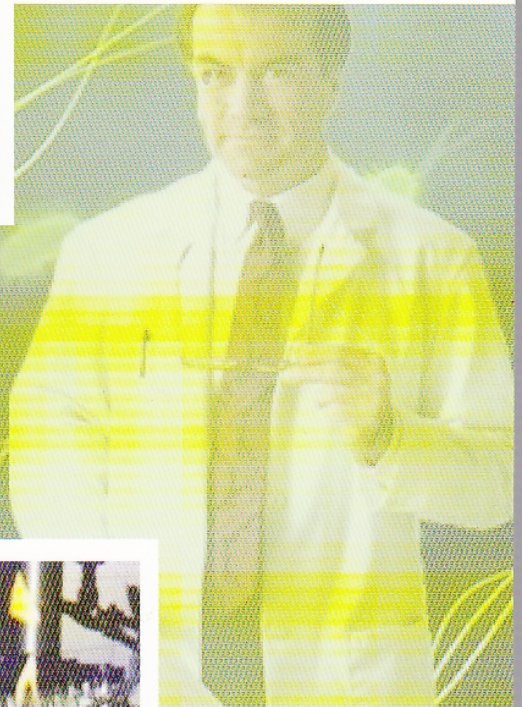
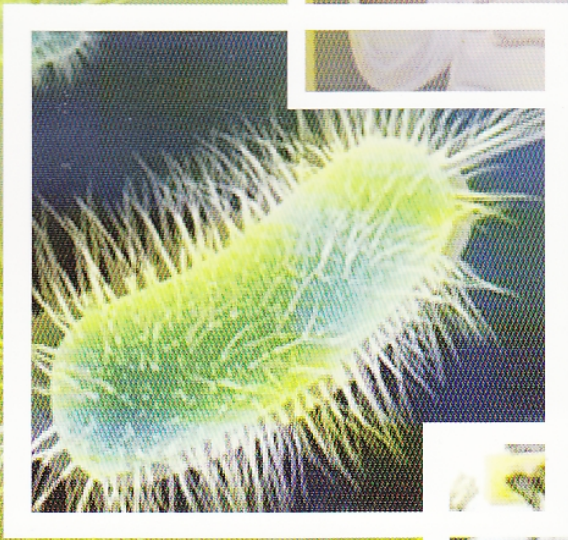


# Manual de Microbiología Agroindustrial



Mblga. Ms.C. Flor Teresa García Huamán  
Mblga. Ms.C. Luz Azucena Torres García



**Manual de  
Microbiología  
Agroindustrial**

- Segunda edición: 2011.  
Tiraje: 1000 ejemplares.
- Derechos de autor reservados:  
Mblga. Dra. Flor Teresa García Huamán  
Jr. La Merced N° 382 - Chachapoyas  
Mblga. Ms. C. Luz Azucena Torres García  
Jr. Amazonas N° 433
- Hecho el Depósito Legal en la Biblioteca Nacional del Perú N° 2008 - 09666
- Derechos de edición reservados:  
COMPUGRAPH SRL  
Av. Libertad N° 521 – Chachapoyas

2011, Febrero.  
Chachapoyas, Perú

Prohibida la reproducción total o parcial de esta obra.  
Sin previa autorización escrita de los autores.

## PRESENTACIÓN

La Microbiología es el estudio de los microorganismos, un extenso y variado grupo de microorganismos microscópicos que existen como células aisladas o agrupaciones celulares; también incluye el estudio de los virus, que son microscópicos pero no celulares. Las células microbianas son distintas de las células animales y células vegetales que son incapaces de vivir aisladas en la naturaleza y sólo pueden existir como parte de los organismos pluricelulares. Una célula microbiana aislada es, en general capaz de llevar a cabo sus procesos vitales de crecimiento, generación de energía y reproducción independiente de otras células, de la misma o de diferente clase.

La Microbiología se ocupa de muchos problemas prácticos que son importantes en medicina, agricultura e industria. Algunas de las enfermedades más importantes de humanos, animales y plantas son causadas por microorganismos. Los microorganismos desempeñan importantes funciones en la fertilidad de los suelos y en la producción animal. Muchos procesos agroindustriales a gran escala se basan en microorganismos lo que ha conducido al desarrollo de toda una disciplina, la biotecnología.

La Microbiología Agroindustrial es la disciplina que utiliza los microorganismos generalmente cultivados a gran escala para obtener productos comerciales de valor o para realizar importantes transformaciones químicas. Se originó con procesos de fermentación alcohólica tales como los de la fabricación del vino y de la cerveza, posteriormente se desarrollaron procesos microbianos para la producción de compuestos farmacéuticos, aditivos alimentarios, enzimas y compuestos químicos tales como el butanol y el ácido cítrico. Todos estos procesos microbiológicos se basan en la potenciación de reacciones metabólicas que los microorganismos ya eran capaces de llevar a cabo con el fin, en la mayoría de los casos de aumentar la producción del compuesto de interés.

Dejamos con ustedes este manual que les permitirá iniciarse en la práctica de utilizar microorganismos para la obtención de productos de interés o para determinar la presencia de los mismos en los productos y alimentos frescos, estaremos muy complacidas si logramos alcanzar nuestro objetivo.

Los Autores

CONTENIDO

	Pág.
Aislamiento de bacterias productoras de amilasas. ....	3
Técnicas de sembrado: estría, puntura, diseminación e incorporación. ....	17
Determinación del número de bacterias de una muestra: Recuento en placa. ....	27
Método de reducción del azul de metileno. ....	35
Determinación del numero de bacterias de una muestra: Técnica del	
Número Mas Probable (NMP).....	42
Investigación de <i>Salmonella</i> en alimentos. ....	51
Aislamiento y selección de levaduras productoras de etanol.....	63
Evaluación de la capacidad fermentativa de las levaduras.....	72
Aislamiento de hongos. Microcultivo.....	84
Elaboración de yogurt natural y frutado.....	100
Elaboración de vino.....	111
ANEXOS.....	130

## AISLAMIENTO DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE AMILASAS

### I. FUNDAMENTO TEÓRICO

La población microbiana del ambiente es grande, diversa y compleja. Así el aire, suelos, aguas, animales, vegetales, etc. Contienen una gran variedad de microorganismos. Un gramo de tierra fértil de jardín, puede tener varios miles de millones de organismos entre bacterias, hongos, algas y protozoarios. Además diversos nematodos e insectos. De esta gran población es factible aislar microorganismos con cualidades especiales, útiles para las industrias biotecnológicas. El aislamiento se puede lograr mediante la aplicación de técnicas de screening (selección).

Las técnicas de screening posibilitan el aislamiento de un determinado tipo o pequeño número de microorganismos a partir de una población grande cualitativa y cuantitativamente diferente. Para aislar microorganismos productores de determinados metabolitos, es necesario tener presente algunas consideraciones: ¿Cuáles son los microorganismos productores del metabolito de interés?, ¿Cuál es su hábitat natural? y ¿Cuáles son sus características morfológicas y culturales?. También es de mucha importancia conocer sus requerimientos nutricionales, tanto para crecimiento como para la síntesis del metabolito de interés, así como sus condiciones óptimas de incubación.

En los microorganismos, las enzimas que participan en los procesos metabólicos, generalmente se producen en pequeñas cantidades. Sin embargo, algunas enzimas se producen en cantidades mayores a sus requerimientos. Si son intracelulares, es necesario después de la producción de biomasa, lisar las células y proceder a la extracción de las enzimas, y si son extracelulares, las excretan al medio de producción.

Una de las enzimas que se explotan a nivel industrial son las amilasas. Son enzimas extracelulares que hidrolizan el almidón y que pueden ser producidos por diferentes microorganismos, entre ellos las bacterias y hongos. Estas enzimas tienen diferentes aplicaciones en la industria, se utilizan para modificar las características de almidones naturales, es así, que en panadería y molinería se usa para la reducción de la viscosidad de las pastas, aceleración del proceso de fermentación, incremento del volumen del pan, mejoramiento de la miga y textura, mantenimiento de frescura y suavidad, mejoramiento de la textura de las

pastas, reducción del tiempo de mezclado, incremento del volumen de la masa; en cervecería, para el proceso del malteado; cereales, alimentación con precocidos para infantes, alimentos instantáneos; chocolate y cocoa, para la manufactura de jarabes; en industria alimentaria para la producción de edulcorantes, jarabe de maíz, para la manufactura de jarabes de alto contenido de maltosa, producción de jarabe de bajo índice de dextrosa, bebidas destiladas; en fundición, confiere mayor solidez; en textilería, para el proceso de engomado y desengomado; en saborizantes, como clarificantes; en alimentos vegetales, para licuefacción de purés y sopas. En la industria del papel; piensos y detergentes.

## II. OBJETIVOS DE LA PRÁCTICA

- 2.1 Aislar bacterias productoras de amilasas a partir de muestras de suelo.
- 2.2 Seleccionar bacterias productoras de amilasas de posible aplicación agroindustrial.

## III. MATERIALES Y EQUIPOS

### 3.1 Muestra:

- Suelo de terrenos de cultivo

### 3.2 Medios de Cultivo:

- Agar Almidón Extracto de Levadura

### 3.3 Reactivos Colorantes y Soluciones

- Agua destilada estéril
- Alcohól yodado
- Almidón
- Solución de lugol
- Solución salina fisiológica
- Set para coloración Gram

### 3.4 Material de Vidrio

- Asa de drigalsky
- Baguetas
- Beacker de 200ml
- Frascos vacíos de penicilina
- Mecheros
- Frascos vacíos de “Frugos o Calipso”
- Goteros
- Laminas portaobjeto
- Matraces de 250 y 500 ml.

- Pipetas de 10, 5 y 1 ml.
- Termómetro
- Tubos de ensayo 13x100 mm.

### 3.5 Equipos

- Asa bacteriológica
- Algodón
- Balanza de platillo
- Bandejas de plástico
- Bisturí, tijera o navaja
- Bolsas de polietileno de primer uso
- Cocina eléctrica
- Colador de plástico
- Encendedor
- Espátula de metal
- Franela
- Gradillas

## IV. PROCEDIMIENTO

### 4.1 Recolección de las muestras y pre-enriquecimiento

- Recolectar adecuadamente las muestras de suelo, siguiendo las instrucciones del profesor de la mesa.
- Anotar la ubicación y las condiciones climáticas al momento de la recolección.
- Colocar las muestras por separado, en bolsas de polietileno de primer uso.
- Transportarlas al laboratorio.
- Colocar las muestras en bandejas, retirar el material lignocelulósico visible.
- Adicionar almidón, cáscaras de tubérculos, raíces u otros desechos que contengan almidón, según las indicaciones del profesor responsable de la práctica.
- Humedecer diariamente, evitando el exceso de agua y remover periódicamente durante 5 a 10 días.

### 4.2 Preparación de las muestras de suelo

- Cumplido el tiempo del pre-enriquecimiento, homogenizar la muestra adecuadamente.
- Retirar, en forma manual, las piedras u otras partículas gruesas.
- Tamizar con ayuda de un colador.
- Pesar 10g. de suelo y colocarlo en un beacker conteniendo 100 ml de agua destilada. Homogenizar.



- Calentar la muestra a 80 °C durante 10 minutos.
- Trabajar una muestra testigo sin tratamiento térmico.
- Hacer diluciones decimales en SSF o ADE, de la muestra problema y de la muestra testigo. Rotular adecuadamente.

#### **4.3 Cultivo**

- Sembrar 0.1 ml. de las dos últimas diluciones de la muestra sometida a tratamiento térmico y de la muestra testigo, en placas conteniendo agar extracto de levadura.
- Incubar a 30°C durante 24 a 48 horas. Chequear el crecimiento cada 24 horas.

#### **4.4 Aislamiento y selección**

- Transcurrido el tiempo de incubación, contar el número de colonias.
- Adicionar una solución de lugol e identificar las colonias que producen amilasas, observando zonas transparentes alrededor de ellas.
- Anotar las características microscópicas de las colonias productoras, tales como: Color, tamaño, bordes, etc.
- Aislar las colonias productoras en tubos conteniendo agar extracto de levadura. Rotular e incubar a 30° C durante 24 horas.
- Después de la incubación, hacer coloraciones Gram con la finalidad de observar su morfología microscópica, chequear su pureza y determinar su comportamiento frente a la coloración Gram.
- Si la observación microscopía denota contaminación, suspender la colonia contaminada en SSF o ADE y sembrar por estría en placas conteniendo agar extracto de levadura. Posteriormente, incubar a 30 °C durante 24 horas.
- Repetir los pasos iniciales del punto 4.4 y continuar.
- Si la contaminación persiste, realizar nuevamente un proceso de purificación maximizando las medidas de asepsia.
- Una vez obtenido cultivos puro productores de amilasas, sellarlos en condiciones asépticas y guardarlos adecuadamente a 10°C hasta el momento de proceder a la selección.

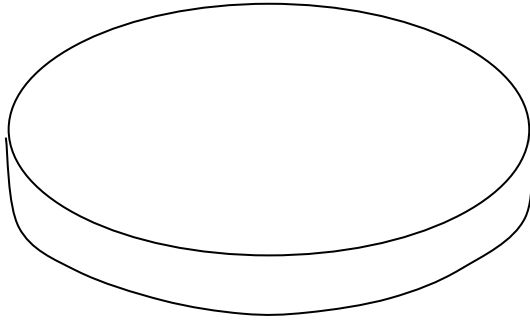
#### 4.5 Selección de cultivos productores

- Sembrar los cultivos puros, por puntura, en placas conteniendo agar almidón extracto de levadura verificando que las placas estén completamente secas antes de la siembra. Esta siembra debe hacerse en forma equidistante y máximo cuatro cultivos por placa.
- Incubar a 30°C y observar crecimiento a partir de las 20 hasta las 48 horas. Alcanzando el crecimiento adecuado de las colonias, si es necesario, colocar las placas a 10°C hasta el momento de ser evaluadas.
- Adicionar lugol en cantidad adecuada para humedecer la superficie de la placa y dejar en reposo aproximadamente durante 2 minutos.
- Identificar las zonas de hidrólisis del almidón.
- Medir el diámetro del halo total de hidrólisis de almidón.
- Medir el diámetro de la colonia. Si ésta tiene forma irregular, hacer varias mediciones y sacar el promedio correspondiente.
- Con los datos obtenidos calcular el halo neto de hidrólisis del almidón.
- Seleccionar las colonias que presentan los mayores halos netos de hidrólisis. En caso de ser necesario, sembrarlas en tubos agar almidón extracto de levadura e incubarlas a 30°C durante 24 horas.
- Chequear la pureza de los cultivos mediante coloración Gram. Si las colonias estuvieran contaminadas, purificar mediante diluciones en SSF o ADE y siembra en agar almidón extracto de levadura.
- Rotular los cultivos productores y sellarlos en forma aséptica. Conservar los cultivos a 10°C.

