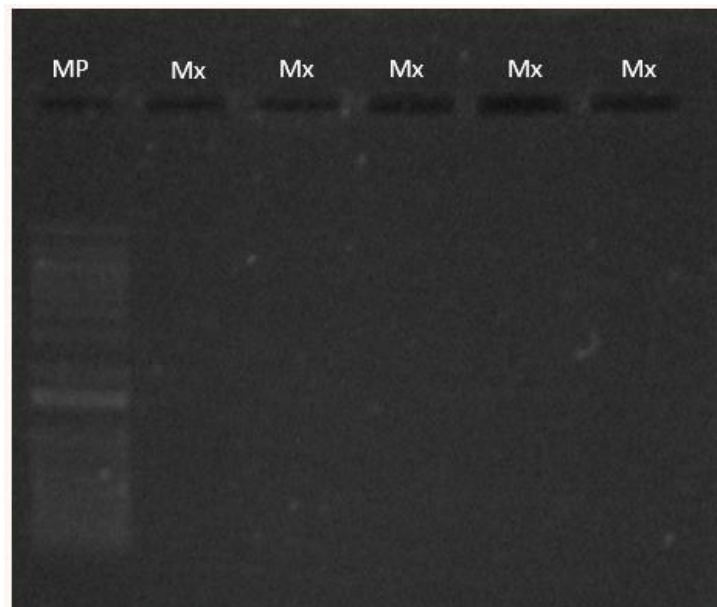


Figura N°8: Gel de electroforesis.

La ausencia de bandas visibles en el gel de electroforesis puede atribuirse, en gran medida, a una lisis celular incompleta durante las etapas iniciales de la extracción. Este fenómeno es común cuando se trabaja con microorganismos que poseen paredes celulares resistentes, como levaduras o bacterias Gram positivas, ya que el reactivo TRIzol™, aunque eficaz para la disolución de membranas en células animales o vegetales, no siempre garantiza una ruptura completa de las estructuras celulares microbianas ^(52,53). La ineficiencia en la lisis provoca que una fracción considerable del ADN permanezca retenida dentro de las células o atrapada en el pellet junto con polisacáridos y proteínas, reduciendo significativamente la cantidad de material genético disponible para visualización ^(54,55). En este contexto, se ha demostrado que la combinación de métodos químicos y mecánicos o enzimáticos, como el uso de bead-beating, líticasa o lisozima, mejora notablemente la liberación del ADN y su posterior recuperación ⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾. Por lo tanto, la ausencia de señal en el gel no necesariamente indica la falta total de ADN, sino una extracción ineficiente debida a una ruptura celular incompleta o a una purificación deficiente del material genético extraído.

CAPÍTULO VI

6.0 CONCLUSIONES

- Se diseñaron y aplicaron 12 instrucciones técnicas a microescala para el monitoreo fisicoquímico y microbiológico de los procesos de fermentación alcohólica y acética. Estas demostraron ser eficientes, sostenibles y de bajo costo, favoreciendo el control del proceso y fortaleciendo la enseñanza práctica en microbiología aplicada.
- Los monitoreos realizados permitieron caracterizar el comportamiento fermentativo, observándose una producción más eficiente de etanol entre las 48 horas y los 15 días, seguida de la formación de ácido acético entre los 7 y 15 días. Se determinó que la utilización de cáscaras de piña en estado maduro y azúcar blanca como fuente de carbono mejoró notablemente la producción y el rendimiento del producto final, evidenciando la importancia de las condiciones del sustrato en la eficiencia del proceso.
- Los resultados obtenidos confirman que la aplicación de técnicas a microescala es una herramienta efectiva para la observación, análisis y comprensión de procesos fermentativos, permitiendo obtener información valiosa con recursos mínimos y bajo impacto ambiental, lo cual refuerza su potencial como estrategia didáctica y de investigación.
- A pesar de las modificaciones aplicadas al protocolo de extracción de ADN con TRIzol™, no se logró obtener material genético visible en el gel de electroforesis. Este resultado sugiere una lisis celular incompleta o pérdida de ADN durante la purificación, por lo que se recomienda optimizar el método incorporando tratamientos enzimáticos o mecánicos complementarios para mejorar la eficiencia de extracción en levaduras.

CAPÍTULO VII

7.0 RECOMENDACIONES

- Continuar desarrollando y aplicando protocolos de monitoreo a microescala en la enseñanza de la microbiología aplicada, ampliando su uso a otros tipos de fermentaciones y productos biotecnológicos. Esto permitirá fortalecer las competencias prácticas de los estudiantes y promover el aprendizaje basado en la experimentación.
- Estandarizar las condiciones de fermentación, priorizando el uso de cáscaras de piña en estado maduro y azúcar blanca, para optimizar el rendimiento en la producción de etanol y ácido acético. Asimismo, se recomienda evaluar otros sustratos y fuentes de carbono que puedan mejorar la eficiencia y calidad del producto final.
- Promover el uso de técnicas a microescala como herramientas de investigación formativa, por su capacidad de reducir costos, consumo de reactivos y generación de residuos, manteniendo resultados representativos de procesos a mayor escala. Esta metodología puede integrarse en laboratorios docentes e iniciativas de sostenibilidad institucional.
- Optimizar el protocolo de extracción de ADN, incorporando tratamientos de lisis enzimática (como lítica o lisozima) o disrupción mecánica controlada, para mejorar la recuperación de material genético en levaduras. Asimismo, se recomienda realizar pruebas comparativas con otros métodos de extracción (como kits comerciales de purificación de ADN) que garanticen mayor integridad y pureza del ADN para análisis moleculares posteriores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. McGovern PE, Zhang J, Tang J, Zhang Z, Hall GR, Moreau RA, et al. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(51):17593–17598.
2. Hornsey IS. *A history of beer and brewing*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2003.
3. Pasteur L. *Études sur la bière: Ses maladies, causes qui les provoquent, procédé pour la rendre inaltérable*. Paris: Gauthier-Villars; 1876.
4. Madigan MT, Bender KS, Buckley DH, Sattley WM, Stahl DA. *Brock Biology of Microorganisms*. 16th ed. New York: Pearson; 2021.
5. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 7th ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2017.
6. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L. *Biochemistry*. 9th ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2019.
7. Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ. *Principles of fermentation technology*. 3rd ed. Oxford: Butterworth-Heinemann; 2016.
8. Walker GM, Stewart GG. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*. 2016;2(4):30.
9. De Deken RH. The Crabtree effect: A regulatory system in yeast. *J Gen Microbiol*. 1966;44(2):149–156.
10. Walker GM. *Yeast physiology and biotechnology*. Chichester: John Wiley & Sons; 2014.
11. Barnett JA, Bowles JN. *Yeasts: Characteristics and identification*. Cambridge: Cambridge University Press; 1998.
12. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. 7th ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2017.
13. Pretorius IS. Synthetic genome engineering forging new frontiers for wine yeast. *Crit Rev Biotechnol*. 2017;37(1):112–136.
14. De Ley J, Swings J. The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*: The acetic acid bacteria. In: *The prokaryotes*. New York: Springer; 1984. p. 267–278.
15. Gullo M, Giudici P. Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection. *Int J Food Microbiol*. 2008;125(1):46–53.
16. Trček J, Toyama H. *Acetic acid bacteria: Physiology and molecular biology*. Poole: Horizon Scientific Press; 2015.
17. De Ory I, Romero LE, Cantero D. Operation in semi-continuous with a closed pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Process Biochem*. 2004;39(7):951–956.
18. Raspor P, Goranovič D. Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Crit Rev Biotechnol*. 2008;28(2):101–124.
19. Ndoye B, Lebecque S, Dubois-Dauphin R, Tounkara L, Guiro AT, Kere C, et al. Thermoresistant properties of acetic acid bacteria isolated from tropical products of Sub-

- Saharan Africa and destined to industrial vinegar. *Enzyme Microb Technol.* 2007;40(3):551–556.
20. Lin Y, Zhang W, Li C, Sakakibara H, Tanaka S, Kong H. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass Bioenergy.* 2012;37:60–5.
 21. Kaza S, Yao LC, Bhada-Tata P, Van Woerden F. *What a Waste 2.0: A Global Snapshot of Solid Waste Management to 2050.* Washington, DC: World Bank; 2018.
 22. Ketnawa S, Chaiwut P, Rawdkuen S. Pineapple wastes: A potential source for bromelain extraction. *Food Bioprod Process.* 2012;90(3):385–391.
 23. Hossain MF, Akhtar S, Anwar M. Nutritional value and medicinal benefits of pineapple. *Int J Nutr Food Sci.* 2015;4(1):84–88.
 24. Roda A, Lambri M. Food uses of pineapple waste and by-products: a review. *Int J Food Sci Technol.* 2019;54(4):1009–1017. doi:10.1111/ijfs.14128.
 25. Chalchisa T, Dereje B. From waste to food: utilization of pineapple peels for vinegar production. *MOJ Food Process Technol.* 2021;9(1):1–5. doi:10.15406/mojfpt.2021.09.00254.
 26. Velázquez-Martínez JR, Barragán-Huerta BE, Ramírez-Coronel A, Ornelas-Paz JJ, Martínez-Bustos F. Valorization of pineapple peel: Extraction of bioactive compounds and their potential applications. *Food Bioprod Process.* 2014;92(3):328–336.
 27. Castro-Vargas HI, Rodríguez-Varela LI, Parada-Alfonso F. Pineapple peel as a source of bioactive compounds of nutraceutical potential. *Food Chem.* 2019;295:305–314.
 28. García-Martínez T, Castañeda-Valbuena D, Pérez-Bibbins B, Vázquez M. Sustainable valorization of pineapple by-products through biotechnological and food applications. *Waste Biomass Valorization.* 2022;13(4):1683–1698.
 29. Reddy LVA, Reddy OVS. Effect of carbon and nitrogen sources on ethanol production from mango (*Mangifera indica* L.) fruit juice using *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2006;22(6):585–8.
 30. Escalante-Minakata P, Rojas-López M, Díaz-Muñoz G. Microgota extendida: una técnica microbiológica en microescala. *Revista de Educación Bioquímica.* 2009;28(4):145–150.
 31. Salazar A, Rodríguez L, Arévalo N. Uso de micropipetas en técnicas microbiológicas de microescala. *Rev Colomb Biotecnol.* 2013;15(2):100–108
 32. Harris DC. *Quantitative Chemical Analysis.* 9th ed. New York: W. H. Freeman; 2016. p. 120–125.
 33. Harris DC. *Quantitative Chemical Analysis.* 9th ed. New York: W. H. Freeman; 2016. p. 260–262.
 34. Carr JG, Davies PA. The detection and estimation of acetic acid bacteria in cider. *J Appl Bacteriol.* 1964;27(2):265–272.

35. Yamada Y, Yukphan P. Genera and species in acetic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2008;125(1):15–24.
36. Walker GM. *Yeast physiology and biotechnology*. Chichester: John Wiley & Sons; 2014.
37. de Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Bacteriol.* 1960;23(1):130–135.
38. Manafi M. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media for the detection of human pathogenic microorganisms. *Int J Food Microbiol.* 2000;60(2–3):205–218.
39. Frampton EW, Restaino L, Blaszkowski N. Evaluation of the chromogenic substrate 5-bromo-6-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-GLUC) in media for the detection of *Escherichia coli*. *J Food Prot.* 1988;51(6):402–404.
40. Merck KGaA. CHROMOCULT® Coliform Agar (ISO) Instructions for Use. Darmstadt, Germany: Merck Millipore; 2015. Cat. No. 1.10426.0001.
41. Valdés A, Fernandes BD, Mota AM, Ilina A, Teixeira JA, Ruiz HA. Cinética para la producción de bioetanol usando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 para su escalamiento en reactores en columna y gas-lift. Cinética de crecimiento. 2015.
42. FERNANDOSANCHOORTIZ. Cinética de La Fermentación Alcohólica A y Efecto de La Temperatura en El Proceso de Elaboración de Alcohol. *Scribd*; 2021.
43. LibreTexts Español. 17.1C: Metabolitos primarios y secundarios [Internet]. LibreTexts Química Orgánica; 2021. Disponible en: https://espanol.libretexts.org/Bookshelves/Biología/Microbiología/17._Metabolismo_Microbiano/17.1C%3A_Metabolitos_Primarios_y_Secundarios
44. Pérez-Manríquez L, Vargas C. Cinética del proceso de fermentación de mostos en la producción de cerveza. *Dialnet*. 2020.
45. González-Robles IW. Producción de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* y *Zymomonas mobilis* inmovilizadas: propuesta para el uso de desechos orgánicos. *Repositorio CIATEJ*. 2012.
46. Díaz-Rodríguez A, Pérez B. Producción continua de etanol en un reactor de lecho fijo usando células inmovilizadas (*Saccharomyces cerevisiae*) en alginato de calcio. *Revista RECIBYA*. 2024;2(1):10-16.
47. Lin Y, Zhang W, Li C, Sakakibara H, Tanaka S, Kong H. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass Bioenergy*. 2012;37:60–5.
48. Fleet GH. Yeasts in winemaking. In: Fleet GH, editor. *Wine microbiology and biotechnology*. Chur: Harwood Academic Publishers; 1993. p. 1–44.
49. Pretorius IS. The genetic improvement of wine yeasts: Current state of play. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2000;78(3–4):317–331.
50. Carr JG, Davies PA. The detection and estimation of acetic acid bacteria in cider. *J Appl Bacteriol.* 1964;27(2):265–272.
51. Yamada Y, Yukphan P. Genera and species in acetic acid bacteria. *Int J Food Microbiol.* 2008;125(1):15–24.