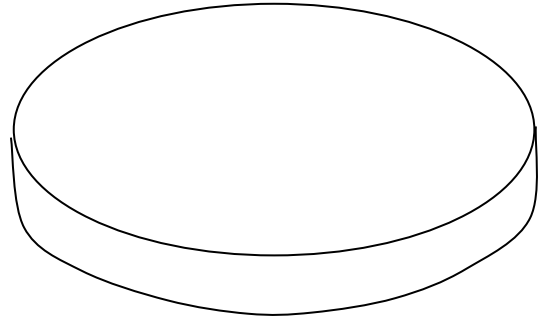
V. DIBUJAR LAS OBSERVACIONES (Resultados)

CULTIVO

Características de las colonias



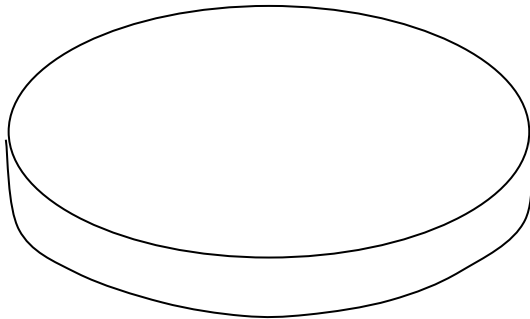
.....  
.....  
.....  
.....  
.....



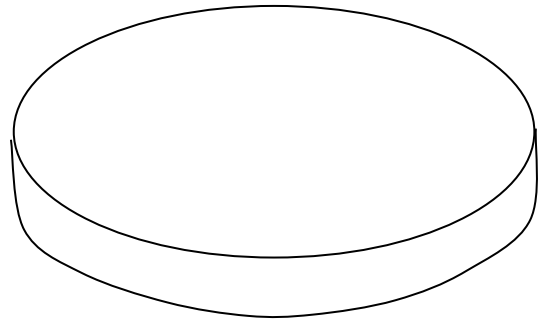
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

AISLAMIENTO Y SELECCIÓN

Características de las colonias

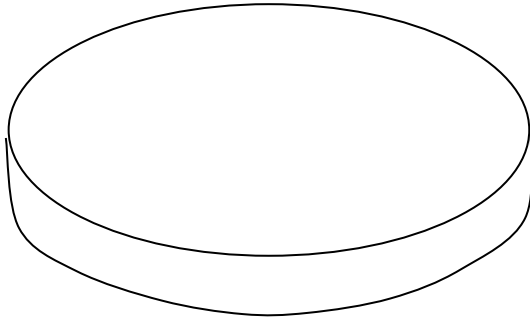


.....  
.....  
.....  
.....  
.....

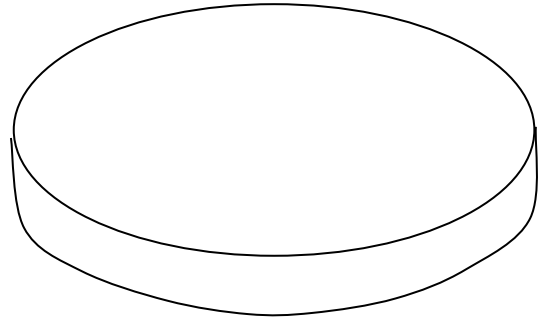


.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Características de las colonias



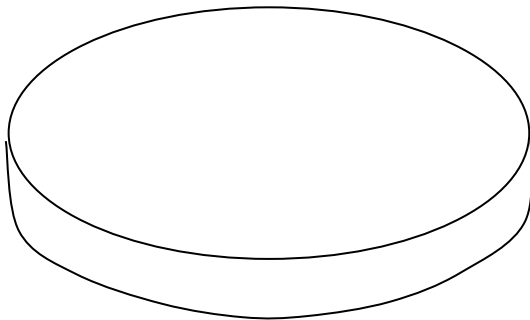
.....  
.....  
.....  
.....  
.....



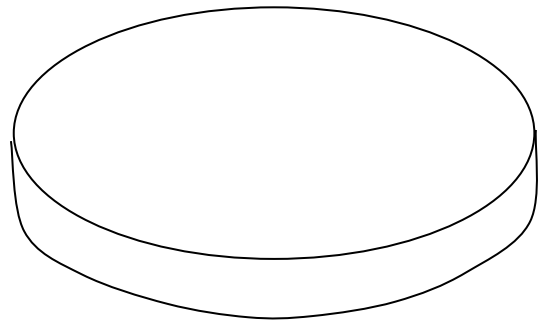
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

SELECCIÓN DE CULTIVOS PRODUCTORES DE AMILASAS

Características de las colonias

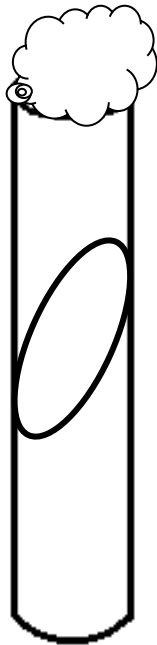
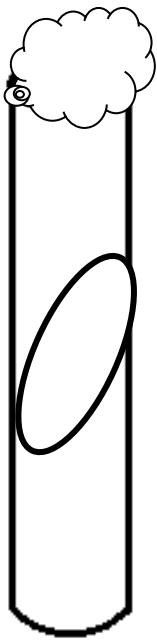


.....  
.....  
.....  
.....  
.....



.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Siembra en Agar inclinado para su conservación



.....

.....

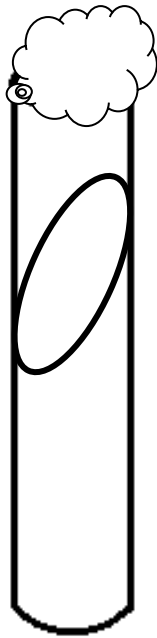
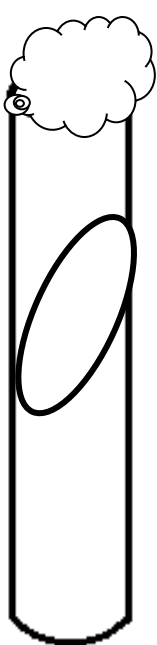
.....

.....

.....

.....

.....



.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## CÁLCULO DEL HALO NETO DE HIDRÓLISIS DEL ALMIDÓN

Halo neto de Hidrólisis = Halo total de hidrólisis – Diámetro de la colonia

VI. DISCUSIÓN

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....





.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

**CUESTIONARIO**

1. ¿Por qué utilizó muestras de suelo para aislar bacterias productoras de amilasa?

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

2. ¿Porqué es necesario pre enriquecer la muestra de suelo?

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

3. ¿Cuáles son los requerimientos nutricionales de las bacterias del género *Bacillus*?

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

4. ¿Qué representa un mayor o menor halo neto de hidrólisis?

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

5. Mencione las utilidades industriales de las amilasas

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

## TÉCNICAS DE SEMBRADO

### ESTRÍA, PUNTURA, DISEMINACIÓN E INCORPORACIÓN

#### I. FUNDAMENTO TEÓRICO

Para estudiar debidamente los microorganismos se necesita como requisito previo el cultivarlos en condiciones de laboratorio. Para lograr esto es preciso conocer cuales son los nutrientes y las condiciones físicas que requieren.

Mediante investigaciones extensas se han determinado, las necesidades nutricionales de las bacterias, y esta información ha sido causa del desarrollo de numerosos medios de cultivo. Ya que las necesidades nutricionales de las bacterias varían de manera muy amplia, existen diferencias muy importantes en cuanto a la composición de los medios empleados. Las bacterias también tienen diferencias notables en lo que respecta a las condiciones del ambiente que favorece su proliferación. Por ejemplo, algunas prosperan bajo 0°C, otras necesitan temperaturas superiores a los 45°C y pueden producirse aun a 70°C. Algunas necesitan atmósfera de oxígeno, en cambio otras se inhiben con el oxígeno o bien este elemento les es indiferente.

La siembra es un procedimiento que consiste en acondicionar el microorganismo a un medio de cultivo fértil, de acuerdo a sus exigencias vitales, para que en condiciones óptimas de temperatura y tiempo de incubación, puede desarrollar y multiplicarse in vitro. Se siembra con dos finalidades:

- Para hacer un aislamiento.
- Para hacer un trasplante.

**Aislamiento:** Permite la separación de los microorganismos al estado de pureza a partir de una muestra problema. Se requiere un medio sólido con gran superficie para que los microorganismos al ser diseminados sobre el medio, generen su progenie (cepa) por formación de colonias separadas.

Si se aislan especies distintas, cada colonia tendrá caracteres especiales. La morfología bacteriana será también distintiva.

**Trasplante:** Significa la separación primaria de la cepa a un medio de cultivo apropiado en tubo, que puede ser líquido o sólido. Se conserva la cepa pura y por subsiguientes trasplantes en medios especiales, se logra conocer las propiedades culturales y bioquímicas y como resultado, la identificación específica.

Existe gran variedad de técnicas por medio de las cuales las diferentes especies en una muestra natural pueden ser aisladas y desarrollarse como un cultivo puro, entre ellas las técnicas de siembra en placa por estrías o difusión se pueden hacer convenientemente y con equipo mínimo; estos son procedimientos de rutina que se efectúan para aislar bacterias en cultivo puro. Aunque una de sus limitaciones es que sólo pequeñas cantidades de la muestra pueden ser esparcidas sobre la superficie del medio de cultivo.

Otras técnicas de siembra son la diseminación y difusión (incorporación) cuyos inconvenientes muchas veces son realizar las diluciones en más de un tubo para obtener colonias bien aisladas, si es que no se conoce la magnitud de la población bacteriana de la muestra antes de manejarla.

## II. OBJETIVOS DE LA PRÁCTICA

- 2.1 Conocer las diferentes técnicas de sembrado en el aislamiento de microorganismos.
- 2.2 Aislar eficientemente los microorganismos, aplicando correctamente las técnicas de siembra.

## III. MATERIALES Y EQUIPOS

### 3.1 Medios de Cultivo

- Placas con agar Mac Conkey.
- Agar Mac Conkey fundido a 45°C
- Tubos 13X100mm con TSI (Triple Sugar Iron) inclinado

### 3.2 Materiales

- Mechero
- Asa bacteriológica
- Pipetas de 1ml y 0.1 ml.
- Espátula digralski
- Tubos 16x150mm. Con 9ml. de SSF
- Algodón, alcohol, fósforo
- Plumón marcador de vidrio

### 3.3 Muestra Biológica

- Suspensión bacteriana
- Colonias bacterianas en Agar Mac Conkey

## IV. PROCEDIMIENTO

### Aislamiento por Estrías:

- Con la mano derecha flamear el asa de siembra, al rojo, manteniéndola verticalmente en el mechero.
- Utilizando los dedos de la mano izquierda, quitar el tapón de algodón (o tapa rosca) del tubo que contiene la muestra, y tomar una cantidad ligera del inóculo, en seguida se vuelve a tapar el tubo.
- Con la mano izquierda se toma la placa petri de agar, se manipula con los dedos para levantar parcialmente la tapa.
- Con la mano derecha se toma el asa y se distribuye el inóculo por estrías en zigzag, con escasa separación unas de otras (1 a 3 mm). La distribución puede ser por estría simple y estría en triángulo o cuadrado.

Sobre las primeras estrías, desarrollará unas masas microbianas indiferenciadas; en las estrías intermedias, un desarrollo casi uniforme con una que otra colonia pequeña ligeramente aislada y en las últimas, escasas colonias de desarrollos normales y diferenciados. En caso de aislamiento por planos; las últimas con colonias definidas y diferenciadas. Estas deben ser las elegidas para el trasplante y obtención de cepas puras.

### Aislamiento por Diseminación:

- Mediante la pipeta pasteur estéril se toma una mínima cantidad de inóculo. El dedo índice de la mano derecha debe cubrir la abertura superior, para evitar se vacíe el contenido.
- El inóculo es depositado en un margen del agar.
- Con la varilla horizontal de la espátula de digralsky (o alambre doblado del asa), se distribuye el inóculo por toda la superficie del medio, evitando pasar dos veces por el mismo plano. La tapa de la placa debe levantarse sólo lo necesario, para evitar contaminación.

Aislamiento por Difusión (Incorporación):

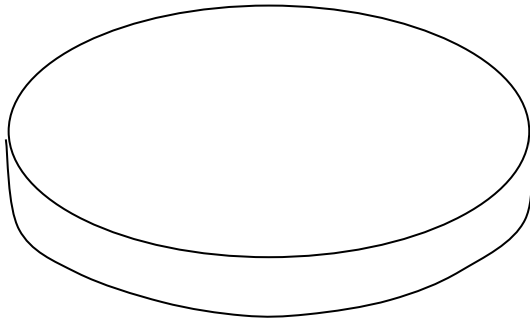
- De la muestra problema, con una pipeta Pasteur se saca 1 ml de inóculo y se lleva a un tubo que contiene 9 ml de dilución básica. Este tubo corresponde a la dilución 1:10 ( $1/10$  o  $10^{-1}$ ).
- De la dilución 1:10 se saca 1 ml y se lleva a otro tubo con 9 ml. de dilución. Esta dilución corresponde a 1:100.
- De la dilución 1:100 se saca 1 ml y se transfiere a otro tubo con 9 ml. de la dilución básica. Este tubo es la dilución 1:1000. Las diluciones pueden continuar o no, según convenga al experimento.
- De cada tubo de dilución se transfiere 1 ml a una placa petri esterilizada.
- Introduzca de 15 a 18 ml de agar fundido esterilizado y enfriado a 45°C, en cada una de las placas que contienen las diluciones.
- Mezclar el medio agar con el inóculo haciendo girar suavemente la placa petri. Dejar que solidifique el medio, con una superficie plana.
- Ponga a incubar las placas, en posición invertida de 24 a 48 horas.
- Escoger una placa que contenga de 30 a 300 colonias, cuente el número de colonias. Multiplique el número de colonias por la dilución de la muestra. Por ejemplo si la placa de dilución 1:10 muestra 40 colonias, tenemos  $40 \times 10 = 400$ ; el cálculo de población bacteriana del espécimen original sería 400 microorganismos por mililitro y se registra como cuenta estándar de placa por mililitro.

Aislamiento por Puntura:

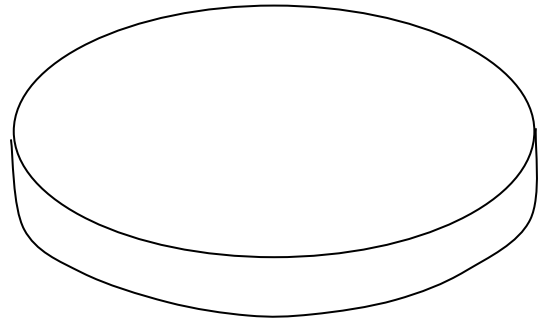
- Utilizar el asa en punta, previamente esterilizada, tocar con la punta la colonia escogida de la placa.
- Quitar el tapón del tubo que se va a inocular y atravesarse el medio aproximadamente hasta la mitad de su profundidad, con un movimiento recto vertical, teniendo cuidado de retirar la aguja a lo largo de la misma senda.
- Incubar a 37°C por 24 horas.

V. DIBUJAR LAS OBSERVACIONES (Resultados)

Aislamiento por Estrías:

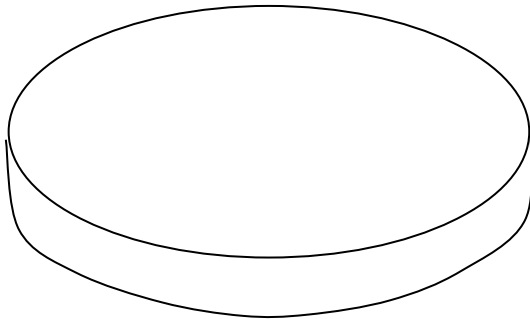


.....  
.....  
.....  
.....  
.....