52. van Burik J-AH, Schreckhise RW, White TC, Bowden RA, Myerson D. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Med Mycol.* 1998;36(5):299–303.
53. Hoffman CS, Winston F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene.* 1987;57(2–3):267–272.
54. Hoffmann C, Minkah N, Leipzig J, Wang G, Arens MQ, Tebas P, et al. DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue for bacterial community analysis. *Microbiome.* 2013;1(1):28.
55. Sokolov EP. An improved method for DNA isolation from mucopolysaccharide-rich molluscan tissues. *J Mar Biol Assoc U K.* 2000;80(5):1009–1012.
56. Fredricks DN, Relman DA. Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of PCR inhibitors. *J Clin Microbiol.* 1998;36(10):2810–2816.
57. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(10):3741–3751.
58. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: A laboratory manual.* 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

ANEXOS

ANEXO N°1
GUÍA DE LABORATORIO

Examen práctico de laboratorio

FERMENTACIÓN ALCOHOLICA Y OXIDACIÓN ACÉTICA.

INTRODUCCIÓN

El aprovechamiento adecuado de residuos como las cáscaras de piña o frutas poco utilizadas en nuestro país, como los nances y el arrayán, representaría un beneficio significativo tanto para el medio ambiente como para la economía de quienes los transforman. Al emplearse como materia prima, estos residuos dejan de ser desechos orgánicos mal gestionados y se convierten en recursos con valor agregado, contribuyendo a la sostenibilidad y al uso eficiente de productos locales.

La fermentación alcohólica y la oxidación acética son usualmente procesos secuenciales en la naturaleza. En primer lugar, las frutas ricas en mono y disacáridos son colonizadas por especies de levaduras de los géneros *Saccharomyces* o *Candida*, que bajo condiciones principalmente anaerobias utilizan dichas fuentes de carbono para crecer y obtener energía en forma de ATP, produciendo residuos como etanol y dióxido de carbono. Posteriormente el etanol producido, y bajo condiciones aerobias se produce el crecimiento de bacterias acéticas (géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* y otros), quienes obtienen energía mediante la oxidación de este sustrato generando ácido acético.

Los conocimientos de microbiología industrial permiten llevar a cabo la obtención de los productos deseados, utilizando herramientas como el monitoreo de los procesos, esto con el fin de controlar las variables que son claves en ellos y así optimizar la producción y asegurar la calidad del producto final.

En este examen práctico se pretende que los estudiantes apliquen conocimientos de mediciones microbiológicas y fisicoquímicas para desarrollar un cultivo microbiano en el que a través de los procesos de fermentación alcohólica y oxidación acética puedan obtener un vino y vinagre de frutas.

Objetivo general

- Implementar conocimientos de microbiología industrial en el aprovechamiento de un residuo de frutas.

Objetivos específicos

- Implementar las condiciones necesarias para obtener vino y vinagre a partir de cascaras de piña
- Aplicar procesos de aislamiento para identificar los microorganismos involucrados en el proceso de elaboración de vinagre.
- Monitorear las distintas fases del proceso mediante parámetros físico químicos, y microbiológicos a través de los cuales se llega a la producción de alcohol por fermentación microbiana
- Calcular rendimientos de biomasa y productos del proceso de producción de vinagre
- Elaborar un informe con los datos obtenidos.

Marco Teórico

Fermentación alcohólica

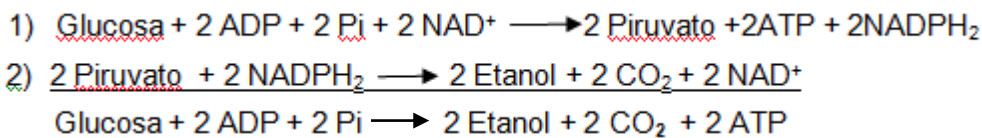
Desde el punto de vista microbiológico, la fermentación es un tipo de catabolismo parcial, que se caracteriza por ser un proceso de oxidación incompleta, típico de los organismos anaerobios y anaerobios facultativos. Se realiza, pues, sin la intervención del oxígeno. Durante la fermentación, la energía obtenida procede, igual que en la respiración aerobia, de las reacciones de óxido-reducción del catabolismo de la

glucosa (glucólisis), pero en la fermentación las coenzimas reducidas no ceden sus electrones a una cadena cuyo aceptor final es el oxígeno, sino que los ceden directamente a un compuesto orgánico que se reduce y es el producto característico de cada fermentación (láctica, alcohólica, entre otras).

Algunas de las fermentaciones actuales, son procesos conocidos desde la antigüedad ya que han sido una forma importante de conservación de los alimentos, y constituyen hoy en día una de las ramas de producción más importantes en la industria. Un ejemplo de este tipo de procesos es la producción de alcohol vía fermentativa el cual puede ser utilizado en la industria o como componente principal de una gran variedad de bebidas fermentadas. En este proceso sustratos como macerados de frutas, melazas de caña o piloncillo son fermentados generalmente por levaduras del género *Sacharomyces* u otras, el tipo de sustrato utilizado tiene una gran importancia en las características finales del producto.

La fermentación alcohólica, como todo proceso de fermentación, depende de las condiciones ambientales a las que se somete el microorganismo en presencia del sustrato. Es un proceso anaerobio que se lleva a cabo a concentraciones altas de azúcares fermentables y a pH aproximadamente de 5.0. Además, se requiere un inóculo grande y vigoroso, la temperatura de fermentación se prefiere y debe mantenerse en más o menos 20°C, para evitar pérdidas por evaporación. Este proceso tiene como finalidad biológica proporcionar energía anaeróbica a los microorganismos unicelulares especialmente levaduras y algunas bacterias, quienes en ausencia de oxígeno, disocian las moléculas de glucosa y obtienen la energía necesaria para sobrevivir, produciendo el alcohol y CO₂ como desechos en consecuencia de la fermentación. Los microorganismos causantes de este fenómeno son muy habituales en las frutas y cereales, los cuales contribuyen en gran medida al sabor de los productos fermentados.

La fermentación alcohólica consiste en que el piruvato, producto de la glucólisis, es descarboxilado a acetaldehído, que a su vez es reducido a etanol por la alcohol deshidrogenasa con el NADH como donador de electrones. A continuación se muestran las reacciones generales que ocurren en el proceso:



Se debe considerar que el etanol va aumentando de concentración durante el proceso de fermentación y debido a que es un compuesto tóxico, cuando su concentración alcanza aproximadamente un 12% de volumen las levaduras tienden a morir. Esta es una de las razones fundamentales por las que las bebidas alcohólicas (no destiladas) no alcanzan valores superiores a los 20% de concentración de etanol.

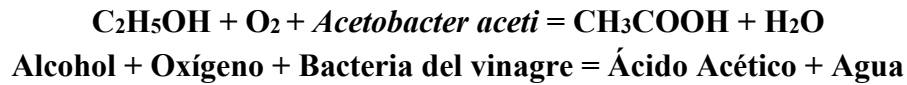
Producción de vinagre

El vinagre es un producto de oxidación de los líquidos alcohólicos a ácido acético, consecuencia del metabolismo de ciertos microorganismos. Cuando un líquido alcohólico se expone al aire, en su superficie aparece una película viscosa y gelatinosa en las que se encuentran muchas bacterias y al mismo tiempo el líquido se acidifica. Estas bacterias están clasificadas en el género *Acetobacter* en la clasificación de *Borger*, y como *Cacterium* en la *Henneberg*. Estos microorganismos requieren para su crecimiento de dotación de oxígeno constante es esta la razón por la que se desarrollan en la superficie.

Acetobacter aceti, es el microorganismo que normalmente se usa para producir vinagre con un porcentaje de ácido acético superior al 14 %. Cuando se utiliza sidra, vino o malta como materia prima se puede obtener aproximadamente 5 % de ácido acético. El color y el sabor dependen de la materia prima empleada (sidra, vino, cerveza, malta de cebada) y método de producción. Tradicionalmente, el vinagre fue producido en barriles llenos de las virutas de madera sobre el cual se rociaba el vino. En muchos países la legislación exige que el ácido acético en vinagre sea producido por fermentación y no por procesos

químicos, ya que también existen al menos tres procesos eminentemente químicos para producir ácido acético. El vinagre contiene tradicionalmente de 4 a 8 % de ácido acético en volumen.

La formación de ácido acético resulta de la oxidación del alcohol por la bacteria del vinagre en presencia del oxígeno del aire. Esta bacteria, a diferencia de las levaduras productoras de alcohol, requiere un suministro generoso de oxígeno para su crecimiento y actividad. El cambio que ocurre es descrito generalmente por:



El vinagre se conoce desde hace más que 4,000 años. Ya en el imperio de Mesopotamia se conocía como la Cerveza Acida, es decir el Vinagre de Cerveza. Sin embargo en estos tiempos no se elaborada conscientemente, si no que era fruto de circunstancias casuales. Hubo que esperar hasta que Luis Pasteur (1822- 1895) descubriera el secreto de la fermentación acética para que supiéramos que pequeños seres vivos, las **Bacterias Aeróbicas** (es decir que necesita del aire para actuar) llamadas *Acetobacter aceti* actúan sobre el alcohol etílico convirtiéndola en ácido acético.

El crecimiento de un microorganismo varía con el medio de cultivo dependiendo del contenido de nutrientes, la temperatura y la aireación durante la incubación. Hay diversas metodologías para estimar los cambios sucedidos en un cultivo microbiano.

En el caso de metodologías aplicadas a medir directamente el crecimiento microbiano se encuentran aquellas a través de las cuales se pueden determinar los microorganismos totales (viables y no viables) en el medio como las técnicas microscópicas y la determinación de la masa celular por peso, volumen u otras mediciones físicas; además son ampliamente conocidas las técnicas de recuento microbiano aplicadas a determinar los microorganismos viables en el cultivo las cuales pueden tener diferentes variantes como el recuento en placa dispersa, placa vertida y el recuento por microgota.

Las metodologías indirectas miden el aumento de masa del cultivo y también pueden ser directas e indirectas.

Las mediciones de aumento de masa directas requieren preparaciones limpias, sin partículas en suspensión aparte de los microorganismos. Se pueden mencionar las determinaciones de peso húmedo, peso seco, nitrógeno total, o algún componente característico de la biomasa como peptidoglucano, ADN, ARN, proteínas, ATP, clorofilas en organismos fotosintéticos, etc.

Las mediciones de aumento de la biomasa indirectas incluyen los métodos turbidimétricos, el consumo de nutrientes o la producción de algún metabolito.

Monitoreo de procesos.

Durante el crecimiento los microorganismos modifican el pH del medio de cultivo. Las levaduras, por ejemplo, tienen la capacidad de alterar el pH de un medio no amortiguado por los productos que generan durante su crecimiento. En la fermentación alcohólica usualmente se observa un descenso del pH debido a la producción de etanol, pero sobretodo a la de ácidos orgánicos como el málico y tartárico. Posteriormente a la fermentación alcohólica, y en el caso de que surja la oxidación acética del alcohol formado el pH es posible que descienda más debido a la formación de ácido acético. De tal modo que el monitoreo de la formación de alcohol y ácidos orgánicos, permitirá reconocer la evolución y éxito de los procesos.

Paralela a la formación de biomasa y productos como el etanol, y ácido acético en los procesos de fermentación alcohólica y acética, también se da la disminución de los azúcares en el medio de cultivo; aspecto que también puede ser monitoreado para verificar su evolución.

Tabla 1. Metodologías aplicables al monitoreo de metabolitos en procesos de fermentación alcohólica y oxidación acética.

Metabolito	Metodologías de medición
Contenido de carbohidratos	Refractometría (uso de brixómetro), método de Miller para la cuantificación de azúcares totales, densitometría, métodos enzimáticos, etc.
Etanol	Espectroscopía infrarroja cuantitativa (FTIR), densitometría, destilación-volumetría, cromatografía de gases, etc.
Ácidos orgánicos	Titulación ácido base, medición del pH, HPLC-refractometría, cromatografía de gases, métodos enzimáticos, etc.

Existen diversidad de metodologías analíticas para monitorear el aumento o disminución de los diferentes metabolitos que surgen en las fermentaciones microbianas (Tabla 1). Actualmente debido al desarrollo de los instrumentales de medición y el diseño de reactores siempre se preferirán aquellas metodologías que ofrezcan la posibilidad de realizar las mediciones en tiempo real (mediciones en línea), debido al ahorro en tiempo y recursos que dichas metodologías ofrecen.

Marcha experimental

1. Material y equipo para elaboración de aproximadamente 2 L de vinagre (Para sesión 1 monjate de fermentación).

<u>Utensilios para la preparación</u> <ol style="list-style-type: none">1. Balanza granataria2. Charolas o bandeja de plástico3. 1 gotero desechable o micropipeta4. Cuchillo5. 1 cubeta de plástico de 3 litros con tapa (lo ideal es que sea nueva).6. 1 taza medidora de 1 Lt7. 1 colador de tamaño de 1 taza8. 1 embudo9. 1 cucharón con mango mayor o igual a 20 cm y capacidad de media o de una taza10. 2 cucharas desechables11. 2 mantas o toallas de cocina12. 1 rollo de papel toalla13. 1 probeta de 250 mL14. 1 probeta de 10 mL	<u>Materia prima:</u> <ol style="list-style-type: none">1. Cascaras de una piña GRANDE, DULCE Y MADURA por persona (SAZONA PERO NO excesivamente madura)--- aproximadamente igual o mayor de 42 cm de diámetro y 20 cm de alto sin la corona \cong 750 g)2. Azucar (cantidad suficiente para llevar a 16 °Brix 1750 mL de agua)3. 1 galón de agua envasada. <u>Equipo de protección</u> <ol style="list-style-type: none">1. Gabacha, gorro, mascarilla y guantes, de estos últimos llevar repuesto por cualquier eventualidad
<u>Los elementos del 4 al 12 deben ser proporcionados por los estudiantes el día de la práctica, bien lavados y enjuagados con agua previamente hervida y luego enfriada a temperatura ambiente.</u>	<u>Todas las materias primas y equipo de protección serán proporcionados por cada grupo de estudiantes. El equipo de protección debe ser usado desde el acondicionamiento de las materias primas.</u>
<u>Equipo</u> <ol style="list-style-type: none">1. Brixómetro2. Mostómetro3. pHmetro portátil4. Incubadora 27-30 °C	<u>Medios de cultivo y materiales para siembra</u> <ol style="list-style-type: none">1. Placas con Agar Rojo de Bengala Cloranfenicol (RBC)2. Placas con Agar Chromocult3. Placas con Agar GYC4. Placas con Agar MRS5. Solución salina normal6. Micropipetas de 20 a 200 y 100 a 1000 microlitros7. Puntas para micropipetas8. Tubos con 500 microlitros de glicerol al 40%9. Microtubos (de microcentrífuga) para hacer las diluciones

2. Procedimiento

PRIMERA PARTE DEL LABORATORIO (PRIMER MIÉRCOLES)

Acondicionamiento de sustratos

Usar las medidas asepticas necesarias para evitar contaminar los sustratos descritos a continuación.

Piña

Realizar este procedimiento de uno a tres dias antes del laboratorio.

- Lavar la piña bajo el chorro de agua, para quitarle toda la tierra, sin cortar las hojas porque sirven como garantía de que no se contaminará por dentro.
- Con solución detergente y un cepillo, como de dientes, o mascón verde frotar la superficie de la piña, al cepillarla se pretende a quitar los parásitos que pudiera tener.
- Volver a enjuagar con agua **hervida fria** hasta temperatura ambiente.
- Cortar la cascara y los ojos de la piña de forma que se obtengan trozos cuadrados o circulares de un máximo de 1 cm de lado.
- Guardar toda la cascara en una bolsa plástica limpia y guardarla en refrigeración (de preferencia hacer esto un dia antes de la práctica de laboratorio).

Para el dia de la práctica, cada equipo, debe llevar desde casa al laboratorio:

- Bolsa con las cáscaras de piña
- Un galón de agua envasada.
- Un balde de tres litros graduado de 250 en 250 mL (o fermentador de 4 L)
- Un cuchillo para picar las cascara de piña si es necesario.
- Azúcar en cantidad suficiente para llevar 1.75 litros de agua a 16 grados Brix (1 °Brix = 1 g sacarosa/100 g de solución, 2 °Brix = 2 g de sacarosa/100 g de solución y asi sucesivamente). En el caso de fermentador de 4 L hacer el cálculo para 2.35 litros.
- 2 cucharas pequeñas para transferir las cascara de piña al balde.
- 1 taza medidora de 1 Lt
- 1 colador de tamaño de 1 taza
- 1 embudo
- 1 cucharon con mango mayor o igual a 20 cm y capacidad de media o de una taza
- 2 mantas o toallas de cocina
- 1 rollo de papel toalla

Tabla 1. Cantidades de materiales para el desarrollo del proceso

Material	Formula 3 L	Formula 4L
Cascara de piña	750 g	1000g
Azúcar	csp llevar a 16°Brix	csp llevar a 16°Brix
Agua total	1750 mL	2350 mL
Primer porción de agua	1250 mL	1500 mL
Segunda porción de agua	500 mL	850 mL

2.1 Fermentación alcohólica-acética de jugo de cáscaras de piña

a. Antes de iniciar el proceso, hacer la graduación del balde o fermentador en volúmenes de 250 en 250 ml y pesar el balde o fermentador vacíos.

b. En el laboratorio pesar las cáscaras de piña (anotar el peso en la bitácora)

c. En el balde transparente, disolver completamente la cantidad de azúcar necesaria para tener los °Brix indicados, en la primera porción de agua

d. Añadir las cáscaras al reactor (balde o fermentador) con agua azucarada. (en el caso de la fórmula de 4 L añadir primero agua y luego cáscaras al fermentador)

e. Mezclar homogéneamente la solución azucarada con las cáscaras de piña.

f. Añadir la segunda porción de agua. Mezclar nuevamente.

g. Determinar el peso y el volumen neto de la mezcla.

h. Tapar el reactor (balde o fermentador) con su tapa. Similar a lo mostrado en la Fig.1

i. Después de 5 minutos tomar la muestra de inicio de fermentación ($t=0$) de la manera siguiente:

1. Con ayuda del cucharón, el colador y el embudo, filtrar aproximadamente 230 mL de muestra y colocar en la probeta de 250 mL higienizada, para realizar la medición con el densímetro como se indica en el anexo 1.

2. Después de la medición de densidad, porcentaje de etanol y grados brix con densímetro, medir grados Brix con Brixómetro como se indica en el anexo 2.

3. Una vez realizadas las mediciones anteriores, tomar 30 o 100 mL (dependiendo de tiempo de muestreo ver tabla 2), guardarla en bolsa plástica resistente a la congelación. El resto de la muestra devolverla al reactor. *Nota: Antes de tomar la muestra agitar cuidadosamente el reactor.*

4. En la bolsa de muestreo, medir el pH con ayuda de pHmetro portátil como se indica en el anexo 3.

5. De la bolsa de muestreo tomar 20 microlitros de filtrado y procesar para recuento y detección de microorganismos, según lo indicado en los subnumerales 2.2.3 y 2.2.4 del numeral 2.2 "Monitoreo inicial del proceso ($t=0$)". Nota, solamente para tiempo cero se realizará el recuento de manera inmediata, para los demás tiempos de muestreo se guardara muestras en glicerol para ser procesada posteriormente. Procedimiento para preparación de glicerol: tomar aproximadamente 500 μ L de muestra y agregarlos en el microtubo conteniendo 500 μ L de glicerol al 40%.

6. Rotular e identificar bien la bolsa y el glicerol, con el número de equipo, tiempo de muestreo, fecha, y conservarlos en congelación (-4°C a -2°C) para análisis posterior.

j. Guardar el reactor en un lugar fresco y oscuro



Figura 1. a) Balde de 3 litros b) fermentador, usados como reactor en

- k. Elaborar un registro donde se puedan documentar los cambios en las características sensoriales de la fermentación en esta fase y la siguiente del proceso.

Tabla 2. Tiempos, actividades y volúmenes de muestreo.

Tiempo Medición	0	24 h	48 h	3 d	5 d	7 d	14d	28d
Biomasa	Gli	Gli	Gli	Gli	Gli			
pH	pHmetro	pHmetro	pHmetro	pHmetro	pHmetro	pHmetro	pHmetro	pHmetro
Densímetro*	si	si	si	si	Si	si	Si	si
Brixómetro	100 mL	30 mL	30 mL (bolsa); 250 mL botella anaerobia	30 mL	30 mL	30 mL	30 mL	100 mL
pH (con pHmetro)								
Etanol por IR								
Acidez**								

Gli= Glicerol: 500 µL de muestra + 500 µL glicerina al 40%.

*Densímetro. se obtiene tres mediciones: densidad, potencial de alcohol y °Brix.

** La acidez también se determinará a los 28 días, en la porción sometida a anaerobiosis.

A los 72 horas-3 días (Separación de porción para fase anaerobica de la fermentación alcohólica):

- l. Separar aproximadamente 250 mL del caldo de fermentación y colocarlo en un frasco de vidrio con diametro de apertura de un máximo de 7 cm.
- m. Hacer la medicion de grados brix y calcular la cantidad de azucar necesaria para para llevar los 250 mL de caldo de fermentación a 12 grados brix, y mezclar.
- n. Cerrar el frasco usando la trampa de aire proporcionada en el laboratorio para que esta porción continúe con la fermentación alcohólica (Fig. 2 a y b).



Figura 2. a) frasco lechero con boca ancha, b) Trampa de aire conectada a un garrafón de vidrio.

2.2 Monitoreo del proceso .

2.2.1 Mediciones con de azúcares, densidad y potencial de alcohol

- Realizar el procedimiento descrito en el anexo 1. “Determinación de la densidad, azúcares totales y potencial de alcohol de la fermentación, utilizando un densímetro (mostimetro)” y en el anexo 2.
- Realizar y tabular las 3 lecturas y calcular el % de alcohol.



Figura 3. Ejemplo de visualización del mostimetro

2.2.2 **Medición de pH.** Se medirá utilizando un pHmetro portátil y siguiendo el procedimiento descrito en el anexo 3. “Determinación de pH, utilizando un pHmetro portátil”.

2.2.3 Recuento de levaduras por la técnica de microgota extendida.

- Realizar todas las operaciones indicadas en el anexo 4 “Recuento de levaduras por la técnica de microgota utilizando agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC)” aplicando técnicas asépticas.
- Realizar el cálculo de las unidades formadoras de colonia en la muestra evaluada.

2.2.4 **Detección de diferentes microorganismos en la fermentación.** Realizar todas las operaciones indicadas en el anexo 5. “Detección de presencia o ausencia de diversidad microbiana presente en el caldo de fermentación en agar GYC, MRS y Chromocult”.

2.2.5 **Determinación de la Acidez.** Esta determinación solo se realizaría en la tercera sesión de la práctica siguiendo las operaciones indicadas en el anexo 6 “Determinación de la acidez, por microtitulación”

SEGUNDA PARTE DEL LABORATORIO (TERCER MIÉRCOLES).

Materiales para continuidad de proceso (adicionales a los que ya se tienen para trabajar)

- Un gorro nuevo (de material desechable)
- Un balde de 3 litros adicional al ya usado en la fermentación o un recipiente similar (en este caso no es necesario que sea transparente).
- Gasa

Medios de cultivo y reactivos. Placas con agar TSA o agar nutritivo, solución salina normal, reactivos para tinción de Gram.

Consumibles y equipo para mediciones microbiológicas

Placas de petri de 150 x 15 mm	Micropipetas de 100-1000 microlitros
Puntas estériles para micropipetas	Micropipetas de 20-200 microlitros o de 10 a 100 microlitros.

2.3 Procedimiento para oxidación acética

- a. A los 14 días de iniciada la fermentación abrir el reactor y separar los sólidos del líquido utilizando el colador con el gorro nuevo, para separar los sólidos, vertiendo el contenido sobre el balde adicional. Exprimir de manera de recuperar la mayor cantidad de líquido posible, luego desechar los sólidos.
- b. Realizar toma de muestra y mediciones fisicoquímicas como se indica en el tiempo cero y la sección 2.2. En el caso de las mediciones microbiológicas este día se realizarán los recuentos y aislamientos a partir de los gliceroles almacenados (24, 48, 3d y 5d). según lo indicado en la tabla 3 y en la sección 2.5.
- c. Tapar el reactor.
- d. Determinar el peso del reactor con el caldo de fermentación ya filtrado.
- e. La mitad de los equipos: guardar en lugar fresco y oscuro del laboratorio durante aproximadamente 14 días más (hasta el siguiente laboratorio). La segunda mitad de los equipos: adaptar y sumergir la manguera del aireador (bomba de pecera) tapandolo con gasa por debajo de la tapa, encenderlo y guardar en lugar fresco y oscuro garantizando el funcionamiento del aireador por los siguientes 14 días (hasta el siguiente laboratorio).

A la muestra con trampa de aire:

- a) Seguir incubando
- b) Reservar todo el contenido para realizar (en el siguiente laboratorio) la medición de etanol potencial con mostimetro, pH con potenciómetro, grados Brix con brixómetro y acidez por titulación.

Tabla 3. Operaciones microbiológicas para cada tiempo de muestreo

Muestra Medio	0 h	24 h	48 h	3 d	5 d
DRBC		Recuento (-1, -2, -3, -4)	Recuento (-1, -2, -3, -4)	Recuento (-1, -2, -3, -4)	Recuento (-1, -2, -3, -4)
Chromocult		Estriado (-1)			Estriado (-1)
GYC		Estriado (-1)			Estriado (-1)
MRS		Estriado (-1)			Estriado (-1)
TSA	Estriado a partir de aislados en GYC				

2.5 Selección de microorganismos de interés a identificar

- a. Se utilizara ya sea las placas de aislamiento en GYC, Chromocult o DRBC de la sesión anterior o de esta sesión, según el interés de aislamiento asignado en coordinación con los docentes.

- b. Verificar la morfología macroscópica de los microorganismos presentes en placa seleccionada y describir en bitácora.
- c. Tomar una colonia del tipo más abundante en la placa y que presente las características buscadas. (halo claro en GYC, ausencia o presencia de coloración en Chromocult y características morfológicas de levadura en DRBC).
- d. Realizar nuevamente aislamiento por estriado en placa del mismo medio de procedencia de una sola colonia con las características esperadas. incubar a temperatura adecuada durante 1 o 2 días. (hasta jueves o viernes)
 1. Si se se siguen observando las características deseadas, realizar tinción de Gram y observación microscópica en esta sesión (jueves o viernes).
 2. Dependiendo de los resultados del paso anterior sembrar en tubo con 5 mL de TSB o caldo sabouraud con o sin etanol (3%) e incubar a temperatura adecuada.
 3. Almacenar en un criovial 500 μ L del cultivo en caldo más 500 μ L de glicerol al 40% y congelar (viernes o lunes).

Preguntas de Discusión sesión 1 y 2 del laboratorio.

1. Elaborar un diagrama de flujo en bloques de los procedimientos seguidos en la realización de la práctica. (Operaciones unitarias).
2. Elaborar una tabla que refleje los resultados del monitoreo de esta fermentación
3. Elaborar las gráficas de: biomasa (UFC/mL) vs. tiempo, pH vs tiempo, °brix vs tiempo y densidad vs. tiempo.
4. Realizar la interpretación de los resultados obtenidos en las placas de GYC, MRS y Chromocult para coliformes.
5. Indicar el rendimiento de producción de vinagre dividiendo el peso neto final entre el inicial y multiplicando por cien.
6. ¿Cuál es la diferencia entre la fermentación salvaje (Wild fermentation o fermentación natural) y el uso de cultivos starter (cultivos iniciadores)?
7. ¿Que beneficio tiene usar cascaras de piña tanto para el medio ambiente como para los productores de piña?
8. ¿Es posible realizar la fermentación alcohólica de otros sustratos como aceite de coco, petróleo, almidón de maiz o un compuesto carbonado de cadena larga? Explicar detalladamente para al menos un sustrato.
9. ¿Todos los microorganismos de la naturaleza son capaces de realizar la oxidación del alcohol? Mencione ejemplos de los que si pueden y explique porque pueden hacerlo.
10. Explicar las características y diferencias entre: vino de mesa, vino generoso, aguardiente, alcohol industrial (espíritu neutro), cerveza, y bebidas malteadas.
11. Explicar las características y diferencias entre: vinagre balsámico, vinagre de piña, vinagre de caña y vinagre de manzana.