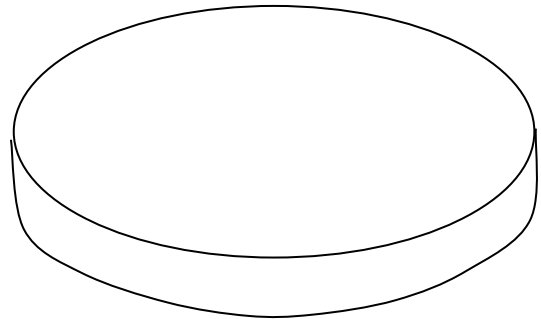


.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Aislamiento por Difusión:



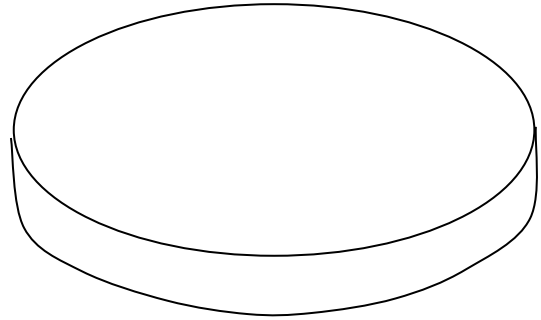
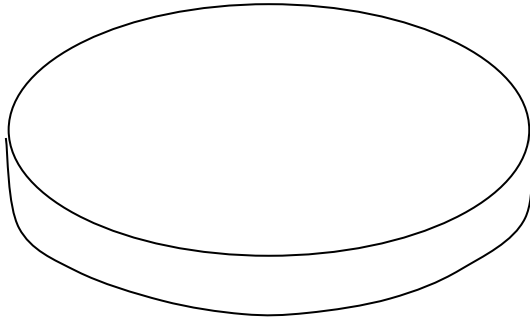
.....  
.....  
.....  
.....  
.....



.....  
.....  
.....  
.....  
.....



Aislamiento por Diseminación:



.....  
.....  
.....  
.....  
.....

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Aislamiento por Puntura:



.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....





**CUESTIONARIO**

1. ¿Qué criterios se debe tener en cuenta para elegir una técnica de siembra?

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

2. ¿Cuál es la finalidad de sembrar un microorganismo en un medio de cultivo artificial?

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

3. ¿Qué técnica de siembra utilizaría para hacer un trasplante bacteriano? ¿Por qué?

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

4. ¿Por qué mediante la técnica de sembrado por estrías, en un cuadrante de la placa petri se desarrollan masas microbianas indiferenciadas?

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

5. Cree Ud. que la técnica de siembra esta en función de la elección del medio de cultivo a utilizar?

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE BACTERIAS DE UNA MUESTRA:  
RECUENTO EN PLACA

I. FUNDAMENTO TEÓRICO

El método de recuento en placa para determinar el número de bacterias de una muestra se basa en la presunción de que cada célula bacteriana puede crecer en un medio de cultivo sólido formando colonias.

De acuerdo a este criterio el número de colonias desarrolladas en un medio de cultivo sólido puede corresponder al número de células bacterianas viables presentes en una cantidad determinada de muestra que haya sido inoculada.

II. OBJETIVOS DE LA PRÁCTICA

- 2.1 Determinar el número de bacterias presentes en muestras de pescado mediante la Técnica de Recuento en Placa.

III. MATERIALES Y EQUIPOS

- Requisitos necesarios para la preparación y dilución de las muestras de alimentos.
- Placas petri (100x150mm).
- Pipetas bacteriológicas de 1.5 y 10 ml.
- Baños de agua regulada a 44-46 °C para mantener el agar licuado.
- Incubadora regulada a 29-31 °C.
- Contador de colonias.
- Agar Plate Count o Agar Cuenta Gérmenes
- Material Biológico: Pescado

IV. PROCEDIMIENTO

1. Preparar y diluir la muestra del alimento (piel y músculos del pescado) por la técnica adecuada.
2. Pipetear por duplicado a las placas estériles alícuotas de 1 ml a partir de la dilución  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y una alícuota de 0.1 ml de la dilución  $10^{-5}$  para obtener una dilución de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  g. o ml de muestra por placa petri. Se

- sugiere esta serie de diluciones si no se conoce el rango aproximado del número de bacterias.
3. Agregar rápidamente a las placas petri 15 ml de agar licuado y temperado. Entre la preparación y la adición del agar no debe transcurrir más de 10 minutos.
  4. Mezclar inmediatamente las alícuotas con el agar mediante movimientos de vaivén y rotación de las placas petri se pueden seguir los siguientes pasos:
    - a) Mover la placa de arriba a bajo cinco veces en una dirección.
    - b) Rotar cinco veces la placa en sentido de las agujas del reloj.
    - c) Mover la placa cinco veces en la dirección que haga ángulo recto al usado en el primer tiempo.
    - d) Rotar cinco veces la placa en sentido inverso al de las agujas del reloj.
  5. Como control de esterilidad, adicionar a placas petri, agar sin inocular y agar inoculado con el diluyente.
  6. Una vez solidificado el agar, invertir las placas e incubarlas a 29-31°C durante 48 +/- 3 horas.
  7. Cómputo del recuento estándar en placa:
    - a) Seleccionar 2 placas correspondientes a una dilución que contenga entre 30 y 300 colonias utilizando un contador de colonias.
    - b) Tomar la media aritmética de los recuentos y multiplicar por el factor de la dilución (recíproco de la dilución usada). Reportar el resultado como número de microorganismos aerobios mesófilos por gramo o mililitro según sea el caso.
    - c) Si las placas de dos diluciones consecutivas presentan recuentos menores que 30 y mayores que 300, tomar el promedio de los dos recuentos.
    - d) Si el número de colonias de las placas de dos diluciones consecutivas están dentro del rango de 30-300, computar el recuento para cada una de las diluciones y establecer la relación de los dos recuentos.
    - e) Si el cociente es menor que 2, reportar el promedio de los dos valores; pero si el recuento mayor contiene 2 veces o más al menor, en este caso se reportará el recuento menor.
  8. Computo del estimado del Recuento Standard en Placa.
    - a) Si las placas de todas las diluciones muestran más de 300 colonias, dividir cada duplicado de placas de la dilución más alta en secciones radiales convenientes (2, 4, 8) y contar todas las colonias en una o más

secciones. Multiplicar el total en cada caso por el factor apropiado para obtener el número de colonias por toda la placa. Promediar los estimados de las 2 placas duplicadas y multiplicar por la dilución correspondiente. Reportar el resultado como un estimado del número.

- b) Si hubiese más de 200 colonias por 1/8 de sección de la placa, multiplicar 1,600 (200x8) por la dilución y expresar el estimado como mayor que (>) el N° resultante. Ejemplo  $1600 \times 10^3 = 1600,000/g$  o ml.
- c) Si no hubiese colonias en placa de la mayor concentración, reportar el estimado como menor que (<) una vez la dilución.
- d) Ejemplo:  $10^{-1} = 0$  colonias. Se reporta como  $< 10/g$ .
- e) Si se hubiese sembrado 0.1 ml en este mismo caso se reporta  $< 100/g$  o ml.

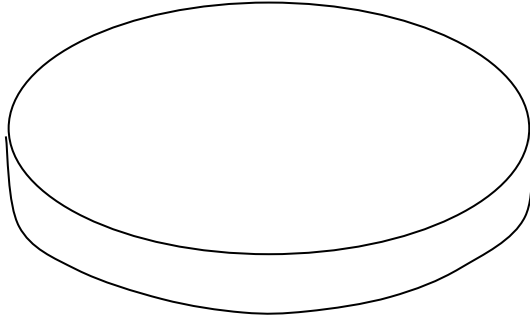
#### 9. Expresión de Resultados

- a) Se deberá reportar únicamente 2 dígitos significativos, ellos son el primero y el segundo (comenzando por la izquierda) del promedio de los recuentos. Los demás dígitos se reemplazarán por ceros. Ejemplo: 523,000 se reportará como  $520,000 = 52 \times 10^4$  g o ml de alimento según sea el caso. Si el tercer dígito de la izquierda es 5 o mayor que 5, adicionar una unidad al segundo dígito (redondear). Ejemplo 83,600 se reportará como  $84,000 = 84 \times 10^3$  g o ml de alimento.
- b) Si el recuento en placa se utiliza para determinar la aceptación o rechazo de un lote de alimentos, únicamente se considerará el recuento Standard en placa, nunca el estimado del recuento, este es útil solamente como una aproximación primaria en la determinación de la calidad microbiológica.

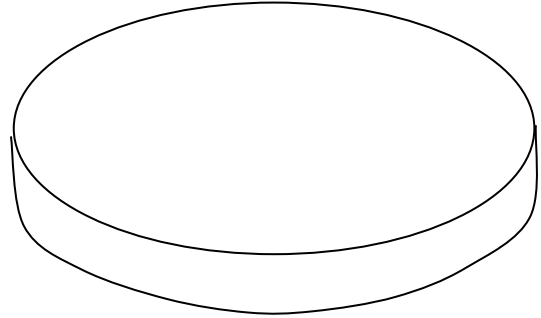


V. DIBUJAR LAS OBSERVACIONES (Resultados)

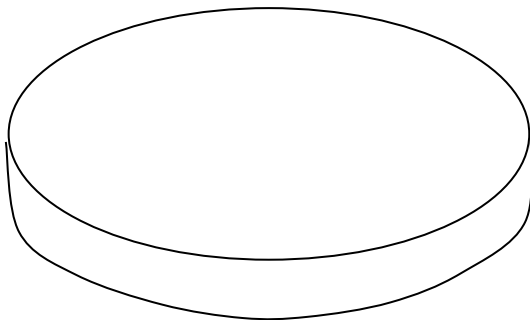
Características de las colonias y cálculo de los resultados



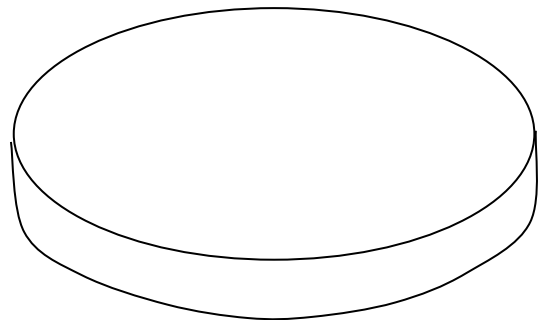
.....  
.....  
.....  
.....  
.....



.....  
.....  
.....  
.....  
.....



.....  
.....  
.....  
.....  
.....



.....  
.....  
.....  
.....  
.....





**CUESTIONARIO**

1. ¿Qué significa la presencia de colonias bacterianas en Agar Plate Count ?

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

2. ¿Por qué es importante realizar el recuento bacteriano?

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

3. ¿Para qué se realizan diluciones de la muestra problema?

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

4. ¿Ud. podría realizar el recuento bacteriano utilizando como medio de cultivo un caldo?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

5. ¿Cuál sería el recuento estándar en placa si ud. tuviera una placa con cuarenta y cinco microorganismos aerobios mesófilos viables por mililitro y otra placa con doscientos cincuenta, cuya dilución en ambos casos fue  $10^{-2}$ ?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## METODO DE REDUCCIÓN DEL AZUL DE METILENO PRUEBA DE LA REDUCTASA

### I. FUNDAMENTO TEÓRICO

El método de reducción del azul de metileno, mide en términos de intervalo de tiempo requerido la decoloración de una mezcla Colorante-Leche de color azul característico hasta el blanco, desde el comienzo de la incubación.

El método de reducción del azul de metileno es un método indirecto para calcular el contenido total de bacterias de la leche. En lugar de contar directamente las bacterias, se establece una correlación entre el tiempo que se necesita para reducir el colorante de azul de metileno en leche a una forma incolora, y la probable población bacteriana de la muestra. Por lo general el tiempo que se necesita para la reducción del colorante es inversamente proporcional al número de bacterias presentes en la leche.

La leche después que sale de la vaca se expone y mezcla con el aire, aumentando su potencial de oxido reducción (O/R). Al desarrollarse las bacterias en la leche consumen oxígeno y producen sustancias reductoras que disminuyen su potencial de oxido reducción a valores negativos. El azul de metileno y la resazurina son dos indicadores del potencial de O/R útiles para la prueba de la reductasa.

### II. OBJETIVO DE LA PRÁCTICA

- 2.1 Determinar la calidad de la leche fresca mediante el método de reducción del azul de metileno.

### III. MATERIALES Y EQUIPO

#### Materiales

- Tubos con tapa rosca de 16x150mm estériles.
- Pipetas graduadas de 1 y 10 ml. estériles.
- Gradilla.
- Baño María.
- Estufa.
- Plumón marcador.

Muestra:

- Leche.

Reactivos y tubos de prueba

- Solución de azul de metileno.
- Tubo de prueba con 10ml. de leche y 1ml. de solución de azul de metileno calentado en baño de agua hirviente durante 3 minutos (usado como control de intensidad de color al inicio de la prueba).
- Tubo de prueba con 10ml. de leche y 1ml. de agua destilada calentado en baño de agua hirviente durante 3 minutos (usado como control de color final de la prueba).

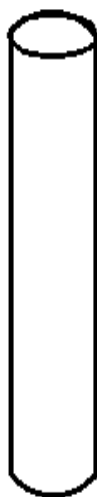
#### IV. PROCEDIMIENTO

- Pipetear 1ml. de la solución de azul de metileno al tubo.
- Identificar los tubos en forma legible e indeleble.
- Adicionar 10ml. de la muestra de leche a examinar. Si utilizan varias muestras utilizar una pipeta para cada una.
- Tapar los tubos tan pronto como la muestra haya sido adicionada.
- Invertir suavemente tres veces cada tubo y anotar el tiempo de inicio de la incubación. No sustituir agitación por inversión.
- Incubar a 37°C.
- Cada 30 min. invertir los tubos que muestren reducción y colocarlos en posición normal (vertical) en el baño maría. La finalidad de esta operación es mejorar la distribución de las bacterias en la muestra, no se aplica a las muestras con inicio de reducción.

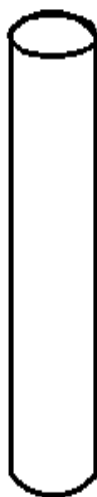
TABLA DE CALIFICACION DE LA LECHE CRUDA

Más de 4 horas	Muy buena (A)
De 3 a 4 horas	Buena (B)
Mas de 30min. A menos de 3 horas	Aceptable (C)
Menos de 30 minutos	Mala (D)

V. DIBUJAR LAS OBSERVACIONES (Resultados)



1



2



3







**CUESTIONARIO**

1. ¿Por qué ocurrió el cambio de color con el azul de metileno en el tubo problema?

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

2. ¿Qué significaría un cambio de color en menos de 30 minutos en el tubo problema?

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

3. ¿Qué significaría un cambio de color de mas de 4 horas en el tubo problema?

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

4. ¿Por que utilizó azul de metileno en la practica? ¿Podría utilizar otro reactivo?  
¿Por qué?

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

5. Explique el metabolismo bacteriano en el tubo de prueba?

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

## DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE BACTERIAS DE UNA MUESTRA: TECNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)

### I. FUNDAMENTO TEÓRICO

Esta técnica se basa en la presunción de que las bacterias se hallan normalmente distribuidas en un medio líquido, esto es, que las muestras repetidas del mismo tamaño de un mismo producto, debe esperarse contengan el mismo número de gérmenes como promedio, naturalmente algunas de las muestras pueden contener algunos gérmenes mas o menos. La cifra media es el número más probable. Si el número de gérmenes es grande, la diferencia entre las muestras serán pequeñas; todos los resultados individuales estarán próximos a la media. Si el número de gérmenes es pequeño, las diferencias, hablando relativamente serán mayores.

Es posible calcular el número mas probable de gérmenes/100ml. con cualquier combinación de resultados obtenidos de tales muestras. Se han hecho tablas para muestras de 10 ml, 1 ml y 0,1 ml, utilizando cinco o tres tubos para cada tamaño de la muestra y, para determinaciones en agua, utilizando una muestra de 50 ml. La presencia de coliformes fecales y *Escherichia coli* se usa para indicar una contaminación potencialmente peligrosa por el hecho de que el habitat natural de estos microorganismos son las heces humanas y de animales de sangre caliente.

### II. OBJETIVOS DE LA PRÁCTICA

- 2.1 Determinar el número de bacterias presentes en muestras de pescado, verduras y frutas mediante la Técnica del Numero Más Probable.
- 2.2 Analizar la naturaleza de la contaminación del pescado, verduras y frutas analizadas.

### III. MATERIALES Y EQUIPOS

- a) Los requeridos para la preparación y dilución de muestra de alimentos.
- b) Incubadora a 35-37°C.
- c) Pipetas bacteriológicas de 1 ml.
- d) Asa de Siembra.

e) Medios de Cultivo:

- Caldo Verde Brillante (Caldo BRILA), volúmenes de 10 ml. en tubos de 150x15mm., conteniendo tubos de fermentación invertidos (75x10mm.).
- Caldo Laurilsulfato (LST), volúmenes de 10 ml. en tubos de 150x15mm., conteniendo tubos de fermentación invertidos.
- Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) o Agar Endo.

f) Material Biológico:

- Verduras (Lechuga)
- Frutas (Uvas)
- Pescado

#### IV. PROCEDIMIENTO

1. Preparar las muestras de alimentos según la técnica ya descrita para su preparación y dilución.
2. Pipetear 1ml. de cada una de las diluciones del homogenizado de alimento en tubos de caldo LTS, utilizando tres tubos por dilución.
3. Incubar los tubos a 35-37°C por 24 horas.
4. Anotar los tubos que muestren producción de gas (prueba presuntiva).
5. De cada tubo que contiene gas, transferir una asada a tubos conteniendo caldo BRILA o aislar sobre placas con agar EMB o agar Endo.
6. Incubar a 35-37°C por 24-48 horas.
7. Confirmar la presencia de bacterias coliformes por:
  - a) La formación de gas en el caldo BRILA.
  - b) La formación de colonias negras o con centro negro o la formación de las colonias mucosas rosado-naranja en agar EMB.
  - c) La formación de colonias rojas rodeadas de halo rojo en agar Endo.
8. Anotar el número de tubos confirmados. Referirse a la tabla del NMP para expresar el resultado.

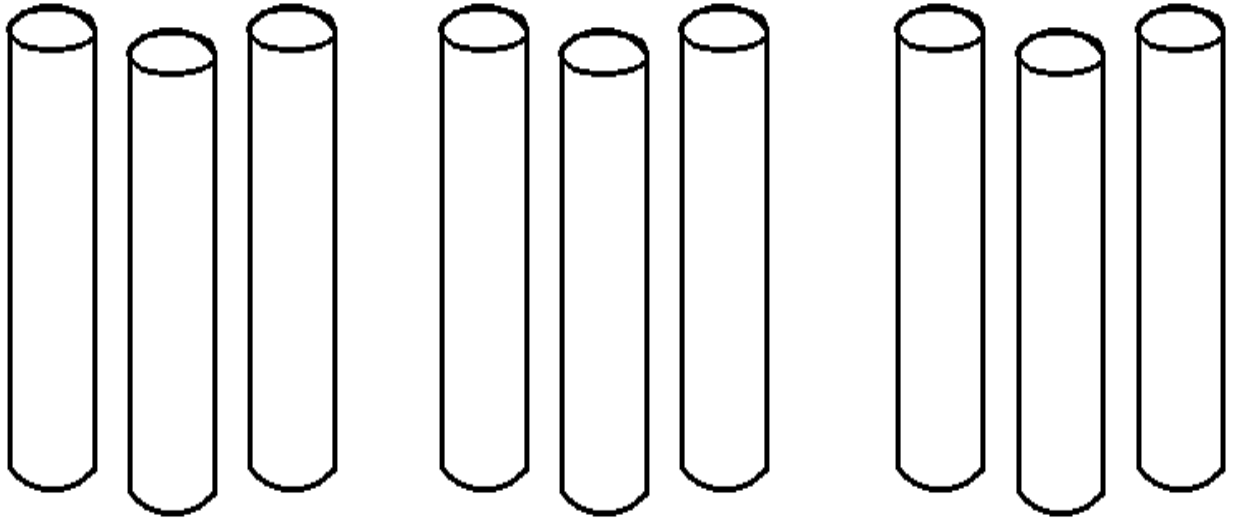
#### NUMERACIÓN DE COLIFORMES FECALES

1. Seleccionar los tubos de caldo LTS que muestren formación de gas en la prueba presuntiva.

2. Inocular una asada de cada tubo gas positivo en tubos con caldo E.C.
3. Inocular los tubos de caldo E.C. a  $44.5 \pm 0.2$  °C por 24-48 horas.
4. Los tubos de caldo E.C. que muestren formación de gas son positivos para coniformes fecales.
5. Anotar el número de tubos gas positivo y referirse a la tabla del NMP.

V. DIBUJAR LAS OBSERVACIONES (Resultados)

COLIFORMES TOTALES

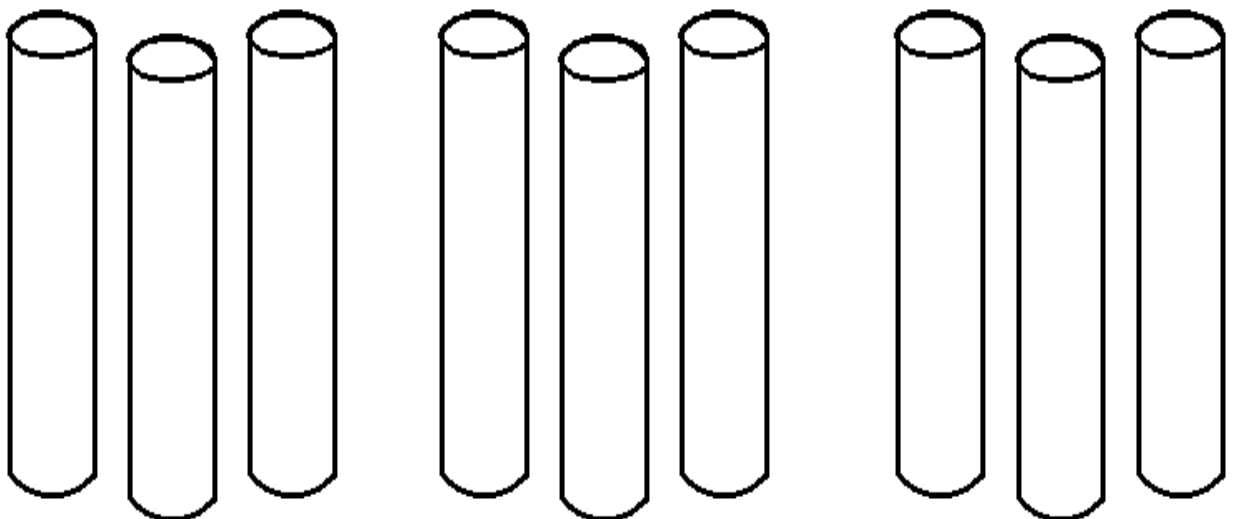


.....

.....

.....

COLIFORMES FECALES



.....

.....

.....







**CUESTIONARIO**

1. ¿Qué significa la presencia de gas en los tubos con Caldo Lauril Sulfato?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. ¿Por qué utiliza Caldo Lauril Sulfato y no un medio sólido?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

3. ¿Qué indica la presencia de gas en los tubos con Caldo BRILA?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

4. Explique a que se debió la contaminación de la muestra con Coliformes totales y Coliformes fecales?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

5. ¿Como explicaría la ausencia de gas en los tubos de prueba?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## ANEXO 1.

**Tabla N° 01:** Número Más Probable (NMP) de Bacterias. Tres tubos de cada dilución.

Números de tubos positivos en cada nivel de dilución			NMP Por gr	Límites de confianza			
Dilución $10^{-1}$	Dilución $10^{-2}$	Dilución $10^{-3}$		99%		95%	
0	1	0	3	1	23	1	17
1	0	0	4	1	28	1	21
1	0	1	7	1	35	2	17
1	1	0	7	1	33	2	28
1	2	0	11	2	44	4	35
2	0	0	9	1	50	2	38
2	0	1	14	3	62	5	48
2	1	0	15	3	65	5	50
2	1	1	20	5	77	8	61
2	2	0	21	5	80	8	63
3	0	0	23	4	177	7	129
3	0	1	40	10	230	10	180
3	1	0	40	10	290	20	210
3	1	1	70	20	370	20	280
3	2	0	90	20	520	30	390
3	2	1	150	30	660	50	510
3	2	2	210	50	820	80	640
3	3	0	200	100	1900	100	1400
3	3	1	500	100	3200	200	2400
3	3	2	1100	200	6400	300	4800

## INVESTIGACIÓN DE *Salmonella sp.* EN ALIMENTOS

### I. FUNDAMENTO TEÓRICO

El género *Salmonella* tiene varias especies que son patógenas del hombre y otros animales. Se diferencian de otros microorganismos entéricos y dentro de su género por reacciones bioquímicas, aspecto de las colonias en medios de cultivos diferenciales y por tipificación serológica.

Los microorganismos son bacilos Gram negativos que no forman esporas, miden de 0.5 a 0.7 por 1 a 3  $\mu\text{m}$ . Se mueven por flagelos peritricos. Aunque son anaerobias facultativas, se desarrollan bien en los medios de cultivo ordinarios en presencia de oxígeno.

La investigación de *Salmonella* en alimentos se basa en el uso de medios de cultivo selectivos y diferenciales así como la aplicación de la bioquímica presuntiva.

La presencia en los alimentos de cualquier tipo de *Salmonella* es potencialmente peligrosa como fuente de enfermedad para el hombre, debido a que la vía oral es virtualmente la puerta de entrada exclusiva de estas bacterias al organismo humano, sea de modo directo por el consumo de alimentos contaminados o indirectamente mediante la contaminación secundaria por utensilios o equipo utilizado en el procesamiento de alimentos.

### II. OBJETIVOS DE LA PRÁCTICA

2.1 Determinar la presencia de *Salmonella sp.* en alimentos.

2.2 Identificar la naturaleza de la contaminación.

### III. MATERIALES Y EQUIPOS

- Frascos con 225 ml. de Caldo Peptonado Bufferado o Caldo Lactosado.
- Tubos con 10 ml. de Caldo de Enriquecimiento Selenito Cistina.
- Tubos con 10 ml. de Agar Nutritivo inclinado.
- Tubos con Agar Hierro Tres Azucres (TSI).
- Tubos con solución salina (0.85% NaCl).
- Placas con Agar Salmonella-Shigella (SS)
- Placas con Agar Mac Conkey (MC)

- Agar Lisina Hierro (LIA).
- Pipetas de 1ml. graduadas al 0.1 ml.
- Pipetas de 10 ml.
- Asas y agujas de inoculación.
- Baño de agua caliente regulada a 43 +/- 0.1 °C.
- Incubadora a 35-37°C.

Material Biológico:

Carne de pollo, ensaladas, mayonesa o huevos, etc.

#### IV. PROCEDIMIENTO

##### 1. Enriquecimiento No Selectivo:

Pesar 25 g. de muestra, sembrar en 225 ml. de Caldo de Enriquecimiento, Caldo Peptonado bufferado o alternativamente en 225 ml. de Caldo Peptonado. Incubar a 35-37 °C por 18-24 horas.

##### 2. Enriquecimiento Selectivo

Llevar 1ml. del cultivo anterior a 10 ml. de caldo de Enriquecimiento Tetratonato o Selenito. Incubar a 43°C por 24 horas.

##### 3. Aislamiento en Placas de Agar Selectivo

A partir de los cultivos incubados realizar siembras por estrías sobre agar SS y sobre MC respectivamente. Incubar a 35-37°C el Agar MC durante 24 horas, y el Agar SS durante 48 horas.

Examinar las placas: Las colonias sospechosas de *Salmonella* en Agar MC son incoloras, o entre traslúcidas y opacas. En el Agar SS son pardas, grises y negras y presentan a veces un brillo metálico

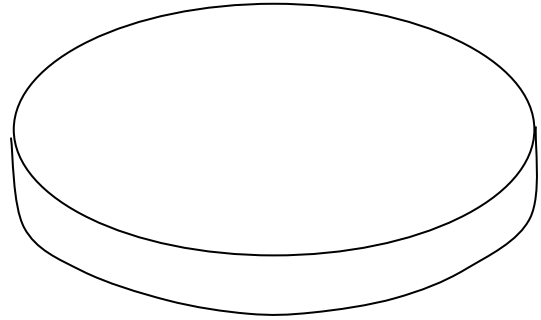
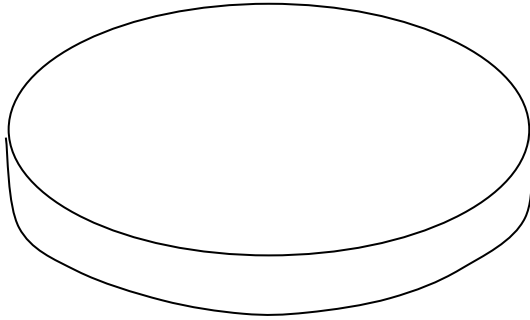
##### Pruebas Bioquímicas

- a) Elegir 2 o más colonias sospechosas de cada placa.
- b) Purificar en placas con Agar Mac Conkey.
- c) Sembrar en Agar Nutritivo inclinado. Incubar a 35-37°C por 24 horas. Comprobar la pureza de los cultivos mediante coloración GRAM. Realizar las pruebas bioquímicas de identificación de *Salmonella*.

V. DIBUJAR LAS OBSERVACIONES (Resultados)

AISLAMIENTO EN AGAR SELECTIVO: OBSERVACIONES

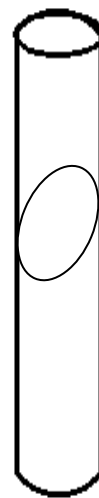
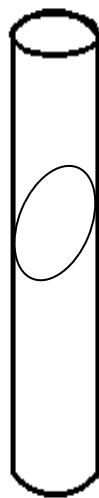
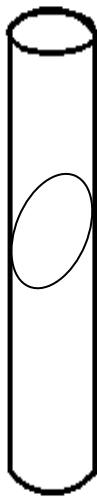
MACROSCÓPICAS



.....  
.....  
.....  
.....  
.....