TERCERA PARTE DEL LABORATORIO (QUINTO MIÉRCOLES).

Determinación de alcohol, acidez total e identificación del aislado seleccionado.

Material y equipo

a) Muestras para realizar las diferentes mediciones.

- II. Se utilizarán las muestras tomadas de 30 y 100 mL conservadas en congelación.
- III. La muestra tomada en este día (28 d) se procesará de la misma manera que las anteriores exceptuando la congelación.
- IV. Se utilizará el glicerol preparado en la sesión anterior para identificar el microorganismo aislado.

b) Medios de cultivo y reactivos. Placas con de agar TSA o nutritivo, solución salina normal, hidróxido de sodio 0.5 N, agua neutra, pruebas API

c) Consumibles y equipo

Placas de petri de 150 x 15 mm	Micropipetas de 100-1000 microlitros
Puntas estériles para micropipetas	Micropipetas de 20-200 o 10-100 microlitros
Portaobjetos y cubreobjetos	Microscopio
2 jeringas de tuberculina de 1 mL	Puntas azules
1 válvula de tres vías	Balanza semianalítica.
Puntas amarillas	
Nota: Los estudiantes deben llevar: válvula de tres vías, jeringas de tuberculina (2), colador, gorro limpio para filtrar, taza medidora de 1Lt y un recipiente (botella o balde pequeño bien lavado y esterilizado con agua hervida) para almacenar el vinagre obtenido. No olvidar: Equipo de protección personal (Gabacha, gorro, mascarilla y guantes), además de papel toalla y marcadores de uso personal para rotular.	

2.6 Determinación de alcohol por espectrofotometría IR. Se determinará el alcohol con FTIR conforme a lo indicado en el Anexo 7: “Determinación de acidez por espectrometría IR” y la tabla 2.

2.7 Determinación de la acidez total. Se utilizarán las muestras de tiempo cero (t=0), , la de día 14 (t=14), la de la presente práctica (t=28), la de 250 mL colocada con trampa de aire, total= 4 muestras, para realizar mediciones de acidez según lo indicado en el apartado 2.2.5 anexo 6 “Determinación de la acidez, por microtitulación”.

2.8 Identificación del microorganismo aislado

1. Se utilizará el criovial con el microorganismo seleccionado en la sesión anterior.
2. realizar un pase a agar TSA o nutritivo mediante el método de estriado e incubar de 30 a 32 °C durante 24 horas.
3. Con colonias frescas realizar nuevamente la tinción de Gram y a continuación:
 - i. Si presentan características de bacterias G(-) realizar prueba de oxidasa, y si presentan características de bacterias G(+) realizar prueba de catalasa.
 - ii. En cualquier tipo de coloración de Gram realizar la prueba de oxidasa

4. Si se confirma la reacción de oxidasa realizar la identificación con kit API 20E, 20CAux, o dejar indicado si se requiere otro tipo de galería de identificación.

Preguntas de Discusión parte 3 del laboratorio. (Incluir las respuestas en el informe de laboratorio, en prosa, sin reescribir la pregunta).

1. Describir la morfología macroscópica y microscópica de los microorganismos aislados ¿Cuál podría ser la identidad de estos aislados? ¿Son los únicos microorganismos presentes en todo el proceso hasta llegar a vinagre? ¿Qué otros microorganismos es posible que se encuentre en el proceso?
Elaborar una tabla que correlacione todas las preguntas.
Diferencias entre bacterias y levaduras
2. Construir las tablas y graficas de la o las cinéticas de producción graficando, por separado, los cambios de concentración de las siguientes variables contra el tiempo de muestreo de la fermentación: acidez (solo 2 puntos), pH, grados Brix y alcohol (8 puntos).
3. Explique a qué se debe el comportamiento observado en las gráficas de pH y grados Brix.
4. Se observan diferencias respecto a las gráficas obtenidas en la práctica anterior?
5. Con los datos disponibles (ácido, alcohol y azúcares), calcular el rendimiento de ácido acético y de alcohol (g de cada producto por gramo de sacarosa consumida), tomando en cuenta los datos iniciales y los puntos de 250 mL de las 48 h y del día de la práctica

Nota: Recordar que 1 grado brix equivale a 1 g de sacarosa por 100 g de solución, pero recalculer g de sacarosa/mL de solución tomando en cuenta el peso inicial y el final de la solución acuosa.

Ejemplo:

Si en el tiempo cero la medición les indicó 16 °Brix significa 16 g de sacarosa en 100 g de solución, pero al inicio se tenían 1750 mL de agua y con el azúcar subieron a aproximadamente 1850 mL.

Entonces asumiendo que se alcanzó un volumen aproximado de 1850 mL serían $16 \times 18.5 = 296$ g de sacarosa en 1850 mL de agua que darían 0.16 g/mL.

Realizar un cálculo similar para el día de la práctica pero midiendo (mL) y pesando (g) previamente el volumen de vinagre obtenido después de los muestreos.

6. De acuerdo con los resultados obtenidos, ¿Qué procedimientos o manipulaciones podrían modificarse para obtener un mejor vinagre?.
7. De las metodologías de monitoreo utilizadas ¿cuales se pueden realizar únicamente de manera manual? y ¿cuales tienen el potencial de acoplarse al sistema para poder registrar datos de forma automatizada?.

Anexo 1. Determinación de la densidad, azúcares totales y potencial de alcohol de la fermentación, utilizando un densímetro.

El densímetro es un instrumento de medición que se utiliza para determinar la densidad relativa de los líquidos, sin calcular su masa y volumen previo a su utilización. Este tiene la capacidad de flotar en las muestras líquidas y proporcionar en una de sus escalas una lectura de la densidad relativa o gravedad específica en unidades de g/mL.

Este instrumento posee tres escalas: densidad, grados brix y potencial de alcohol.

El densímetro da una medición de potencial de alcohol, pero es necesario reportar los datos como porcentaje de alcohol, por lo que debe calcularse aplicando la fórmula:

Porcentaje de alcohol = $\frac{\text{potencial de alcohol inicial} - \text{potencial del tiempo específico a calcular}}{\text{potencial de alcohol inicial}} \times 100$

Ejemplo:

Potencial de alcohol inicial: 11%

Potencial de alcohol final: 1%

Porcentaje de alcohol = $\frac{11 - 1}{11} = 10\%$ (mL de alcohol / 100 mL de solución).

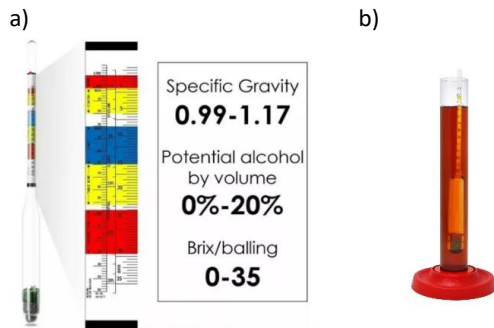


Figura 1: a) Escalas de un densímetro. b) Medición con densímetro.

Materiales:

- Densímetro
- Probeta de 250 mL
- Embudo
- Colador
- Papel toalla
- Pisseta con agua
- Muestra

Procedimiento:

1. Homogenizar el caldo de fermentación, extraer un volumen de aproximadamente 200 mL y filtrarlo haciéndolo pasar por el colador, recibir este filtrado en la tasa medidora.
2. Agregar aproximadamente 200 mL del filtrado a la probeta de 250 mL, introducir el densímetro de manera de que flote libremente teniendo el cuidado de no dejarlo caer porque golpeará en el fondo de la probeta y puede romperse, si hay presencia de burbujas girarlo para quitar cualquier burbuja adherida.
3. Leer por sobre el nivel del líquido y en la base del menisco (Fig.2), ubicando la medición en una de las tres escalas (grados brix, densidad relativa o potencial de alcohol), realizar las lecturas y documentar.



Figura 2: Lectura del menisco en la medición con densímetro.

4. Lavar con abundante agua y secar con papel toalla.

Tabla 1: Documentación de resultados.

Mediciones con densímetro			
Tiempo (días)	Densidad	Potencial de alcohol	°brix
0			
1			
2			

Anexo 2. Determinación de azúcares totales presentes en el caldo de fermentación, utilizando Brixómetro.

La cantidad de azúcar disuelta en el caldo fermentativo condiciona directamente tanto la cantidad de biomasa que se formara a partir de este sustrato como la cantidad de etanol (producido por las levaduras que consumen los azúcares disponibles). El brixómetro por medio del índice de refracción de la luz permite estimar el contenido de azúcares.

La refracción es el cambio en la dirección de la luz cuando pasa de un medio a otro, el comportamiento de esta cambia a medida que aumenta la concentración de solutos (sustancias disueltas en la mezcla). El brixómetro utiliza este principio para determinar la concentración de azúcares disueltas en una solución, en una fermentación alcohólica principalmente es sacarosa.

El brixómetro proporciona una lectura de gramos de sacarosa por 100 mililitros de solución, por lo que se puede expresar la siguiente relación: $1^{\circ}\text{brix} = 1 \text{ g de sacarosa}/100 \text{ g de solución}$.

Materiales:

- Brixómetro
- Piseta con agua destilada
- Papel Kleenex
- Pipeta Pasteur
- Muestra

Procedimiento:

1. Con ayuda de la piseta, colocar una gota de agua destilada en el prisma del brixómetro, cerrar el cubreobjetos suavemente y observar por el ocular que este ajustado en cero. Si la lectura no estuviera en la marca del cero, ajustarlo.
2. Limpiar cuidadosamente el lente con papel Kleenex.
3. Utilizando una pipeta Pasteur colocar 1 o 2 gotas de la muestra en el prisma, cerrar el cubreobjetos y realizar la medición, documentar.
4. Lavar con abundante agua y secar con papel Kleenex.

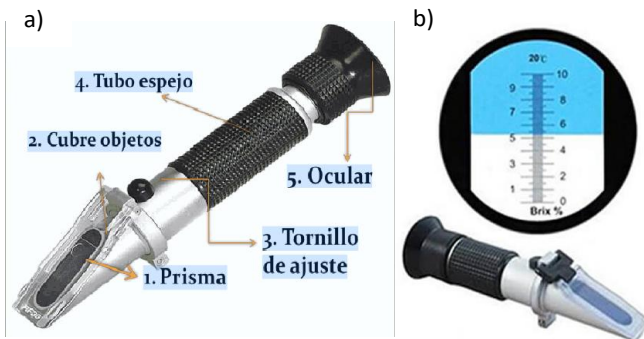


Figura 1: a) Partes de un brixómetro. b) brixómetro y su escala.

Tabla 1: Documentación de resultados.

Determinación de °brix	
Tiempo (días)	°brix
0	
1	
2	

Anexo 3. Determinación de pH, utilizando un pH metro portátil.

El pH metro es un instrumento electroanalítico que mide la actividad del ion hidrogeno en soluciones acuosas, indicando su grado de acidez o alcalinidad expresada como pH.

Es necesario colocar la tapa después de su uso para que el electrodo no se seque por la exposición prolongada al aire y de como resultado mediciones inestables o lentas, si esto ocurre debe sumergir el electrodo en agua destilada durante algunas horas.

Calibración de pH metro (este proceso será hecho por los técnicos de laboratorio previamente):

1. Preparar las soluciones tampón en 250 mL de agua destilada.
2. Encender el pH metro.
3. Sumergir el electrodo en la solución de pH 6.86 a 25°C, presionar el botón CAL durante 5 segundos y soltar, la pantalla parpadeara en el valor 6.86, esperar hasta que deje de hacerlo, lavar con agua destilada y secar.
4. Seguido sumergir el electrodo en la solución de pH 4.00 a 25°C, presionar el botón CAL durante 5 segundos y soltar, inmediatamente presionar nuevamente el mismo boton, la pantalla parpadeara en 4.00, esperar hasta que deje de hacerlo, lavar con agua destilada y secar.
5. Coloque el electrodo nuevamente en la solución tampón, si la medición es incorrecta, repita la calibración
6. Si sabe que el pH aproximado de la solución de prueba es superior a 7,0, calibre el dispositivo utilizando una solución de 6.86 y 9.18 siguiendo los mismos pasos descritos anteriormente, exceptuando que en lugar de buffer 4.00, se utilizara buffer 9.18.



Figura 1: escala de pH y partes de un pH metro.

Materiales:

- pH metro
- Papel Kleenex
- Pisseta con agua destilada
- Copas para muestra
- Muestra

Procedimiento:

1. De la muestra previamente filtrada tomar aproximadamente 40 mL y colocarla en un beaker.
2. Retirar la tapa protectora del pH metro, enjuagar el electrodo con agua destilada, secar con papel Kleenex.
3. Encender el pH metro presionando la tecla ON/OFF, sumergir el electrodo dentro de la muestra filtrada garantizando que el nivel cubra el electrodo y no sobrepase el nivel máximo marcado en el instrumento, espere a que la lectura sea estable.
4. Retirar, lavar el electrodo con agua destilada, secar con papel Kleenex, apague el pH metro y coloque la tapa protectora. Documentar.

Tabla 1: Documentación de resultados.

Mediciones con pH metro	
Tiempo (días)	pH
0	
1	
2	

Anexo 4. Recuento de levaduras por la técnica de microgota utilizando agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC).

El agar DRBC es un medio selectivo para el recuento de levaduras y mohos.