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

PRUEBAS BIOQUIMICAS



TSI

LIA

INDOL

UREA





VI. DISCUSIÓN

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....



CUESTIONARIO

1. ¿Qué pruebas bioquímicas se debe realizar para la identificación de *Salmonella* sp? Explique cada una de ellas. Mencione algunas especies típicas y su actividad bioquímica.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....







3. ¿Explique las características bioquímicas que presenta *Salmonella* sp?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

4. Esquematice el diseño de práctica desarrollado en clase.



ANEXO 1

Tabla 01: Pruebas bioquímicas de identificación de *Salmonella*

PRUEBAS	MEDIOS DE CULTIVO	SIEMBRA	INCUBACIÓN	LECTURA
Investigación de beta galactosidasa	Reactivo ONPG Reactivo Ortonitrofenil –B-D-galactopiranosido	Emulsión densa en 0.25 ml. de solución salina mas una gota de tolueno . Incubar 35-37°C x minutos mas 0.25ml. de reactivo ONPG	35-37°C x 20 min. Hasta 24 horas.	Reacción Positiva: Aparición coloración franca amarilla rápidamente a los 20 min. O lentamente a 1-3 horas o más por formación de orto-nitro-fenol
Degradación de lactosa, sacarosa, glucosa y producción de H <sub>2</sub> S	TSI Agar Hierro Tres Azucares	Inoculación por puntura y estría.	35-37°C x 24 horas	<u>Parte inclinada</u> : Reacción alcalina (color rojo), lactosa y sacarosa (-). <u>Parte columnar</u> : Reacción ácida (color amarillo), glucosa positiva, con o sin producción de H <sub>2</sub> S.
Descarboxilación de la lisina	LIA Agar Lisina Hierro	Inoculación por puntura y estría.	35-37°C x 24 horas	<u>Reacción positiva</u> : Color púrpura.
Hidrólisis de la urea.	Caldo urea	Inocular el medio en forma abundante	35-37°C x 24 horas	<u>Reacción positiva</u> : Viraje del indicador al rosado intenso.
Tolerancia al KCN	Caldo Cianuro de Potasio	Inocular varias azadas a partir de un cultivo liquido (sin enturbiar el medio)	35-37°C x 24 horas hasta 4 días	<u>Reacción positiva</u> : Turbidez, incluso cuando solamente es muy débil.
Utilización del malonato y desaminación de la fenilalanina	Caldo malonato fenilalanina	Inocular el caldo de cultivo	35-37°C x 24-48 horas	Malonato: Viraje del medio del verde al azul, la reacción es positiva. APP: Acidificar el medio con HCl 0.1 N hasta color amarillo. Añadir 3 a 4 gotas de solución acuosa al 10% de cloruro férrico. La reacción es positiva, si vira al verde.

## AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE LEVADURAS PRODUCTORAS DE ETANOL

### I. FUNDAMENTO TEÓRICO

Las levaduras se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y pueden ser encontradas como parte de la flora normal del alimento, así como de verduras y frutas. Ciertas levaduras son utilizadas en la manufactura de varios alimentos, tal es el caso de algunos quesos inmaduros y fermentaciones industriales.

Las levaduras son seres de mayores dimensiones que las bacterias, también unicelulares y con formas variables (esféricas, ovaladas, cilíndricas) pueden tener de 2 a incluso 100 $\mu$  de longitud y de 2 a 10 $\mu$  de diámetro. Al igual que las bacterias, tienen núcleo, citoplasma, pared celular y membrana citoplasmática.

Dentro de las condiciones para el desarrollo de las levaduras tenemos nutrientes como hidratos de carbono, proteínas, vitaminas y sales minerales, la humedad, el pH óptimo para el desarrollo de las levaduras es de 4,5 a 5,0 aunque pueden sobrevivir desde 3 a 7,5 de pH. Son menos resistentes a los cambios bruscos de temperatura que las bacterias, ya que no aguantan temperaturas por debajo del punto de congelación, siendo 20-30°C el intervalo óptimo para su crecimiento. A los 45-47°C mueren, por lo que cuando se las quiere eliminar de cualquier alimento o bebida basta calentar a 50-60°C durante unos minutos para destruirlas. Con referencia a sus necesidades de oxígeno, las levaduras son anaerobias facultativas, es decir pueden vivir con o sin oxígeno.

Las levaduras pueden aislarse de diversas fuentes naturales como los mostos de las frutas, los néctares de algunas flores (desde donde pueden llegar al ovario y causar fermentación de los frutos deteriorándolos), de bebidas fermentadas, y de la superficie de frutas muy dulces, ya que el azúcar favorece su multiplicación.

### II. OBJETIVOS DE LA PRÁCTICA

- 2.1. Aislar levaduras productoras de etanol de diferentes frutas de la región
- 2.2. Familiarizar al alumno con las técnicas de aislamiento de las levaduras.

### III. MATERIALES Y EQUIPOS

1. Material biológico
  - Pulpa Fruta de la región en estado de pre- incubación

2. Medios de cultivo

- Agar Sabouraud glucosado

3. Reactivos

- Set de coloración GRAM
- Aceite de cedro

4. Materiales de vidrio

- Frascos de penicilina estériles
- Placas petri
- Láminas portaobjeto y cubre objeto

5. Equipos

- Microscopio óptico
- Incubadora regulada a 20-25°C

6. Otros

- Asa bacteriológica
- Mechero de alcohol
- Alcohol
- Algodón
- Encendedor o fósforos

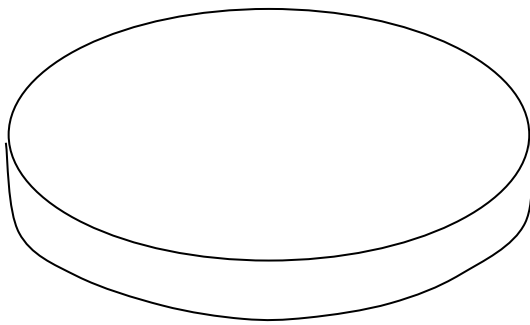
#### IV. PROCEDIMIENTO

1. En un frasco de vidrio de boca ancha estéril, colocar la pulpa molida o licuada de frutas de la región (licuar sin agua).
2. Dejar incubar a 37 ° C por 2 a 3 días.
3. Sembrar por estrías con ayuda de un asa bacteriológica en Agar Sabouraud e incubar a 37°C por 24 horas.
4. Realizar la lectura de placas sembradas y verificar las colonias de levaduras realizando una observación en fresco con KOH al 10%. Observar al microscopio e identificar las colonias típicas de levaduras.

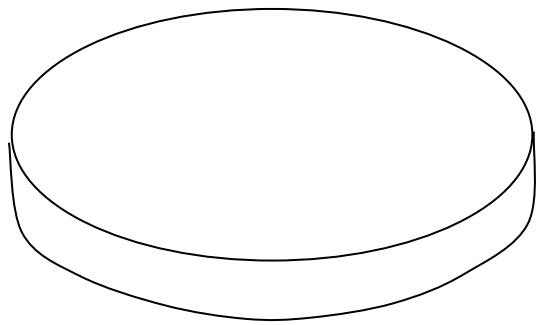
5. Realizar una coloración GRAM. Dibujar.
6. Una vez identificadas las colonias de levaduras y la pureza de las mismas.
7. Repicarlas en Agar Sabouraud por estrías y en agar sabouraud inclinado.
8. Estas colonias serán utilizadas en la práctica posterior de evaluación de la capacidad fermentativa de las levaduras.

V. DIBUJAR LAS OBSERVACIONES (Resultados)

Características de las colonias de levaduras

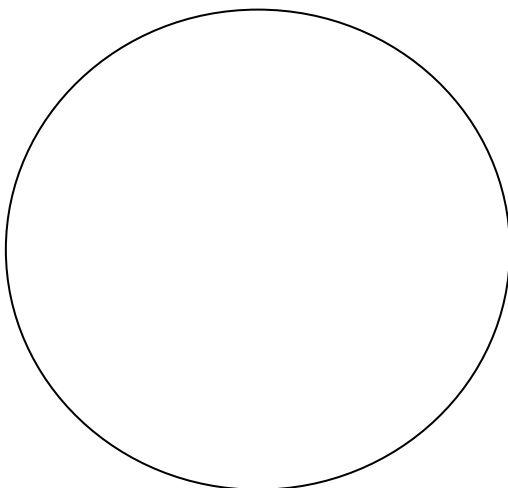


.....  
.....  
.....  
.....  
.....



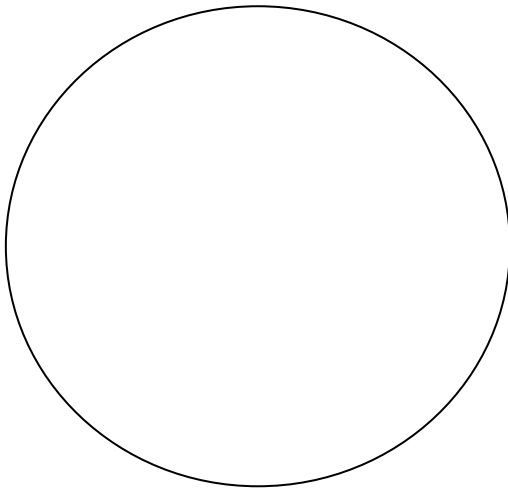
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Observación microscópica (KOH 10%)



.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Observación microscópica (GRAM)



.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Siembra en Agar inclinado para su conservación



.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....



.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

CUESTIONARIO

1. Explique porque se lleva a cabo la coloración GRAM.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. ¿Qué otro método puede utilizar para el aislamiento de las levaduras adicional al utilizado en práctica?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....



.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

3. Realizar el esquema de aislamiento de levaduras que utilizaste en práctica.

4. ¿Cómo podría evitar el crecimiento de bacterias contaminantes durante el aislamiento de levaduras?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

5. ¿Qué tratamiento le daría a un cultivo de levaduras cuya coloración GRAM, indica la presencia de bacterias?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

## EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FERMENTATIVA DE LAS LEVADURAS

### I. FUNDAMENTO TEÓRICO

La fermentación alcohólica es un proceso anaeróbico realizado por las levaduras, básicamente pero también lo pueden realizar algunas bacterias. De la fermentación alcohólica se obtienen muchos productos como: vino, cerveza, alcohol, etc.

Las levaduras son microorganismos unicelulares, que consiguen su energía por medio de la fermentación alcohólica, en la que rompen las moléculas de glucosa para obtener la energía para sobrevivir y producen el alcohol como consecuencia de la fermentación.

Cuando el medio es rico en azúcar, la transformación de la misma en alcohol hace que llegada una cierta concentración las levaduras no pueden sobrevivir en tal medio. Aunque hay distintos tipos de levaduras con diferentes tolerancias, el límite suele estar en torno a los 14 o de alcohol para las levaduras del vino, por ejemplo.

Las levaduras fermentativas se pueden clasificar en tres grandes grupos con relación a su influencia dentro de este proceso:

Levaduras de inicio de fermentación, se trata generalmente de levaduras apiculadas, es decir con forma de limón, que tienen un bajo poder fermentativo (hasta 4-5% vol.)

Levaduras de poder fermentativo medio alto, una vez que han superado los 4-5% vol. De alcohol, otras especies de levaduras dominan el proceso como es el caso de *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, etc.

Levaduras de elevado poder fermentativo, al alcanzar los 10-11% vol. De alcohol, hay otras especies de levaduras que comienzan a ejercer su predominio debido a que gozan de un elevado poder fermentativo como son *Saccharomyces oviformes*, etc.

La capacidad de los microorganismos para provocar cambios físicos y químicos en ciertos compuestos orgánicos se usa varias industrias para la fabricación de determinados productos. Las levaduras son los microorganismos más importantes

y los de mayor uso en la industria, el uso de las levaduras para la producción de bebidas alcohólicas es un proceso antiguo. La mayor parte de los jugos de frutas sufren una fermentación natural causada por las levaduras silvestres que existen en las frutas. A partir de estas fermentaciones naturales se pueden seleccionar levaduras para producción más controlada y a mayor escala.

Las cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* tiene uso tanto en panadería como en la industria cervecera. En cervecería, es preferida una verdadera fermentación y los productos deseables son el alcohol y en menor cantidad el CO<sub>2</sub>, como se describe en la ecuación:



A partir de esta ecuación, se puede calcular en forma indirecta la producción de alcohol por *S. cerevisiae* en ausencia de oxígeno, esto es, midiendo la cantidad de CO<sub>2</sub> producido y luego estequiométricamente la cantidad de alcohol.

El rendimiento teórico de 1 g de glucosa es de 0,51 g de etanol y 0,49 g de CO<sub>2</sub>, aproximadamente el 10% de la glucosa se transforma en biomasa y el rendimiento en etanol y CO<sub>2</sub> alcanzan al 90% del valor teórico. Por eso hay un cierto interés en utilizar levaduras tolerantes a elevadas cantidades de alcohol en los procesos de fabricación de cerveza de elevada gravedad y en la producción de alcohol incrementando la productividad y reduciendo costos de destilación.

## II. OBJETIVOS DE LA PRÁCTICA

- 2.1. Seleccionar las levaduras de mayor capacidad fermentativa, teniendo en cuenta la producción de CO<sub>2</sub> durante la fermentación de los azúcares.
- 2.2. Construir correctamente un sistema para la selección de levaduras productoras de etanol.

## III. MATERIALES Y EQUIPOS

### 3.1. Material biológico:

- Cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*, aislados en la práctica.

### 3.2. Medios de cultivo:

- Caldo sabouraud sacarosado
- Solución azucarada bufferada

3.3. Reactivos:

- Solución de cloruro de sodio al 23%.
- Azul de metileno.

3.4. Material de vidrio:

- Probetas de 50 ml
- Tubos de ensayo 15 x 100
- Pipetas de 10 ml
- Placas petri
- Vasos de precipitación de 1000 ml o recipientes de vidrio

3.5. Equipos:

- Balanza de precisión
- Centrífuga
- Estufa regulada a 30°C

3.6. Otros:

- Agua destilada
- Asas bacteriológicas
- Equipos de venoclisis
- Hipodérmicas
- Parafina

IV. PROCEDIMIENTO

- Sembrar los cultivos de levaduras en placas de Agar Sabouraud, e incubar a 30°C durante 24 a 48 horas.
- Cosechar los cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* en 10 ml de Solución salina fisiológica (SSF) estéril y colocar en tubos de centrífuga estériles y previamente tarados. Centrifugar a 3000 rpm durante 15 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento en SSF.
- Repetir los pasos anteriores por una vez más.
- Desechar los sobrenadantes y determinar el peso húmedo de los sedimentos.
- Obtener la biomasa de levadura restando el peso de los tubos de centrífuga.