La peptona proporciona la fuente de nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos. La dextrosa es el carbohidrato fermentable que actúa como fuente de carbono y energía. El fosfato de potasio es el tampón. El sulfato de magnesio proporciona azufre y otros oligoelementos. La rosa de bengala es un agente selectivo que inhibe el crecimiento de bacterias y limita el tamaño y la altura de los mohos de crecimiento más rápido, lo que permite el desarrollo y la detección de otras levaduras de crecimiento más lento. Los mohos aparecen de color rosa. El cloranfenicol sirve como agente selectivo, inhibiendo el crecimiento bacteriano.

La técnica de la microgota es una versión a menor escala del procedimiento tradicional de diluciones seriadas utilizadas en el análisis microbiológico, al utilizar esta técnica se reduce tanto el tamaño de muestra como de reactivos necesarios para su análisis.

Materiales:

- Placas con agar DRBC
- Muestra
- Solución salina
- Microtubos (micro vial)
- Micropipetas
- Puntas estériles
- Asa microbiológica
- Cuenta colonias

Preparación de diluciones decimales (10^{-1} – 10^{-4}):

- Dispensar 180 μL de solución salina estéril en cada uno de 4 microtubos.
- Agregar una alícuota de 20 μL de la muestra tomada del fermentador o de la guardada en glicerol, y verter en el microtubo que contiene los 180 μL de diluyente (rotulado dilución 10^{-1}), mezclar manualmente (trabajando en cámara de bioseguridad o flujo laminar, debe hacer fuera de ella pues crea turbulencia que

podría suspender el material microscópico presente).

- Con una punta diferente transferir 20 μL de la dilución 10^{-1} y colocarla en el segundo tubo con diluyente (rotulado dilución 10^{-2}), repetir este paso hasta llegar a la dilución 10^{-4} .

Siembra en placa:

1. Dividir externamente la placa de DRBC en 4 cuadrantes e identificar cada uno así: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} .
2. Dispensar 20 μL de cada dilución en cada cuadrante y estriar con asa microbiológica (ver Figura 1) aplicando las técnicas asépticas, extendiendo el inoculo en toda la superficie del cuadrante correspondiente.

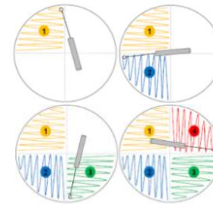


Figura 1: Siembra de diluciones decimales en cuadrantes

3. Incubar a 27°C durante 24-48 horas.
4. Utilizar el cuenta colonias y documentar los resultados, calcular las UFC/mL de muestra.

Tabla 1: Documentación de resultados.

Recuento en agar DRBC					
Tiempo (días)	R1	R2	X	FD	UFC/mL
0					
1					
2					

Anexo 5. Detección de presencia o ausencia de diversidad microbiana presente en el caldo de fermentación en agares GYC, MRS y Chromocult.

Agar GYC: este medio tiene la capacidad de detectar microorganismos productores de ácido, la glucosa es el carbohidrato fermentable que proporcionara carbono y energía, la formación de ácido es capaz de degradar el carbonato de calcio por lo que se da la formación de un halo claro característico de bacterias productoras de ácido en este medio.

Agar MRS: medio que favorece el crecimiento de lactobacilos, el fosfato de sodio regula el pH y junto al acetato inhiben el crecimiento de otros tipos de microorganismos, se debe agregar una cobertera del mismo medio para generar anaerobiosis condición necesaria para el crecimiento de bacterias ácido lácticas.

Agar Chromocult: agar selectivo para la identificación simultanea de Coliformes totales y *Escherichia coli*.

Materiales:

- Placas con agar GYC, MRS, Chromocult
- Muestra
- Solución salina
- Microtubos (micro vial)
- Micropipetas
- Puntas estériles
- Asa microbiológica
- Cuenta colonias

Procedimiento

Preparación de la muestra:

- Dispensar 180 μL de solución salina estéril a un microtubo.
- Agregar una alícuota de 20 μL de la muestra tomada del fermentador o de la guardada en glicerol, y verter en el microtubo que contiene los 180 μL de diluyente (dilución 10^{-1}), mezclar

manualmente (trabajando en cámara de bioseguridad o de flujo laminar, debe hacerse fuera de ella pues crea turbulencia que podría suspender el material microscópico presente).

Siembra en placas:

1. A partir de la dilución 10^{-1} , inocular 20 μL en las placas de agar Chromocult, GYC y MRS.
2. Dispersar el inóculo mediante la técnica de estriado en placa utilizando un asa estéril.



Figura 1: estriado en placa.

3. Cubrir la placa de MRS, con una pequeña capa del mismo medio (cobertera).
4. Incubar a 35°C durante 18-24 horas.
5. Realizar lectura de las placas, registrando las características de las colonias en cada medio de cultivo.

Tabla 1: Documentación de resultados.

Características observadas en los medios			
Tiempo (días)	MRS	GYC	Chromocult
0			
1			
2			

Anexo 6. Determinación de Acidez, por micro titulación.

La acidez total es la medida de la cantidad de ácidos presentes en una sustancia que generalmente son líquidos o alimentos, esto hace referencia a la capacidad total de la muestra para liberar iones hidrogeno en una disolución.

Esta medida se expresa en términos de la cantidad de total de ácidos que pueden cuantificar mediante una valoración con una base fuerte como el hidróxido de sodio, que en presencia de un indicador hará un viraje de color indicando el punto final o de equilibrio de la titulación.



Figura 1: micro titulación.

Materiales:

- Válvula de tres vías
- 2 jeringas de tuberculina
- Agua neutra
- NaOH 0.5N
- Beaker
- Erlenmeyer de 25 mL
- Pinzas de soporte
- Pinzas para tubos
- Soporte universal
- Pipeta de 10 mL
- Puntas estériles amarillas.

Procedimiento:

1. Colocar 1 mL de muestra en un Erlenmeyer de 25 mL.
2. Añadir 8 mL de agua neutra (ya contiene el indicador).
3. Armar el sistema de titulación a microescala tal como se muestra en la figura 2:
 - a) Antes de ensamblar, llenar las dos jeringas con hidróxido de sodio 0.5 N.
 - b) Ensamblar el sistema de titulación como se indica en la figura 2.
 - c) Purgar el espacio de la punta de dispensación.
 - d) Llenar la jeringa vertical desde el inicio de la escala.
4. Titular la muestra con solución de NaOH 0.5N, documentar el volumen gastado.
5. Informar el dato de acidez total como ácido acético por 100m, utilizando la siguiente formula:
$$\text{g de Ácido acético/100ml} = \text{ml NaOH} \times N \times \frac{60 \times 100}{1000 \times \text{mL de muestra}}$$

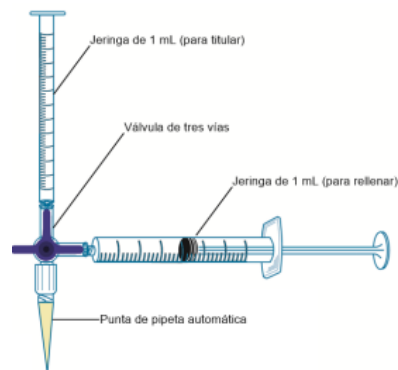


Figura 2: Aparato para titulación a microescala.

Tabla 1: ejemplo de documentación de resultados.

<i>Determinación de acidez por micro titulación</i>		
<i>Tiempo (días)</i>	<i>Volumen de NaOH gastado</i>	<i>g acido/100mL</i>
<i>0</i>		
<i>x</i>		

Anexo 7. Determinación de acidez por espectrometría IR.

El espectrómetro FTIR es un equipo avanzado utilizado para la identificación y análisis de sustancias químicas mediante la absorción de radiación infrarroja. Este equipo se destaca por su capacidad para ofrecer un análisis rápido y preciso de un amplio espectro de materiales.

Cada molécula tiene un patrón único de absorción en el infrarrojo, que se denomina huella digital, estos patrones son conocidos como picos la altura o la intensidad de estos esta relacionada con la cantidad de sustancia absorbente, un pico elevado indica una mayor concentración, las diferentes regiones del infrarrojo corresponden a diferentes tipos de vibraciones y tipos de enlaces, por lo que se observan a longitudes de ondas característicos.

El espectrómetro FTIR se fundamenta en la medida de la interacción de la radiación infrarroja con la muestra, el equipo es capaz de calcular el área bajo la curva y la compara con una curva de calibración previamente hecha.



Figura 1: Espectrómetro FTIR.

Materiales:

- Espectrómetro FTIR
- Piseta con agua destilada
- Papel Kleenex
- Micropipeta
- Puntas estériles
- Muestra

Procedimiento:

1. Con la curva de calibración para el etanol previamente hecha, tomar una alícuota de aproximadamente 40 μL de la muestra (cada una de las muestras será tomada con una punta estéril diferente).
2. Colocar la alícuota de muestra en el prisma del equipo y realizar la medición
3. Lavar con agua destilada y secar con papel Kleenex.
4. Repetir el paso 1 y 2 para cada una de las muestras.
5. Documentar.
6. Dejar limpio el equipo.

Tabla 1: Ejemplo de tabla para documentación de resultados.

Determinación de etanol con FTIR	
Tiempo (días)	Etanol (%V/V)
0	
1	
x	

ANEXO N°2
TABLAS

TABLAS

Tabla N°4: Resultados obtenidos del recuento en placa en agar DRBC

Biomasa (Log10 UFC/mL)											
Equipo Tiempo (días)	pre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	5.3	4.97	0.81	5.18	4.51	6.1	4.33	5.37	4.16	5.35	4.69
1	6	5.79	1.75	6.15	5.59	5.74	5.82	6.29	4.15	5.43	7.48
2	6.7	6.13	0.18	6.61	6.56	6.49	5.85	7.44	5.56	6.29	7.49
3	5.51	6.16	DNPC	6.55	6.6	6.39	5.85	7.48	5.34	6.24	6.57
5	5.78	6.6	DNPC	5.8	6.19	6.36	5.48	7.32	6.44	5.51	5.72

Tabla N°5: Mediciones de densidad durante el desarrollo de la fermentación

	Densidad g/mL										
Equipo Tiempo (días)	pre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	1.054	1.054	1.06	1.05	1.06	1.057	1.054	1.058	1.054	1.056	1.064
1	1.052	1.052	1.056	1.052	1.05	1.054	1.052	1.048	1.052	1.054	1.06
2	1.05	1.048	1.05	1.042	1.045	1.051	1.046	1.042	1.05	1.048	1.058
3	1.044	1.044	1.046	1.036	1.04	1.046	1.042	1.042	1.044	1.038	1.056
5	1.032	1.014	1.03	1.028	1.03	1.022	1.032	1.022	1.03	1.024	1.046
7	1.024	1	1.026	1.022	1.022	1.014	1.02	1.02	1.018	1.01	1.038
14	1.02	0.998	1.025	1.014	1.012	1.004	1.002	1	1.006	1.006	1.037
28	1.004	0.994	1.01	1	1.009	0.996	1.001	1	1.006	1	1.014

Tabla N°6: Mediciones de grados brix durante el desarrollo de la fermentación.

° Brix con Densímetro (g de sacarosa/100g de solución)												° Brix con Brixometro (g de sacarosa/100g de solución)											
Equipo Tiempo (días)	pre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	pre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0	14	14	14.7	12.5	15	14	13	14	13	14	15.5	14.02	13. ₂	14.8	12	13.8	13.6	14	13.8	13.6	13.8	15.2	
1	13	12.5	14	13	12	13	12.5	12	12.5	13	14.5	13.96	13	14.1	12.6	13	13.4	13.8	13	13.4	13	15.6	
2	12.5	11	12.3	10.5	12	12.5	12	11	12	11.5	14	13.24	13	13.2	11.6	11.8	13.2	13	11.4	13	12.8	12.8	
3	11.2	10	11.5	9.09	10	11.5	10.5	11	11	9.5	12	12.64	12. ₄	12.8	10.8	11.2	12	11.8	11.2	14.8	11.4	14.6	
5	9	3	7.5	7	8	6	8	5.5	7.5	6	11.5	10.66	7.2	10	9.4	10	9	9.6	9	9.6	9	12.4	
7	6	1	6.5	6	6	3.5	5	5.2	4.5	2.5	9.5	8.82	4	9.8	8.4	8.4	7.2	8	8	7.6	7	11.8	
14	5	-1	6.3	3.5	3	1.2	0	1	1.5	1.5	9.5	5.92	4	8	7	7.4	5.6	5.8	5	6.2	5.8	7.6	
28	1	-2.5	2.5	0	2	-1.8	0	0	1.5	0	1	5.78	0	5.8	4.5	6	4.6	5.6	4.2	5.8	5.6	6.9	

Tabla N°7: Mediciones de etanol con diferentes instrumentos durante el desarrollo de la fermentación

Equipo Tiempo (días)	Densímetro (%V/V)										Vinómetro (%V/V)										IR (%V/V)												
	pre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	pre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	pre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.8	2.5	$\frac{1}{3}$	5	1	3	2	3.5	1.5	1	0.5	0.3	1.8	2.1	0.2	0.3	0.1	0.2	2.8	0.2	0	0.4
1	0.5	0.5	0.3	0.3	1	0.5	0.2	1	0	0.2	0.4	2.2	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.4	1.9	2.2	0.4	0.4	0.2	0.2	3.5	0.2	—	0.5
2	1.3	1	1.3	1	1	1	1	1.7	0.5	1.2	0.8	4	1.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.7	2	2.7	1.2	1.5	0.4	0.8	4.7	0.5	—	—
3	1.7	1.5	1.8	1.7	3	1.5	1.5	1.7	1.2	2.2	1.9	2.5	1.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.1	2.6	3.4	1.9	2.5	1.1	0.9	5.5	5	0.2	1.3
5	3.2	6	3.9	2.7	4	4.4	3	4.3	3	4.2	2.3	8	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	3.1	6.6	4.7	3	4	4	2.5	8.2	2.8	2.4	2.3
7	4.5	6.5	4.5	3.5	5	5.6	4.5	5.1	4.7	6.2	3.3	7.5	4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	4.7	8.5	5.1	4	5.4	5.6	4.1	11	4.2	3.8	3.5
14	5	7	4.5	4.7	6	6.9	6.5	7.2	6.5	6.2	3.3	10	7	—	$\frac{1}{4}$	7	7.5	6	11	13	7	5.6	7.3	8.6	5.2	5.3	6.9	7.3	6.3	11	5.7	5	7.2
28	7	9.5	6.5	6.5	6.5	8.3	7	7.2	6.5	7.2	7.8	9	9.5	—	$\frac{1}{2}$	6	9	9	8.5	14	8	9.8	7.4	7.7	5.1	6.9	5.6	7.6	6	10	5.6	4.6	7.1

Tabla N°8: Mediciones de pH con diferentes instrumentos durante el desarrollo de la fermentación

	pH papel											pHmetro										
Equipo Tiempo (días)	pre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	pre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.5	5.66	5.5	5.5	5	5.5	4.29	5.13	4.93	4.99	5.77	4.7	5.49	5.66	5.6	4.53	4.61
1	5	4.5	5	4.5	5	4.5	4	4.5	5	5	4.5	4.14	4.01	4.08	4.31	4.13	3.97	4.26	4	4.41	4.25	4.2
2	4	4.5	4.5	4.25	4.5	4	3.8	4.5	4	4.5	4.5	3.67	3.66	3.46	3.93	3.76	3.77	3.59	3.8	3.56	3.74	
3	4	3.5	4	4	4	4	3.94	4.5	4	4	4	3.63	3.56	3.4	3.69	3.64	3.8	3.35	3.94	3.7	3.59	3.39
5	3.5	3.5	4	3.5	3.5	4	3.57	4.5	3.5	3.5	3.5	3.51	3.53	3.58	3.48	3.49	3.71	3.25	3.57	3.71	3.39	3.4
7	3	3.5	3.5	3.5	3	3.5	3.29	3.5	3.5	3	2.5	3.5	3.46	3.51	3.44	3.36	3.47	3.16	3.29	3.72	3.29	3.37
14	3	3.5	3.5	3	2.5	3.5	3.03	2.5	2.5	3	2.5	3.41	3.38	4.18	3.17	3.23	3.37	2.82	3.03	3.19	3.16	3.24
28	3	4.1	3	3	2.5	3	3.19	2.5	2.5	3	2	3.38	4.1	5.28	3.08	3.16	3.34	2.8	3.19	3.09	3.37	3.2

Tabla N°9: Mediciones de acidez por micro titulación en los tiempos cero, catorce y veintiocho días.

Acidez (g de ácido/100mL de solución)											
Equipo Tiempo (días)	pre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	0.06	0.54	0.71	0.17	0.17	0.06	0.28	0.11	0.06	0.23	0.17
14	0.71		8.05	4.38	4.54	4.33	3.14	4.29	4.29	4.38	4.69
28	0.78	1.12	10.4	4.74	5.65	3.16	2.7	4.05	4.17	3.84	4.05

No se reporta dato de acidez en el tiempo 14 días del equipo 1 debido a perdida de muestra correspondiente a ese tiempo.

ANEXO N°3
INSTRUCCIONES TÉCNICAS

**Instrucciones técnicas para
el monitoreo microbiológico.**

Código: IT-MICRO-00

DONDE: IT: Instrucción técnica

MICRO: microbiológica

00: correlativo de la instrucción técnica.

Recuento de levaduras por la técnica de microgota utilizando agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC).

El agar DRBC es un medio selectivo para el recuento de levaduras y mohos.

La peptona proporciona la fuente de nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos. La dextrosa es el carbohidrato fermentable que actúa como fuente de carbono y energía. El fosfato de potasio es el tampón. El sulfato de magnesio proporciona azufre y otros oligoelementos. La rosa de bengala es un agente selectivo que inhibe el crecimiento de bacterias y limita el tamaño y la altura de los mohos de crecimiento más rápido, lo que permite el desarrollo y la detección de otras levaduras de crecimiento más lento. Los mohos aparecen de color rosa. El cloranfenicol sirve como agente selectivo, inhibiendo el crecimiento bacteriano.

La técnica de la microgota es una versión a menor escala del procedimiento tradicional de diluciones seriadas utilizadas en el análisis microbiológico, al utilizar esta técnica se reduce tanto el tamaño de muestra como de reactivos necesarios para su análisis.

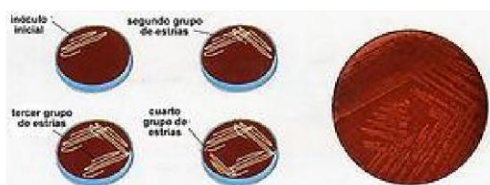


Figura 1: estriado en placa.

Materiales:

- Placas con agar DRBC
- Solución salina estéril
- Muestra
- Micropipetas
- Puntas estériles
- Asa microbiológica
- Vortex
- Cuenta colonias

Preparación de la muestra:

- Dispensar 180 microlitros de solución salina estéril a 4 microtubos.
- Del tubo que contiene la muestra con glicerol agregar una alícuota de 20 microlitros al primero tubo que contiene los 180 microlitros de diluyente (dilución 10^{-1}), mezclar utilizando el vortex.
- Con una punta diferente tomar 20 microlitros de la dilución 10^{-1} y colocarla en el segundo tubo con diluyente (dilución 10^{-2}), repetir este paso hasta llegar a la dilución 10^{-4} .

Procedimiento:

1. Dividir la placa en cuatro cuadrantes del mismo tamaño utilizando un plumón o marcador, rotular adecuadamente en el borde de la placa el equipo de trabajo, tiempo de muestreo y dilución.
2. Cada dilución se sembrará por duplicado por lo que cada placa contendrá 2 diluciones.
3. Dispensar 20 microlitros de la dilución indicada en cada cuadrante y estriar con asa microbiológica (ver Figura 1) aplicando las técnicas asépticas.
4. Incubar a 27°C durante 24-48 horas.
5. Utilizar el cuenta colonias y documentar los resultados, calcular las UFC/mL de muestra.

Tabla 1: Documentación de resultados.

Recuento en agar DRBC					
Tiempo (días)	R1	R2	X	FD	UFC/mL
0					
1					
2					

Detección de presencia o ausencia de diversidad microbiana presente en el caldo de fermentación en agares GYC, MRS y Chromocult.

Agar GYC: este medio tiene la capacidad de detectar microorganismos productores de ácido, la glucosa es el carbohidrato fermentable que proporcionara carbono y energía, la formación de ácido es capaz de degradar el carbonato de calcio por lo que se da la formación de un halo claro característico de bacterias productoras de ácido en este medio.

Agar MRS: medio que favorece el crecimiento de lactobacilos, el fosfato de sodio regula el pH y junto al acetato inhiben el crecimiento de otros tipos de microorganismos, se debe agregar una cobertera del mismo medio para generar anaerobiosis condición necesaria para el crecimiento de bacterias ácido lácticas.

Agar Chromocult: agar selectivo para la identificación simultanea de Coliformes totales y *Escherichia coli*.

Materiales:

- Placas con agar GYC, MRS, Chromocult
- Muestra
- Micropipetas
- Puntas estériles
- Asa microbiológica
- Espátula de Drigalsky.
- Vortex
- Cuenta colonias



Figura 1: Método de extendido en placa con espátula de Drigalsky.

Preparación de la muestra:

- Dispensar 180 microlitros de solución salina estéril a un microtubo.
- Agregar una alícuota de 20 microlitros (de la muestra guardada en glicerol) al tubo que contiene los 180 microlitros de diluyente (dilución 10^{-1}), mezclar utilizando el vortex.

Procedimiento:

1. A partir de la dilución 10^{-1} , inocular 20 microlitros en las placas de agar Chromocult, GYC y MRS.
2. En el caso del agar GYC dispersar el inóculo mediante la técnica estriado en placa en 4 cuadrantes, y en los agares Chromocult y GYC, dispersar el inóculo mediante la técnica de extendido en placa utilizando la espátula de Drigalsky (Figura 1).
3. Cubrir la placa de MRS, con una pequeña capa del mismo medio (cobertera).
4. Incubar a 35°C durante 18-24 horas.
5. Realizar lectura de las placas, registrando las características de las colonias en cada medio de cultivo.

Tabla 1: Documentación de resultados.

Características observadas en los medios			
Tiempo (días)	MRS	GYC	Chromocult
0			
1			
2			

Extracción de ADN, utilizando TRIzol™

TRIzol™ es un reactivo listo para usar, que ha sido diseñado para aislar ARN, ADN y proteínas de alta calidad de muestras de células y tejidos de origen humano, animal, vegetal, de levaduras o bacteriano, en poco tiempo. Es una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina y otros componentes que facilitan el aislamiento de una variedad de especies de ARN, ADN y proteínas de diversos tamaños moleculares. Permite realizar la precipitación secuencial de ARN, ADN y proteínas, luego de homogenizar la muestra con el reactivo, se añade cloroformo y se deja que el homogenizado se separe en una capa acuosa superior que contiene el ARN, una interfase y una capa orgánica inferior roja que contiene en ella el ADN y proteínas. El ADN se precipita de la capa orgánica con etanol. Luego de su precipitación se lava para eliminar impurezas, finalmente se suspenden para su uso.

Material:

- Reactivo TRIzol™
- Cloroformo
- Etanol al 100%
- Citrato de sodio 0.1M
- Etanol 10%
- Etanol 75%
- NaOH 8 M
- HEPES
- Pipeta
- Pipeteador
- Micropipeta
- Tubos para centrifuga
- Centrifuga
- Incubadora

Procedimiento:

Lisar la muestra y separar las fases:

Nota: Realizar todos los pasos a temperatura ambiente (20-25°C) a menos que se indique otra cosa.

- a) Tomar aprox 100 mg de colonia aislada de interés del cultivo en agar y colocarlo en un tubo de microcentrífuga.
- b) Agregar 1 mL de reactivo TRIzol™ al tubo conteniendo las células.
- c) Pipetear el lisado hacia arriba y hacia abajo varias veces para homogenizar.
- d) Colocar en baño maría a 60°C durante 15 min para permitir la disociación completa del complejo de nucleoproteínas, mezclar ocasionalmente (cada 5 min).
- e) Agregar 0.2 mL de cloroformo, tapar bien el tubo.
- f) Incubar durante 2-3 minutos.
- g) Centrifugar la muestra durante 15 min a 12,000 x g a 4°C, la mezcla se separará en una interfase inferior de fenol-cloroformo de color rojo y una fase superior acuosa incolora.
- h) Desechar la fase acuosa que contiene el ARN.

Precipitación del ADN:

- a) Retirar cualquier resto de fase acuosa que recubre la interfase, es esencial para asegurar la calidad del ADN aislado.
- b) Agregar 0.3 mL de etanol al 100%.
- c) Tapar el tubo y mezclar invirtiéndolo varias veces con suavidad.
- d) Incubar durante 2 a 3 min.
- e) Centrifugue durante 5 min a 2000 a 4°C para sedimentar el ADN.
- f) Transferir el sobrenadante de fenol-etanol a un tubo nuevo. (este contiene las proteínas).

Lavado del ADN:

- Resuspender el precipitado en 1 mL de citrato de sodio 0.1 M en etanol al 10% pH 8.5.
- Incubar durante 30 min, mezclando ocasionalmente mediante inversión suave del tubo.
- Centrifugar durante 5 min a $2000 \times g$ a 4°C .
- Desechar el sobrenadante con una micropipeta.
- Repetir los pasos del literal a) al d) del proceso de lavado de ADN, una vez y dos veces si son precipitados grandes.
- Resuspender el precipitado en 1.5 mL de etanol al 75%.
- Incubar durante 10 a 20 min, mezclando ocasionalmente mediante inversión suave.
- Centrifugar durante 5 min a $2000 \times g$ a 4°C .
Nota: El ADN se puede almacenar en etanol al 75% por varios meses a 4°C .
- Desechar el sobrenadante con una micropipeta.
- Aspirar o secar al aire el precipitado de ADN durante 5 a 10 min. (nunca debe secarse con centrifugadora al vacío).

Solubilización del ADN:

- Resuspender el precipitado en 0.4 mL de NaOH 8 mM moviéndolo hacia arriba y hacia abajo.
Nota: Se recomienda resuspender el ADN en una base suave porque el ADN aislado no se resuspende bien en agua o buffer Tris.
- Centrifugar durante 10 min a $12,000 \times g$ a 4°C para eliminar los materiales insolubles.
- Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y ajustar el pH según sea necesario con HEPES.
- Proceder a realizar aplicaciones posteriores o almacene el ADN a 4°C durante la noche.
- Si se desea almacenar nuevamente el ADN, precipitar con 1.2 mL de etanol al 75% y conservar en freezer.