- Resuspender los sedimentos en 20 ml de solución azucarada bufferada e inocular en los bulbos de los equipos de venocllisis, empleando las hipodérmicas estériles. Enseguida cubrir los orificios con parafina.
- Introducir el extremo libre del equipo de venocllisis en una bureta invertida dentro de un recipiente que contiene la solución de NaCl con azul de metileno para captar el CO<sub>2</sub> liberado. (Ver esquema).
- Dejar el sistema al medio ambiente por 3 horas, midiendo a cada hora los ml de CO<sub>2</sub> dentro de la bureta.
- Calcular la producción de etanol empleando la fórmula:

$$\frac{P1. V1}{T1} = \frac{V2}{T2}$$

Sabiendo que en condiciones normales para producir 1 mol de CO<sub>2</sub>:

$$V = 22,4 \text{ L}; \quad P = 1 \text{ atm}, \quad T^{\circ} = 273^{\circ}\text{K}$$

$$\text{N}^{\circ} \text{ moles de CO}_2 = \text{N}^{\circ} \text{ moles de etanol}$$

$$\text{N}^{\circ} \text{ moles} = W \text{ (g)} / \text{PM}$$

- Expresar los resultados en gramos de etanol por gramo de levadura por hora.
- Repicar los cultivos hiperproductores en Agar Sabouraud inclinado e incubar a 35-37 °C durante 24 horas.
- Codificar y conservar los cultivos en refrigeración.

## V. RESULTADOS

Completar la siguiente tabla, donde indica la biomasa utilizada, el volumen de CO<sub>2</sub> y la productividad de etanol de las levaduras aisladas por cada mesa de trabajo.

**Tabla 1: Productividad de etanol de las levaduras seleccionadas.**

MESA	PESO DE BIOMASA (g)	VOLUMEN DE CO <sub>2</sub> (ml)	PRODUCTIVIDAD (g etanol/g levadura/hora)
1			
2			







CUESTIONARIO

- 1. Discutir con fundamento teórico y bibliográfico los resultados obtenidos en la práctica.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....



3. Mencione que condiciones debería tener en cuenta para que los resultados obtenidos en práctica sean los correctos.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

4. ¿Qué entiende por cosechar las levaduras? Explique.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

5. Desarrollar los cálculos de productividad de etanol.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

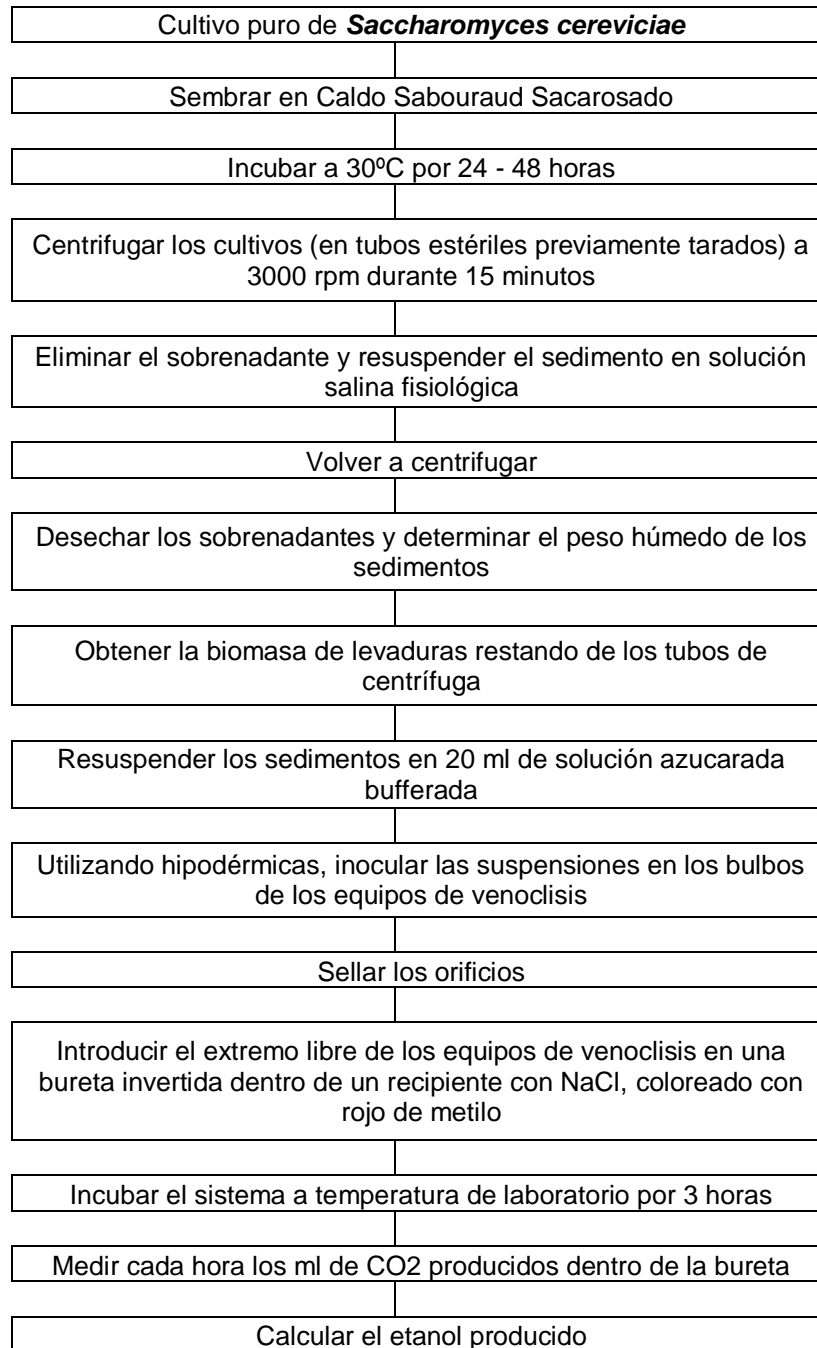
.....

.....

.....



ANEXO 1. DIAGRAMA DE FLUJO

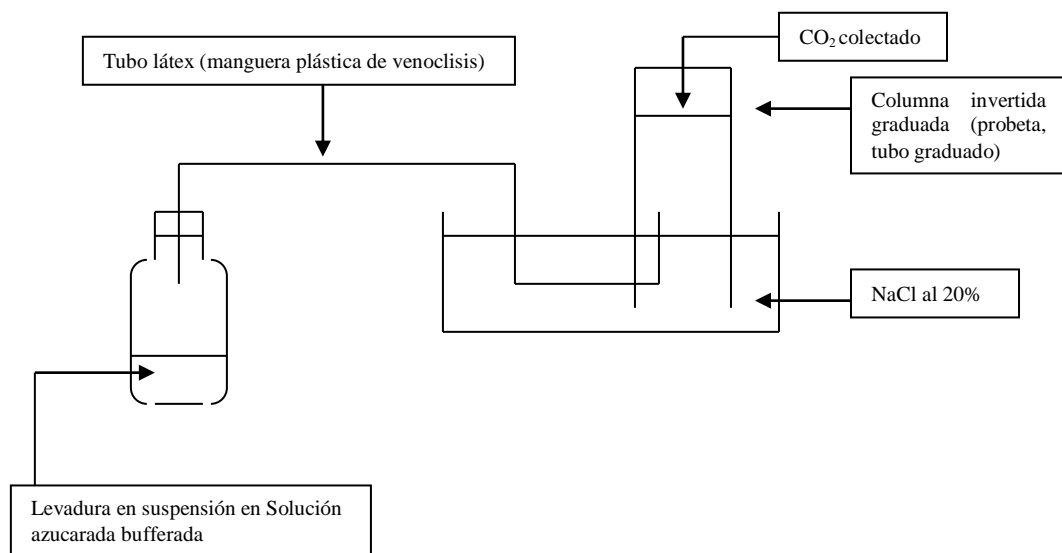


## ANEXO 2. SOLUCIÓN DE AZÚCAR BUFFERADA (SAB)

- Sacarosa	10g
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.8g
- $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.4g
- $\text{MgSO}_4$	0.1g
- $\text{CaSO}_4$	0.8g
- $\text{H}_2\text{O}$ destilada	$160\text{cm}^3$

SOLUCIÓN DE  $\text{NaCl}$  AL 23% coloreada con unas gotas de rojo de metilo.  
(Aprox. 1 litro).

## ANEXO 3. ESQUEMA DEL DISPOSITIVO DE FERMENTACIÓN



## AISLAMIENTO DE HONGOS: MICROCULTIVO

### I. FUNDAMENTO TEÓRICO

Los mohos y levaduras son hongos y se definen como organismos heterotróficos que están integrados por filamentos conocidos como hifas, están desprovistos de clorofila. Por lo general son multicelulares, no poseen raíces ni tallos, ni hojas y su tamaño y forma varían desde el de una levadura microscópica de una sola célula, hasta el de un champiñón o una seta multinucleada gigante.

Los hongos son organismos multicelulares, compuestos por células individuales que tienen las mismas características que las bacterias y levaduras, es decir, poseen un núcleo central envuelto por el citoplasma, una membrana semipermeable que asegura el intercambio de células con el exterior y una pared celular rígida. A veces los núcleos están incluidos varios de ellos en una masa citoplasmática sin separaciones.

Se reproducen por fisión, gemación o por medio de esporas en estructuras fructificantes que son absolutamente distintivas de determinadas especies.

No existen en el mundo, organismos que no estén o hayan estado bajo la influencia de los hongos. Estos pueden estar asociados como saprofitos, parásitos o como vectores de enfermedades. Así podemos encontrarlos creciendo sobre materia orgánica en descomposición, parasitando a invertebrados y vertebrados, así como sobre algas y plantas superiores en donde son causantes de serios estragos en la producción. Son de importancia los mohos, levaduras y hongos patógenos en plantas llamados royas y carbones.

La industria farmacéutica utiliza los hongos para la obtención de antibióticos a partir de especies del género *Penicillium* y *Aspergillus*. En el sur de México los hongos son utilizados en el arte culinario, empleándose especies del género *Russula*, *Lactarius*, *Boletus*, etc. Actualmente se ha incrementado en México el cultivo de hongos silvestres comestibles, principalmente *Pleurotus ostreatus* y *Lentinus edodes*.

Para estudiar los mohos y levaduras se usan los mismos métodos generales de cultivo que para las bacterias. Casi todos, se desarrollan en condiciones de aerobiosis en los medios de cultivo bacteriológicos usuales, a temperaturas que varían entre 20 a 30°C. La mayor parte lo hacen más lentamente que las bacterias,

y así, cuando llegan a coexistir, el desarrollo de éstas sobrepasa con creces el de los mohos.

Si se quiere aislar los mohos, resulta muy práctico usar un medio de cultivo que favorezca su desarrollo pero que no sea óptimo para las bacterias. Medios ácidos (pH 5.6) con concentraciones relativamente elevadas de azúcar son tolerados bien por los mohos pero inhiben muchas bacterias.

Hay tres tipos generales de medios de cultivo para los mohos:

Medios naturales, como pedazos o infusiones de frutas, vegetales, granos de cereales o tejidos animales. Estos medios varían mucho en su composición y no son fácilmente reproducibles. Tampoco son de amplio uso.

Medios de cultivo preparados con peptonas, extractos de plantas, agar y otros compuestos de composición desconocida o variable.

Medios de cultivo sintéticos de composición química definida.

Un medio natural de amplio uso para el cultivo de los hongos es una infusión de maíz al que se le adiciona agar y glucosa. Otro medio de cultivo para los mohos y levaduras contiene infusión de papa con agar y glucosa.

Muchas formulas de los medios de cultivo para los mohos y levaduras contienen peptona, algún carbohidrato y agar; en cambio los medios para los hongos patógenos necesitan ser enriquecidos con otras sustancias.

Uno de los medios de cultivo mas conocido y antiguo para cultivar hongos lo practicó Sabouraud y contiene maltosa y peptona como ingredientes principales, pero fue modificado y ahora se usa uno que sólo contiene glucosa. Este medio se utiliza mucho para aislar mohos y ciertas levaduras. Su acción selectiva parcial se debe a su alta concentración de azúcar y bajo pH.

La reunión de diversas formas de todas estas células constituye un micelio, que puede ser tan grande que llega a verse incluso a simple vista. Un micelio tiene varias ramificaciones o hifas en cuyos extremos se desarrollan las esporas que pueden quedar protegidas (esporangios) o al exterior (conidias). Las esporas se pueden formar también en una célula cualquiera del micelio, que se cubre de una espesa y rígida pared (clamidosporas).



Dentro de los mohos más comunes en la alimentación tenemos: *Aspergillus*, *Botrytis*, *Oidium*, *Rhizopus*, *Penicillium*. *Aspergillus* lo podemos encontrar en frutas, carnes, pasteles, etc. Produciendo sobre su superficie coloraciones amarillentas y verdosas producidas por las conidias sin protección que se encuentran en los extremos de sus hifas. Producen una podredumbre negra o atizonado (*Aspergillus niger*) en melocotones, cerezas, manzanas, etc.

El *Botrytis cinerea*, es un moho blanco que puede aparecer sobre la superficie de algunos alimentos (quesos) y sobre la margarina. El *Rhizopus* es un moho con esporas de color negro y se presenta en el pan, frutas, etc. El *Penicillium*, produce la podredumbre blanda de las frutas, encontrándose en otros muchos alimentos. Contribuye a la maduración de ciertos quesos. Así tenemos: *Penicillium roqueforti*, que produce la típica pasta azul del queso roquefort y similares; *Penicillium camemberti*, que produce la consistencia blanda de los quesos camembert. Los mohos *Penicillium* tienen una gran capacidad para desdoblar grasa en proteínas. La oospora lactis o moho de la leche produce enranciamiento en la mantequilla.

Dentro de los factores que controlan el desarrollo de los mohos, como en el caso de las levaduras y bacterias, tenemos la presencia de nutrientes, como el azúcares, proteínas, sales, etc; la humedad, temperatura óptima entre 20 – 30°C, oxígeno y una acidez óptima entre 4,5 – 5 de pH.

Cuando se quiere identificar al hongo, se procede a aislar las células respectivas en láminas portaobjetos estériles conteniendo una capa fina de agar sabouraud, agar papa dextrosa o agar oxitetraciclina glucosa, sobre la que se inocula el hongo a estudiar. Esta técnica es llamada microcultivo en cámara húmeda.

## II. OBJETIVOS DE LA PRÁCTICA

- 2.1. Identificar hongos de importancia en la contaminación de alimentos y daño en cultivos de importancia agroindustrial, mediante la técnica del microcultivo en cámara húmeda.
- 2.2. Familiarizar al alumno en las técnicas de aislamiento de hongos.

### III. MATERIALES Y EQUIPOS

1. Muestra:
  - Muestras de vegetales con lesiones micóticas
  - Alimentos contaminados con hongos.
  - Productos post cosecha con aparente lesión micótica.
  
2. Medios de cultivo:
  - Agar Sabouraud (AS)
  
3. Reactivos, colorantes y soluciones:
  - Agua destilada estéril
  - Lejía
  - Azul de lactofenol
  - KOH al 10%
  - Lactofenol
  - Aceite de cedro
  
4. Material de vidrio:
  - Placa petri estéril
  - Lámina y laminilla estéril
  - Varilla de vidrio estéril
  
5. Equipo:
  - Microscopio de campo claro
  
6. Otros:
  - Asa micológica
  - Navajas estériles o de primer uso
  - Pinzas estériles

### IV. PROCEDIMIENTO

- Las muestras de frutos y hojas serán examinadas, realizando:
  - a. Aislamiento de hongos de la parte externa de los frutos: Con la ayuda del asa flameada se extraerán muestras de la lesión, las que serán

sembradas en Agar Sabouraud. Incubar a Temperatura ambiente hasta observar el crecimiento característico de una colonia de hongos.

b. Aislamiento de hongos de la parte interna de los frutos: Los frutos enfermos serán lavados con agua de caño. Realizar cortes de tejido afectado con ayuda de un bisturí de primer uso y en condiciones de esterilidad, estos cortes deben de ser de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>. Esto con la finalidad de acceder a la parte interna de la lesión. y luego desinfectados superficialmente con lejía al 10%. Enjuagar con agua destilada estéril por lo menos 4-5 veces para eliminar el exceso de desinfectante. Sembrar dichos cortes en Agar Sabouraud. Colocarlos de manera equidistante por lo menos 4-5 cortes de tejido lesionado. Incubar a T° ambiente de 3-5 días. Anotar las características macroscópicas y microscópicas.

c. Aislamiento de hongos a partir de hojas: Seguir lo descrito en el punto anterior.

d. Para la identificación microscópica del hongo, se procede a realizar microcultivos en cámara húmeda, donde se coloca una capa fina de agar sabouraud en una lámina portaobjeto estéril, y sobre el se inocula el hongo a estudiar, luego se cubre con una lámina cubreobjetos estéril.

Convenientemente acomodado en el interior de una placa petri estéril, se incuba a 22°C o al medio ambiente por 3 – 5 días. Al cabo de un tiempo de incubación, se observa el hongo al microscopio, tratando de ver en forma minuciosa la forma, estructura, sus esporas y forma de acomodamiento de éstas, para poder identificarlo.

Una vez que ya se observan formas características del hongo se retira la laminilla cubreobjeto y se coloca en otra lámina portaobjeto con una gota de azul de lactofenol y previo sellado con bálsamo de Canadá o esmalte de uñas transparente por los bordes de la laminilla. Conservar dichas láminas montadas. Observarlas al microscopio y graficar.

- Características morfológicas macroscópicas y microscópicas de algunos de los géneros y especies de hongos:

a. *Saprolegnia sp*: Micelio abundante, ligeramente pardo.

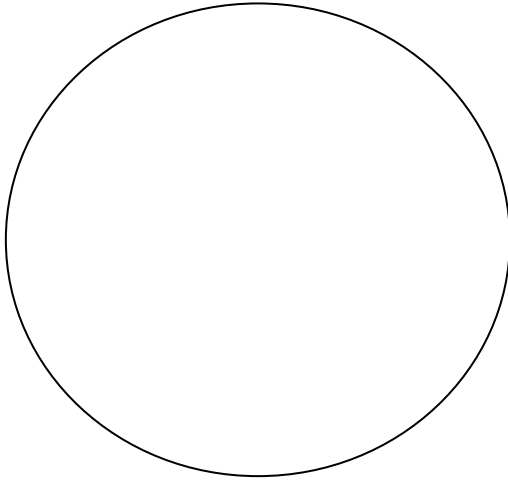
Hifas cenocíticas con zoosporangios terminales separados claramente por un septo transversal.

- b. ***Rhizopus sp***: Colonias con micelio algodonoso, abundante, ligeramente pardo con muchos esporangios de color negro. Presenta hifas cenocíticas rizoides, esporangióforos terminales no ramificados con esporangios globosos de color que contienen a las esporangiosporas.
- c. ***Erysiphe sp***: Colonia blanca pulverulenta que cubre la mayor parte de la superficie de la hoja. Conidióforo corto, no ramificado y sobre el, se forman los oidios o artrosporas (Fase asexual)
- d. ***Ustilago maydis***: En la mazorca se observan granos deformes, gigantes, algunos de color negro que liberan un polvo del mismo color. Polvo negro corresponde a las teliosporas que son unicelulares de forma esférica, color marrón y de superficie equinulada.
- e. ***Alternaria sp***: Colonia de color verde oscuro con abundante micelio algodonoso. Hifas septadas de color verde oscuro con cadenas de conidios del mismo color de aspecto claviforme, con septos transversales y longitudinales.
- f. ***Cladosporium sp***: Colonia compacta aterciopelada de color verde claro. Hifas septadas y oscuras, conidios bicelulares en cadenas dispuestos en conidióforos ramificados arborescentes.
- g. ***Geotrichum sp***: Colonia blanda de color blanco con micelio adherido al medio de cultivo. Hifas cortas que se fragmentan rápidamente en artrosporas.
- h. ***Penicillium sp***: Colonia con micelio blanco pegado al medio, con abundante cantidad de esporas que le dan el aspecto pulverulento de color verde.
- i. ***Fusarium sp***: Colonia blanca, algodonosa que presenta un color anaranjado en la base de la colonia. Macroconidias con tres septos, en forma de media luna.

V. DIBUJAR LAS OBSERVACIONES (Resultados)

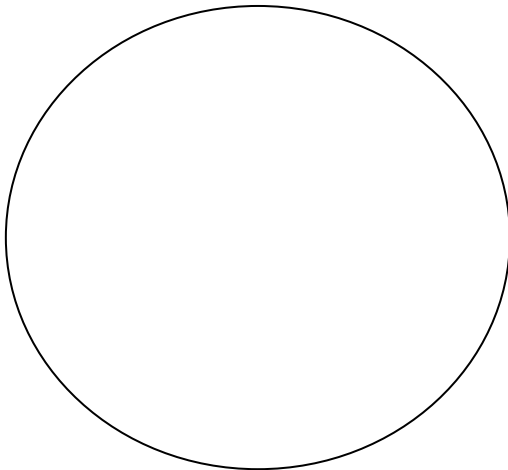
OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS

Género de hongo: .....



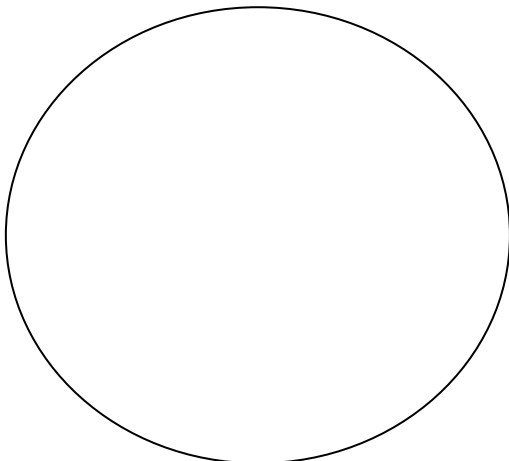
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Género de hongo: .....



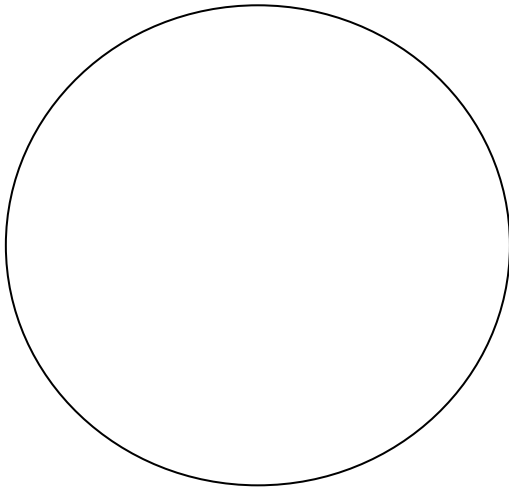
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Género de hongo: .....



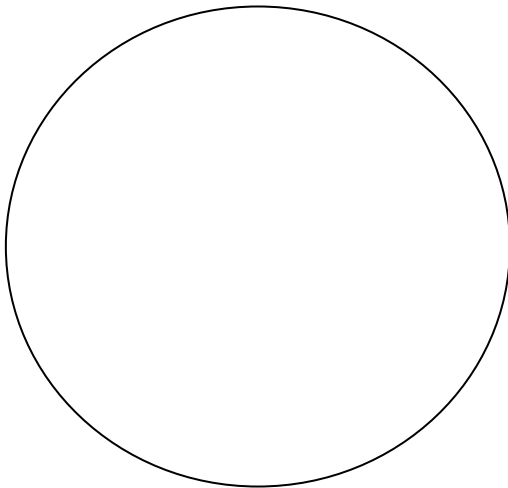
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Género de hongo: .....



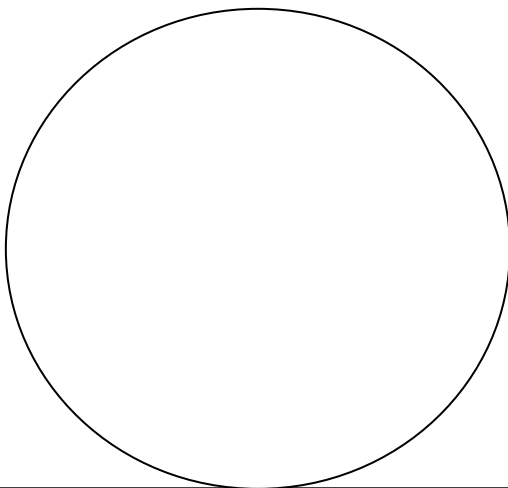
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Género de hongo: .....



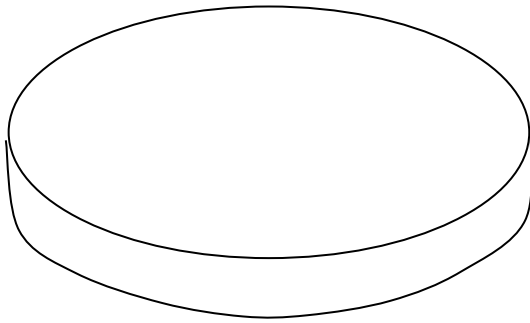
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Género de hongo: .....

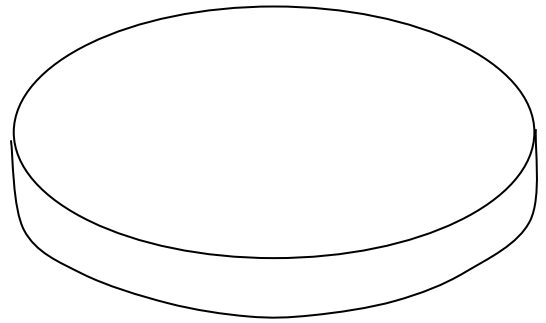


.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

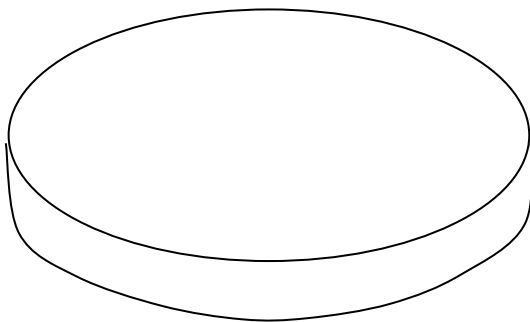
OBSERVACIONES MACROSCÓPICAS



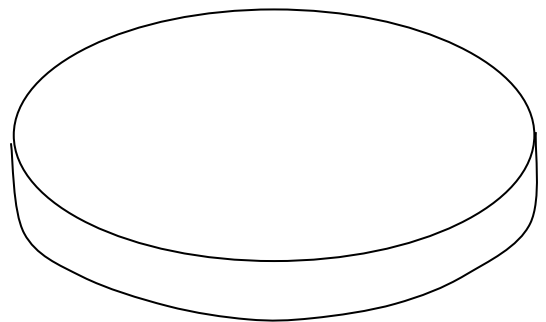
.....  
.....  
.....  
.....  
.....



.....  
.....  
.....  
.....  
.....



.....  
.....  
.....  
.....  
.....



.....  
.....  
.....  
.....  
.....

















## ELABORACIÓN DE YOGURT NATURAL Y FRUTADO

### I. FUNDAMENTO TEÓRICO

La biotecnología alimentaria la podríamos definir como el conocimiento y la utilización de los microorganismos para producir más y mejores alimentos. Aunque es muy reciente el uso de la palabra biotecnología en la industria alimentaria, hace muchos miles de años que se utilizan por el hombre los microorganismos para la obtención de determinados alimentos y bebidas. Hay unos ejemplos muy clásicos y conocidos por todos: - Proceso de fermentación del mosto de uva en vino; - Acidificación de la leche para obtención del yogurt (Madrid, A y Madrid, J; 2001).

El yogurt, yogur, yogurth, yoghurt ó yoghurth es una de las leches fermentadas más antiguas que se conocen. Desde tiempos muy remotos ha sido un producto alimenticio de importancia de los pueblos del lejano oriente. Debido a las publicaciones de Metchnikoff a principios del siglo pasado, en las que se relacionaba al yogurt con la larga y saludable vida, su consumo creció rápidamente en Europa y se difundió a muchas partes del mundo.

La legislación define el yogurt como el producto de la leche coagulada obtenida por fermentación láctica mediante la acción de los microorganismos, a partir de la leche pasteurizada, nata pasteurizada, leche concentrada, leche parcial o totalmente desnaturalizada y pasteurizada, con o sin adición de leche en polvo.

La leche concentrada o enriquecida con leche en polvo hasta aumentar su extracto seco en un 2-2,5% es pasteurizada a 85-90°C, temperatura que se mantiene durante uno a diez minutos. La leche es inoculada con un cultivo de fermentos lácticos en una proporción del 1,5-3%. El yogurt debe tener mínimo del 2,0% de materia grasa y un extracto seco magro del 8,5%. Cuando se trata de yogurt desnatado el contenido en grasa no pasará del 0,5% y un extracto seco magro mínimo del 8,5%.

Las bacterias lácticas son muy abundantes en la naturaleza y en los alimentos (carnes, vino, helados, leche, quesos, embutidos, etc.). Se les llama así por que en sus productos metabólicos figura el ácido láctico. Toman el azúcar de los alimentos y los transforman en: Ácido láctico y otros ácidos (acético), hidrógeno,

CO<sub>2</sub> y energía. Son tanto bacilos como cocos, pero no tienen la propiedad de formar esporas. Son anaerobias facultativas y son destruidas por el calor a una temperatura de 72-75°C durante 15-20''. Entre los más importantes podemos destacar: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, que son utilizables en combinación para la elaboración de yogurt a partir de leche, a base de añadirle cultivos de estos microorganismos a una temperatura de 42-45°C, que es mantenida de 5 -7 horas, alcanzándose un pH final de 4,5. Estos microorganismos transforman la lactosa o azúcar de la leche en ácido láctico.

Las investigaciones acerca del yogurt se iniciaron con los estudios hechos por Freudenreich (1890), quien aisló y estudió a los microorganismos de la leche fermentada, aportando conocimientos de las bacterias del ácido láctico. Posteriormente por los estudios realizados por otros investigadores se concluyó que el yogurt es producido por la acción de dos bacterias, cuyo crecimiento es asociado y simbiótico.

En el producto final los microorganismos deben estar viables y en cantidades convenientemente abundantes. Dentro de los análisis microbiológicos recomendados para el yogurt, tenemos: Recuento de coliformes, determinación de *Escherichia coli*, determinación de *Staphylococcus aureus*, determinación de *Streptococcus* del grupo D de Lancefield, determinación de bacterias sulfito reductoras y determinación de hongos.