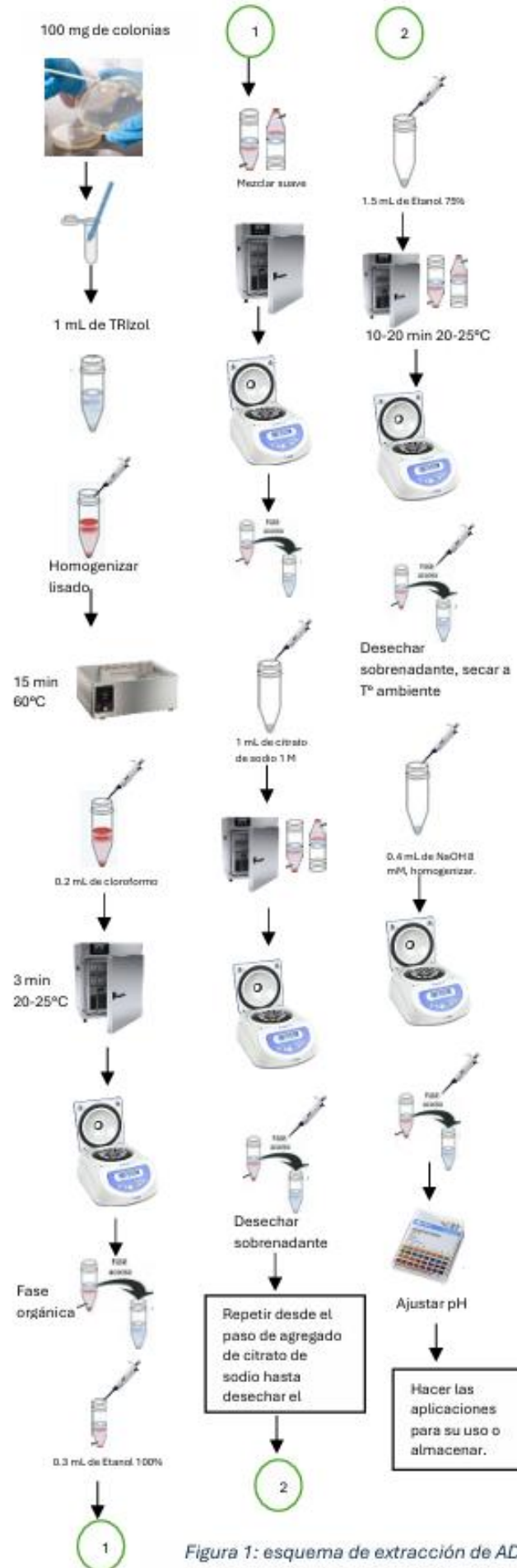


Figura 1: esquema de extracción de ADN.

Reanimación de levaduras a partir de crio viales.

Materiales:

- Placas con agar DRBC
- Placas con agar PDA
- Caldo PDA.
- Muestra
- Micropipetas
- Puntas estériles
- Asa microbiológica
- Vortex
- Porta objetos
- Cubre objetos
- Reactivos para tinción de gram.

Preparación de la muestra:

- Dispensar 160 microlitros de caldo Saboraud dextrosa a 1 tubo.
- agitar en vortex el tubo que contiene la muestra con glicerol, tomar una alícuota de 40 microlitros y agregarla al tubo que contiene los 160 microlitros de diluyente (dilución 10^{-1}), mezclar utilizando el vortex.

Procedimiento:

1. Rotular adecuadamente en el borde de la placa de agar DRBC, el equipo de trabajo, tiempo de muestreo y dilución.
2. Dispensar 20 microlitros de la muestra pura y estriar con asa microbiológica (ver Figura 1) aplicando las técnicas asépticas. Realizar el mismo paso con la dilución 10^{-1} .
3. Incubar a 27°C durante 24-48 horas.
4. Observar morfología macroscópica, de la placa que se observe más homogénea y con morfología predominante realizar tinción de Gram.
5. Si la morfología microscopia es una sola (no se observan mezclas de

microorganismos) sembrar en agar PDA por la técnica de estriado en placa.

6. Tomar una colonia con el asa microbiológica y una placa con agar PDA, para realizar la prueba de hifas.
7. Incubar a $25-30^{\circ}\text{C}$ durante 48-72 horas.
8. Realizar API 20 CAUX.

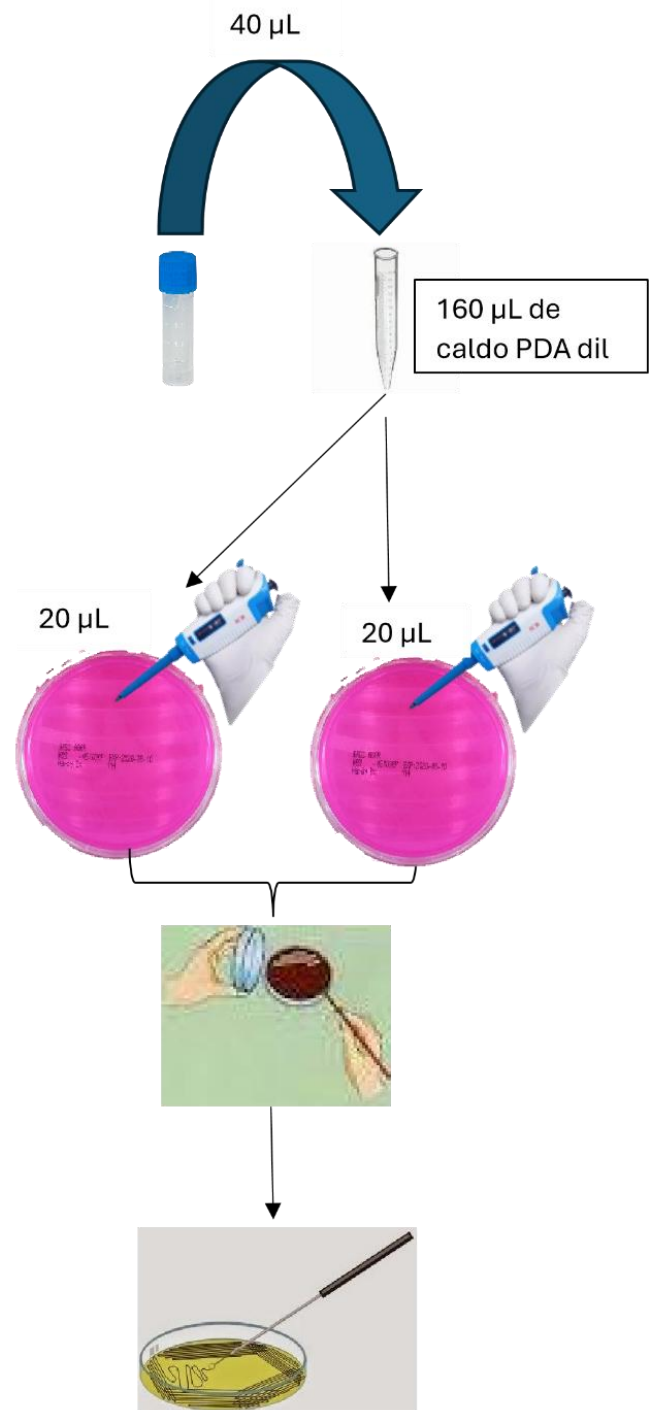


Figura 1: Esquema de trabajo para reanimación de levaduras.

Preparación e inoculación del gel de electroforesis.

Un gel de electroforesis es una matriz semisólida, similar a la gelatina, utilizada en el laboratorio para separar macromoléculas biológicas (como fragmentos de ADN, ARN o proteínas) basándose en su tamaño y carga eléctrica.

El gel actúa como un tamiz molecular: cuando se aplica una corriente eléctrica, las moléculas cargadas migran a través de los poros del gel. Las moléculas más pequeñas y ligeras se mueven más rápido y llegan más lejos, mientras que las más grandes avanzan más lentamente y se quedan más cerca del punto de partida.

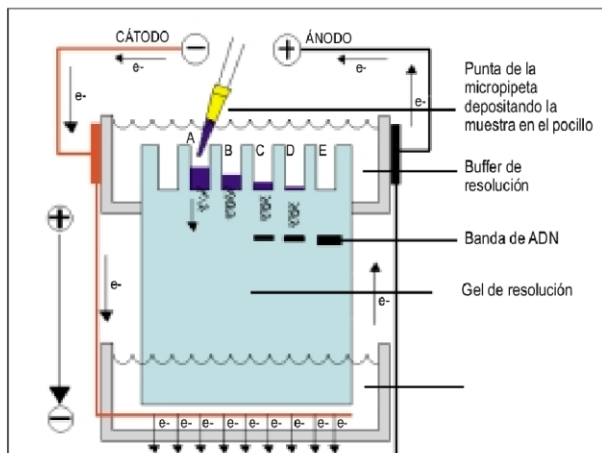


Figura 1: Cámara de electroforesis

Materiales:

- Cámara de electroforesis
- Agarosa
- Micropipeta de 2.5 microlitros
- Micropipeta de 1-20 microlitros
- Horno microonda o hot plate
- Puntas de micropipeta
- Matraces
- Amortiguador TAE 1X
- Vortex
- Centrifuga

Procedimiento:

1. En un matraz de 250mL disolver un gramo de agarosa en 100mL de amortiguador TAE 1X, llevar a ebullición en horno microondas o hot plate.
2. Esperar que la temperatura descienda a 40-50°C
3. Transferir 50mL de la mezcla a un matraz de 100mL y agregar 2µL de GelRed (mezclar por agitación)
4. Agregar 50mL de la mezcla en un portagel de la cámara. Colocar el peine para que se formen los pozos y esperar su solidificación.
5. Seleccionar las mejores muestras de ADN, previamente aislado y cuantificado.
6. Preparar el marcador de peso añadiendo en un tubo de microcentrifuga: 1 µL de marcador de peso, 1.5 µL de tampón de carga, 12.5 microlitros de agua, mezclar.
7. Preparar la muestra añadiendo en un tubo de microcentrifuga: 10 µL de muestra, 1.5 µL de tampón de carga, 3.5 microlitros de agua, mezclar.
8. Sumergir el gel en la cámara de electroforesis y agregar el amortiguador TAE 1X hasta cubrir completamente el gel, colocando los pozos del gel orientados hacia el polo negativo.
9. En el pozo 1 del gel aplicar el marcador de peso molecular mezclado preparado previamente.
10. En el resto de los pozos agregar las muestras.
11. Tapar la cámara y conectar los cables de los electrodos a la fuente de poder y encenderla.
12. Realizar la electroforesis a 90 miliamperios durante 30 minutos aproximadamente. El frente (coloreado de azul) no se debe salir del gel.
13. Terminada la electroforesis apagar la fuente de poder, desconectar los cables de los electrodos y retirar el portagel de la cámara.

14. Determinar la posición de las bandas, observando el gel en una cámara con luz UV.

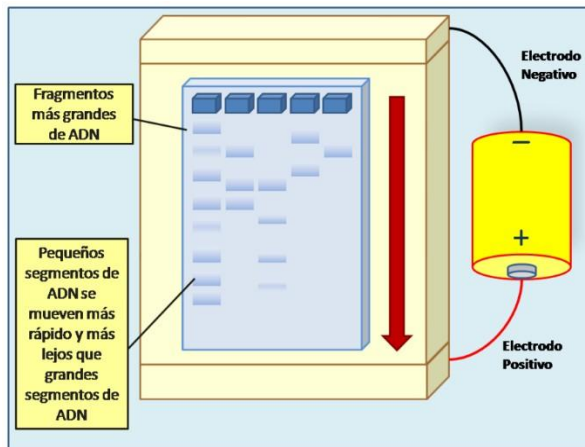


Figura 2: Gel de electroforesis

**Instrucciones técnicas para
el monitoreo fisicoquímico.**

Código: IT-CFQ-00

DONDE: IT: Instrucción técnica

CFQ: f fisicoquímico.

00: correlativo de la instrucción técnica.

Determinación de la densidad, azúcares totales y potencial de alcohol de la fermentación, utilizando un densímetro.

El densímetro es un instrumento de medición que se utiliza para determinar la densidad relativa de los líquidos, sin calcular su masa y volumen previo a su utilización. Este tiene la capacidad de flotar en las muestras líquidas y proporcionar en una de sus escalas una lectura de la densidad relativa o gravedad específica en unidades de g/mL.

Este instrumento posee tres escalas: densidad grados brix y potencial de alcohol.

El densímetro da una medición de potencial de alcohol, pero es necesario reportar los datos como porcentaje de alcohol, por lo que debe calcularse aplicando la fórmula:

Porcentaje de alcohol = potencial de alcohol inicial - potencial del tiempo específico a calcular.

Ejemplo:

Potencial de alcohol inicial: 11%

Potencial de alcohol final: 1%

Porcentaje de alcohol = $(11 - 1) = 10\%$ (mL de alcohol / 100 mL de solución).

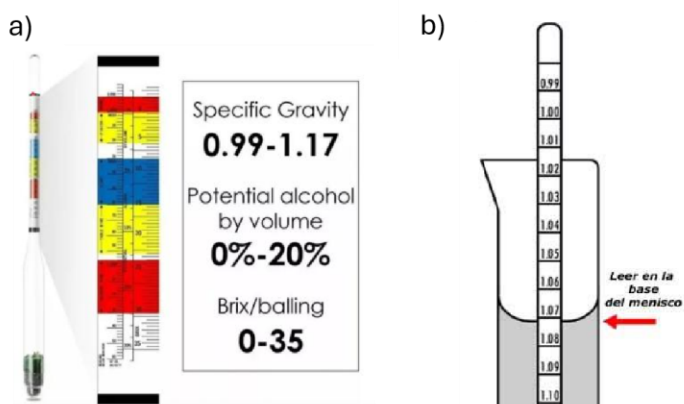


Figura 1: a) Escalas de un densímetro. b) Lectura adecuada del densímetro.

Materiales:

- Densímetro
- Probeta de 250 mL
- Taza medidora
- Cucharon
- Colador
- Papel toalla
- Piseta con agua
- Muestra

Procedimiento:

1. Homogenizar el caldo de fermentación, utilizando un cucharón extraer un volumen de aproximadamente 200 mL.
2. Filtrar, haciéndolo pasar por el colador, recibir este filtrado en la tasa medidora.
3. Agregar aproximadamente 200 mL del filtrado a la probeta de 250 mL, introducir el densímetro dejarlo en un lugar que flote libremente, teniendo el cuidado de no dejarlo caer porque golpeará en el fondo de la probeta y puede romperse, si hay presencia de burbujas girarlo para quitar cualquier burbuja pegada.
4. Leer a través del líquido justo por debajo del nivel, ubicar la medición en una de las tres escalas, retirarlo de la probeta, realizar lectura en las 3 escalas del densímetro y documentar.
5. Lavar con abundante agua y secar con papel toalla.

Tabla 1: Documentación de resultados.

Mediciones con densímetro			
Tiempo (días)	Densidad	Potencial de alcohol	°brix
0			
1			
2			

Determinación de azúcares totales presentes en el caldo de fermentación, utilizando Brixómetro.

La cantidad de azúcar disuelta en el caldo fermentativo condiciona directamente tanto la cantidad de biomasa que se formara a partir de este sustrato como la cantidad de etanol (producido por las levaduras que consumen los azúcares disponibles). El brixómetro por medio del índice de refracción de la luz permite estimar el contenido de azúcares.

La refracción es el cambio en la dirección de la luz cuando pasa de un medio a otro, el comportamiento de esta cambia a medida que aumenta la concentración de solutos (sustancias disueltas en la mezcla). El brixómetro utiliza este principio para determinar la concentración de azúcares disueltas en una solución, en una fermentación alcohólica principalmente es sacarosa.

El brixómetro proporciona una lectura de gramos de sacarosa por 100 mililitros de solución, por lo que se puede expresar la siguiente relación: $1^{\circ}\text{brix} = 1 \text{ g de sacarosa}/100 \text{ g de solución}$.

Materiales:

- Brixómetro
- Piseta con agua destilada
- Papel Kleenex
- Pipeta Pasteur
- Muestra

Procedimiento:

1. Con ayuda de la piseta, colocar una gota de agua destilada en el prisma del brixómetro, cerrar el cubreobjetos suavemente y observar por el ocular que este ajustado en cero. Si la lectura no estuviera en la marca del cero, ajustarlo.
2. Limpiar cuidadosamente el lente con papel Kleenex.
3. Utilizando una pipeta Pasteur colocar 1 o 2 gotas de la muestra en el prisma, cerrar el cubreobjetos y realizar la medición, documentar.
4. Lavar con abundante agua y secar con papel Kleenex.

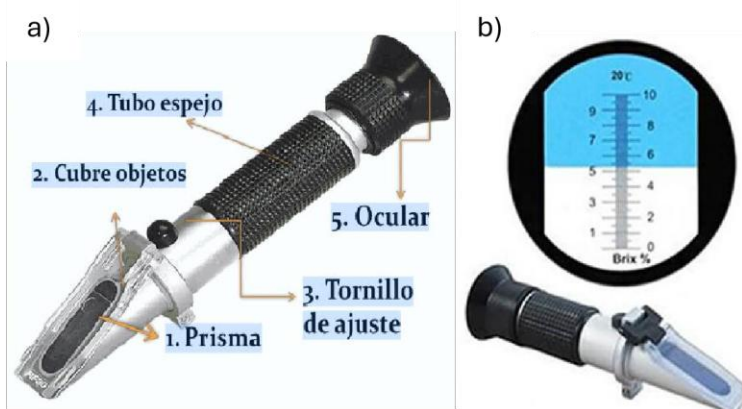


Tabla 1: Documentación de resultados.

Determinación de °brix	
Tiempo (días)	°brix
0	
1	
2	

Figura 1: a) Partes de un brixómetro. b) brixómetro y su escala.

Determinación de pH, utilizando un pH metro portátil.

El pH metro es un instrumento electroanalítico que mide la actividad del ion hidrogeno en soluciones acuosas, indicando su grado de acidez o alcalinidad expresada como pH.

Es necesario colocar la tapa después de su uso para que el electrodo no se seque por la exposición prolongada al aire y de como resultado mediciones inestables o lentas, si esto ocurre debe sumergir el electrodo en agua destilada durante algunas horas.

Calibración de pH metro:

1. Encender el pH metro.
2. Preparar las soluciones tampón (4.00, 6.86) en 250 mL de agua destilada, tomar aproximadamente 50 mL en un vaso de precipitado (guardar los 200 mL restantes) y sumergir el electrodo en la solución de pH 6.86 a 25°C, presione el botón CAL durante 5 segundos y suéltelo, la pantalla parpadeara 6.86 esperar hasta que la pantalla deje de parpadear, lavar con agua destilada y secar.
3. Sumergir el electrodo en la solución de pH 4.00 a 25°C, presione el botón CAL durante 5 segundos y suéltelo, presione y suelte nuevamente, la pantalla parpadeara 4.00 esperar hasta que la pantalla deje de parpadear, lavar con agua destilada y secar.
4. Colocar el electrodo nuevamente en la solución tampón, si la medición es incorrecta, repita la calibración
5. Si sabe que el pH aproximado de la solución de prueba es superior a 7,0, calibrar el medidor utilizando una solución de 6,86 y 9,18.

Materiales:

- pH metro
- Papel Kleenex
- Pisseta con agua destilada
- Copas para muestra
- Muestra

Procedimiento:

1. De la muestra previamente filtrada tomar aproximadamente 40 mL y colocarla en una copa dosificadora.
2. Retirar la tapa protectora del pH metro, enjuagar el electrodo con agua destilada, secar con papel Kleenex.
3. Encender el pH metro presionando la tecla ON/OFF, sumergir el electrodo dentro de la solución que contiene la copa dosificadora (no sobrepasar la línea de inmersión), espere a que la lectura sea estable, documentar.
4. Retirar, lavar el electrodo con agua destilada, secar con papel Kleenex, apague el pH metro y coloque la tapa protectora.

Tabla 1: Documentación de resultados.

Mediciones con pH metro	
Tiempo (días)	pH
0	
1	
2	



Figura 1: escala de pH y partes de un pH metro.

Determinación de Etanol, utilizando un vinometro o alcoholímetro .

El vinometro es un instrumento que permite determinar la concentración de etanol en vinos en base a su viscosidad dependiendo de la relación entre el alcohol y el agua, tiene un rango de medición adaptado (escala) de 0 a 25%, calibrado a 20°C, el resultado esta expresado en la unidad %V/V de etanol.



Figura 1: Vinometro, escala.

Materiales:

- Vinometro
- Papel toalla
- Piseta con agua destilada
- Muestra filtrada en centrifuga

Procedimiento:

1. Verificar que el instrumento no tenga burbujas de aire en su interior ya que estas interfieren con su medición, si las hubiera lavar con una piseta de agua destilada, dar pequeños golpes sobre una superficie plana colocar papel toalla antes de hacerlo, teniendo el cuidado de no quebrar el vinometro.
2. De la muestra previamente centrifugada, en una centrifuga a 4500 RPM durante 3 minutos tomar aproximadamente 1 mL, hacerlo pasar por un filtro de jeringa de

0.45 μm (ambientarlo haciendo pasar 1 mL) recibir el filtrado directamente en la boquilla del vinometro .

3. Esperar a que una parte de la muestra allá pasado a través del instrumento (observar que caen gotas constantemente) si no se observan gotas saliendo constantemente por la obstrucción de alguna burbuja realizar el mismo proceso que el numeral 1, es importante tener en cuenta que si se deja la copa sin liquido mientras se realiza este procedimiento y la medición el vinometro se llenará de aire.
4. Invertir el vinometro y realizar la lectura en el primer punto de la escala donde se detenga el líquido, documentar la medición.
5. Lavar con abundante agua y secar con papel toalla.

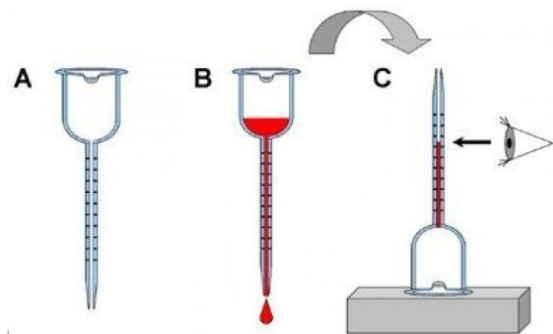


Figura 2: Modo de uso del vinometro.

Tabla 1: Documentación de resultados.

Mediciones con vinometro	
Tiempo (días)	Etanol
0	
1	
2	

Determinación de acidez por espectrometría IR.

El espectrómetro FTIR es un equipo avanzado utilizado para la identificación y análisis de sustancias químicas mediante la absorción de radiación infrarroja. Este equipo se destaca por su capacidad para ofrecer un análisis rápido y preciso de un amplio espectro de materiales.

Cada molécula tiene un patrón único de absorción en el infrarrojo, que se denomina huella digital, estos patrones son conocidos como picos la altura o la intensidad de estos esta relacionada con la cantidad de sustancia absorbente, un pico elevado indica una mayor concentración, las diferentes regiones del infrarrojo corresponden a diferentes tipos de vibraciones y tipos de enlaces, por lo que se observan a longitudes de ondas característicos.

El espectrómetro FTIR se fundamenta en la medida de la interacción de la radiación infrarroja con la muestra, el equipo es capaz de calcular el área bajo la curva y la compara con una curva de calibración previamente hecha.



Figura 1: Espectrómetro FTIR.

Materiales:

- Espectrómetro FTIR
- Piseta con agua destilada
- Papel Kleenex
- Micropipeta
- Puntas estériles
- Muestra

Procedimiento:

1. Con la curva de calibración para el etanol previamente hecha, tomar una alícuota de aproximadamente 40 μL de la muestra (cada una de las muestras será tomada con una punta estéril diferente).
2. Colocar la alícuota de muestra en el prisma del equipo y realizar la medición
3. Lavar con agua destilada y secar con papel Kleenex.
4. Repetir el paso 1 y 2 para cada una de las muestras.
5. Documentar.
6. Dejar limpio el equipo.

Tabla 1: Ejemplo de tabla para documentación de resultados.

Determinación de etanol con FTIR	
Tiempo (días)	Etanol (%V/V)
0	
1	
x	

Proceso para centrifugar la muestra.

La centrifuga es un equipo que pone en rotación a una muestra para separar por fuerza centrifuga sus componentes o fases que generalmente son una fase sólida y una líquida esta separación se da en función de su densidad.

Es ampliamente utilizada en los laboratorios de control de calidad, de la industria que elabora jugos a base de cítricos para tener un mejor control de la cantidad de pulpa que estos contienen separando la pulpa del jugo por medio de este procedimiento.



Figura 1: Centrifuga de laboratorio.

Materiales:

- Centrifuga
- Tubos para centrifuga
- Gradilla para tubos
- Balanza
- Muestra

Procedimiento:

1. Pesar aproximadamente 20 gramos de las diferentes muestras en cada tubo de centrifuga (los tubos deben pesar exactamente lo mismo y además ser de la misma forma , de lo contrario se generan problemas al momento de centrifugar).

2. Conectar y encender la centrifuga, configurar a 4500 RPM durante 3 min (en el panel de control aparecerá solo el número 450, eso indica que esta configurada correctamente en 4500).
3. Presionar el botón "Lid open", retirar la tapa de seguridad y los adaptadores de tubos de los espacios donde se vaya a colocar tubos para centrifugar, colocar los tubos de forma que queden equilibrados como se puede observar en la figura 2, colocar nuevamente la tapa de seguridad , cerrar la tapadera de la centrifuga, presionar el botón "Start".
4. Esperar a que se complete el ciclo del centrifugado, presionar el botón "Lid Open", retirar la tapa de seguridad y los tubos centrifugados, con el cuidado de no mezclarlos nuevamente.
5. Colocar los adaptadores de los sitios de donde se retiraron, colocar la tapa de seguridad y cerrar la tapadera de la centrifuga, apagar y desconectarla.
6. Proceder a utilizar la muestra filtrada.



Figura 2: Referencia de como colocar los tubos de forma equilibrada.

Determinación de Acidez, por micro titulación .

La acidez total es la medida de la cantidad de ácidos presentes en una sustancia que generalmente son líquidos o alimentos, esto hace referencia a la capacidad total de la muestra para liberar iones hidrogeno en una disolución.

Esta medida se expresa en términos de la cantidad de total de ácidos que pueden cuantificar mediante una valoración con una base fuerte como el hidróxido de sodio, que en presencia de un indicador hará un viraje de color indicando el punto final o de equilibrio de la titulación.



Figura 1: micro titulación .

Materiales:

- Válvula de tres vías
- 2 jeringas de tuberculina
- Agua neutra
- NaOH 0.5N
- Beaker
- Erlenmeyer de 25 mL
- Pinzas de soporte
- Pinzas para tubos
- Soporte universal
- Pipeta de 10 mL
- Puntas estériles amarillas.

Procedimiento:

1. Colocar 1 mL de muestra en un Erlenmeyer de 25 mL .
2. Añadir 8 mL de agua neutra (ya contiene el indicador).
3. Armar el sistema de titulación a microescala tal como se muestra en la figura 2 :
 - a) Antes de ensamblar, llenar las dos jeringas con hidróxido de sodio 0.5 N .
 - b) Ensamblar el sistema de titulación cómo se indica en la figura 2.
 - c) Purgar el espacio de la punta de dispensación .
 - d) Llenar la jeringa vertical desde el inicio de la escala.
4. Titular la muestra con solución de NaOH 0.5N, documentar el volumen gastado.
5. Informar el dato de acidez total como ácido acético por 100m , utilizando la siguiente formula:

$$\text{g de Ácido acético/100ml} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N}}{60 \times 100 / 1000 \times \text{mL de muestra}}$$

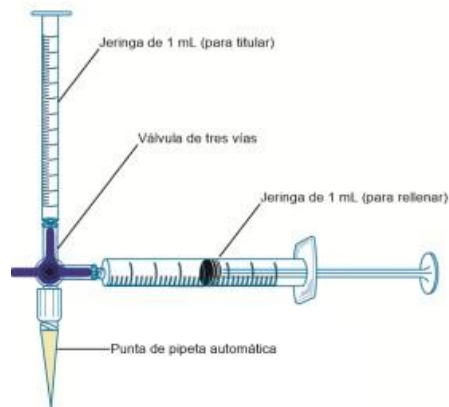


Figura 2: Aparato para titulación a microescala.

Tabla 1: ejemplo de documentación de resultados.

<i>Determinación de acidez por micro titulación</i>		
<i>Tiempo (días)</i>	<i>Volumen de NaOH gastado</i>	<i>g acido/100mL</i>
<i>0</i>		
<i>x</i>		