A nivel industrial se preparan tres tipos de yogurt: Aflanado o firme, batido y líquido. En la actualidad en el Perú, el tipo de yogurt que se comercializa en mayor proporción, es el yogurt batido.

## II. OBJETIVOS DE LA PRÁCTICA

2.1.Familiarizar al alumno con el protocolo de la elaboración de yogurt.

2.2.Producir yogurt natural y frutado.

## III. MATERIALES Y EQUIPOS

### 2. Material Biológico

- Cultivo mixto de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus termophilus*
- Leche fresca de vaca
- Frutas frescas o en conserva



3. Reactivos

- Cloruro de calcio
- Azúcar comercial

4. Equipos e instrumentos

- Balanza analítica
- Balanza de platillo
- Baño maría
- Estufa
- Biorreactor de 20 litros
- Cocina eléctrica
- Lactodensímetro
- Refrigeradora

5. Material de vidrio

- Beacker de 1 litro
- Matraz de 1 litro
- Mechero
- Probeta de 500 ml
- Bagueta gruesa

6. Otros

- Algodón
- Bandejas de plástico
- Papel metálico
- Vasos descartables de primer uso.

IV. PROCEDIMIENTO

1. Evaluación de la Materia prima

Para elaborar un yogurt de buena calidad, es condición elemental que la materia prima en este caso la leche cruda, sea de buena calidad. Como requisitos válidos de una leche de buena calidad, se considera:

- Tener baja cantidad de microorganismos
- Provenir de animales sanos y estar libre de gérmenes patógenos
- Ser fresca
- Ser pura, es decir libre de antibióticos, pesticidas, desinfectantes, etc.
- Tener olor y sabor sui géneris.

## 2. Estandarización

La estandarización de la leche se hace del contenido de materia grasa y de los sólidos no grasos, con la finalidad de darle uniformidad al producto final. Se puede disminuir o adicionar crema hasta un porcentaje deseado. También es posible adicionar sólidos no grasos.

## 3. Homogeneización

Este paso se realiza entre 60 y 75°C con la finalidad de evitar la separación de la crema y obtener una mezcla uniforme, incrementar la viscosidad y disminuir el posible sabor a oxidado que puede tener el producto final.

## 4. Tratamiento térmico (Pasteurización)

El tratamiento térmico se puede realizar por pasteurización a 85°C por 10 minutos o 90°C por 5 minutos. Alternativamente se puede usar pasteurización lenta a 80°C por 30 minutos. Es recomendable realizar esta etapa en los recipientes de fermentación.

## 5. Enfriamiento

Culminado el tratamiento térmico, se procede a enfriar la leche hasta 42°C, de esta manera queda lista para ser inoculada con las bacterias lácticas.

## 6. Inoculación

La inoculación se hace después del tratamiento térmico, previo enfriamiento a 42°C. Se agrega 4ml de inóculo para 1 litro de leche. A nivel industrial es recomendable hacer rotación de cultivos, con la finalidad de evitar estos problemas de contaminación.

## 7. Fermentación o incubación

La incubación se realiza entre 42 a 44°C, que es la temperatura óptima para los cultivos lácticos empleados. El tiempo varía de 2 a 6 ½ horas, según la cantidad de inóculo utilizado. En esta etapa se suplementa con sales de calcio.

El proceso de fermentación debe ser monitoreada adecuadamente; es necesario medir el pH, controlar la temperatura de incubación, chequear la formación del coágulo y evitar la formación de suero.

8. Agitación y enfriamiento

Culminada la fermentación se agita mecánicamente y en forma inmediata se enfría a 25°C.

9. Adición de frutas.

Si se desea hacer yogurt frutado, se puede adicionar fruta picada, licuada o previamente tratada. Esta adición se hace, en esta etapa del proceso, en el caso de yogurt batido. En la preparación de yogurt firme o aflanado, se hace después de la inoculación.

A nivel industrial se pueden adicionar, colorantes, saborizantes y conservadores certificados.

10. Envasado

El envasado se hace, después del enfriamiento, en condiciones de asepsia. Se deben usar vasos descartables de primer uso, se sellan con papel metálico y se colocan inmediatamente en refrigeración, aproximadamente a 6-8°C.

11. Almacenamiento

El almacenamiento debe hacerse preferentemente en refrigeración, aún durante la distribución y venta. Los cambios bruscos de temperatura alteran la calidad del producto.

V. DIBUJAR LAS OBSERVACIONES (o anotar los resultados)







## CUESTIONARIO

1. Realizar un diagrama de flujo para la elaboración del yogurt.

2. Elaborar un cuadro donde indique la composición química de la leche de diferentes especies.

3. ¿Cuál es la finalidad de utilizar cultivos mixtos en la elaboración del yogurt?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....



4. Qué consideraciones se debe tener en cuenta al reactivar un cultivo liofilizado de bacterias lácticas?

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

5. Es necesario esterilizar la leche para la preparación del inóculo? Fundamente su respuesta.

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

## ELABORACIÓN DE VINO

### I. FUNDAMENTO TEÓRICO

Los microorganismos se encuentran presentes en el aire, agua, suelo, plantas, animales, etc; y su desarrollo, crecimiento y reproducción depende de ciertos factores, como son la posibilidad de encontrar un sustrato que les proporcione los nutrientes necesarios (proteínas, hidratos, sales), temperaturas adecuadas y humedad suficiente. Las bacterias aunque extendidas por toda la tierra, son muy frecuentes en el agua, mientras que las levaduras son poco comunes en medios acuosos, estando presentes en el suelo, sobre la cubierta de los frutos, hojas, etc.

En la industria alimentaria hay muchos ejemplos de utilización de levaduras con fines productivos. Por ejemplo: las levaduras presentes en el hollejo de las uvas son las que convierten el mosto en vino, ya que transforman la glucosa en alcohol, CO<sub>2</sub> y energía. Generalmente, el término vino hace referencia al producto fermentado del mosto de uva. En nuestro medio los términos vino/uva están estrechamente ligados. Cuando se hace referencia al vino preparado a partir de otros frutos diferentes a la uva, si carece de nombre propio, se hace mención del fruto usado, por ejemplo: vino de fresa, vino de piña, vino de mango, vino de ciruela, etc. En el caso del vino de manzana, se comercializa con el nombre de sidra.

Según el código sanitario de alimentos, se denomina vino, a todo producto genuino obtenido por la fermentación normal, además, considera que debe ser madurado en bodega; es esencial que se obtenga por fermentación y que contenga alcohol. Sin embargo, es de conocimiento general, que por intereses estrictamente económicos, se fabrican “vinos” mezclando una serie de ingredientes sin ningún control sanitario, perjudicando la salud de los consumidores.

La fermentación se desarrolla a una temperatura de 26-30°C para los vinos tintos y de 12-20°C para los vinos blancos para lo que es necesario eliminar parte del calor que se produce en la masa como consecuencia de las reacciones antes citadas. Alcanzado un cierto grado alcohólico (9-17°C) las levaduras mueren y van a parar al fondo de la cuba. Dentro de las levaduras se distinguen: - Levaduras de superficie, que fermentan los azúcares de la superficie transformándolos en

alcohol, - levaduras de fondo, que hacen lo propio, en el fondo del depósito fermentador.

En la producción de bebidas alcohólicas, se utilizan casi exclusivamente levaduras del género *Saccharomyces*. Sin embargo, como estas levaduras normalmente son incapaces de metabolizar almidón como fuente de carbono, en la actualidad se generan y comercializan, levaduras recombinantes a las que se han incorporado ADN procedente de *Bacillus* con dicha información; esto corresponde al campo de la biotecnología de cuarta generación.

En los países productores de vino, como Francia, Italia, España, etc., se cultivan diversas variedades de uva que permiten a los fabricantes elegir la más adecuada según el tipo de vino que deseen preparar. En nuestro medio se comercializa en forma permanente “uva de Cascas” y esporádicamente y a menor costo, “uva iqueña”. Sin embargo, en determinadas épocas del año, se comercializa además, “uva italia” y “uva chilena”; aún cuando estas variedades son uvas de mesa, son utilizadas en la producción de vino.

El grano de uva suele ser de forma esférica u ovalada de tamaños variables según la variedad de uva, portainjertos, grado de madurez, etc. Su color también depende de estos mismos factores, diferenciándose en general las uvas tintas de las uvas blancas, con una gama de colores muy amplia, desde el tinto oscuro al morado verde oscuro, verdoso o claro, etc. El hollejo contiene las materias colorantes (antocianinos y flacones, pigmentos rojos y amarillos, respectivamente, solubles en alcohol, que luego soltará en la fermentación cuando ésta se hace en presencia de los hollejos (vinificación de tintos). El color aparte de ser soluble en alcohol, se extrae mejor a temperaturas altas. Además de las materias colorantes, el hollejo contiene materias olorosas, polifenoles, ácidos libres, sales minerales, etc.

El mosto es el zumo de la uva resultante de su pisado, prensado, etc; o cualquier otra operación que rompa los hollejos de las uvas y deje libre el líquido en ellas contenido. Según el código alimentario el mosto es el zumo obtenido por presión de la uva en tanto no haya comenzado su fermentación sin hollejo, pepitas ni escobajos. El mosto sin las sustancias colorantes es un líquido dulce, turbio, con colores variables y que oscilan del amarillo claro a un rojizo también claro, y que

tiene una densidad superior al agua (1,08 Kg/dm<sup>3</sup> aproximadamente). Los ácidos y sales más importantes son el ácido málico, ácido tartárico y ácido cítrico.

En relación a los vinos, estos se pueden clasificar desde varios puntos de vista: por el color, por la concentración de azúcares en el producto determinado, por el grado alcohólico y por la presencia de CO<sub>2</sub>. También se clasifican por la variedad de la uva utilizada, por el lugar de procedencia y por el tiempo de maduración. Los vinos destilados y los vinos fortalecidos son vinos que han sido sometidos a procesos específicos de downstream.

La conservación de los vinos, en efecto, es en gran parte una lucha contra los microorganismos que, al desarrollarse en el vino, pueden desvalorizarlo y alterar su presentación y su gusto. Durante su conservación, y hasta el embotellamiento, el vino sufre amenaza de un desarrollo microbiano. Precisamente las técnicas de clarificación y la estabilización tienen como meta principal inactivar los microorganismos y eliminarlos del vino, asegurándole una perfecta limpidez.

## II. OBJETIVOS DE LA PRÁCTICA

2.1. Conocer los fundamentos de la elaboración de vinos

2.2. Preparar vino tinto.

2.3. Familiarizar al estudiante con el protocolo de la elaboración de vinos.

## III. MATERIALES Y EQUIPOS

1. Material Biológico

- Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* MIT-L51
- Frutos maduros de *Vitis vinifera* “uva”

2. Medio de cultivo

- Agar sabouraud glucosado (ASG)

3. Ingredientes y reactivos

- Azúcar comercial
- Bisulfito de sodio
- Sulfato de amonio

- Solución salina fisiológica (SSF)

4. Material de vidrio

- Balones de 1 L
- Botellas de 750ml
- Damajuanas de 3-4 litros
- Embudos
- Espátula de digralsky
- Láminas portaobjeto
- Laminillas cubreobjeto
- Matraz de 1 L
- Mecheros
- Pipeta de 10ml
- Placas petri
- Probetas de 500ml

5. Instrumentos y equipos

- Agitador magnético o sistema de aereación
- Autoclave
- Balanza analítica
- Bombas de acuario
- Baño maría
- Brixómetro
- Cocina eléctrica
- Densímetro
- Estufa
- Horno
- pH- metro
- Refractómetro
- Termómetro

6. Otros

- Algodón
- Asa bacteriológica

- Cinta de pH
- Colador
- Cuba de 20 litros (baldes) con tapa hermética
- Magnetos
- Tocuyo (costalillo de harina)
- Tubo látex o manguera de acuario
- Ron de quemar
- Tinajas o tazones de plástico.

#### IV. PROCEDIMIENTO

##### 4.1. Recolección de la materia prima

La variedad de uva que será utilizada, debe ser cuidadosamente elegida. Es necesario también tener en cuenta el nivel o grado de madurez y el estado de sanidad, debido a que ambos influirán en la calidad del producto terminado.

El racimo de uva está constituido por:

- El TALLO, más propiamente denominado raspón o escobajo.
- Los GRANOS, en los que se distinguen:
  - a. La PIEL u HOLLEJO, cuyas células epiteliales contienen pigmentos que tienen importancia en la elaboración de vinos tintos. Además en el hollejo se encuentran levaduras nativas, salvajes o silvestres, que deben ser eliminadas para que no interfieran con la fermentación que será realizada por levaduras seleccionadas.
  - b. La PULPA o CARNE, es la parte principal del grano de uva, al machacarlas se obtiene el mosto, que es un líquido turbio cuyo color, sabor y aroma depende de la variedad de uva utilizada. Su parte central se denomina corazón.
  - c. Las PEPAS o SEMILLAS, se ubican en el corazón en número variable. Contiene aceites, taninos y ácidos volátiles, que cuando se adicionan en elevadas cantidades a la cuba de fermentación, dan al vino una elevada astringencia. Hay variedades de uvas sin pepas, que son procesadas y comercializadas como pasas.

#### 4.2. Despalillado

Se entiende por despalillado a la separación de los granos del raspón; esta operación es indispensable para obtener vinos de calidad suaves y finos. En algunos casos se obvia esta etapa pero se corre el riesgo de obtener vinos con elevada concentración de taninos.

#### 4.3. Obtención del mosto

La obtención del mosto puede hacerse previo despalillado o no. En ambos casos los granos de uva se lavan con agua corriente y luego se estrujan, presan o machacan, ya sea mecánica o manualmente, Hasta que toda la pulpa sea desagregada. Esta operación depende de la escala de producción.

Una vez desagregada toda la pulpa y obtenido el mosto, se filtra para separar el mosto de las partes sólidas, como pepas y hollejos. Luego, se mide el volumen y se va adicionando a la cuba de fermentación lavada e higienizada previamente.

#### 4.4. Suplementación

En esta etapa se adiciona al mosto: higienizantes y fuente nitrogenada y carbonada que son necesarios para que las levaduras lleven a cabo óptimamente el proceso de fermentación alcohólica, con la consecuente transformación del mosto en vino. Esta suplementación se hace en cuatro etapas:

##### b. Adición de bisulfito de sodio (sulfatado)

El bisulfito de sodio actúa como antiséptico sobre las levaduras nativas y la flora acompañante. La cantidad que se adiciona por litro de mosto, depende del estado de sanidad de la vendimia. Sin embargo, cantidades muy elevadas disminuyen la calidad del producto terminado.

Alternativamente el mosto puede ser higienizado por pasteurización a 87°C por 2 minutos y enfriando rápidamente a 15°C.

##### c. Adición de hollejos

Los hollejos de uvas tintas tienen importancia en la elaboración de vinos tintos. Durante el estrujado se inicia la liberación de los pigmentos, y se continúa durante la fermentación, lo cual es fácilmente verificable mediante

la observación del cambio de color en el mosto durante el proceso de estrujado y fermentación.

Para producir vinos tintos, generalmente es necesario, adicionar hollejos a la cuba; sin embargo, pueden ser retiradas antes de culminar el proceso de fermentación.

d. Adición de azúcar

La calidad y el valor de un mosto, está determinada fundamentalmente por su densidad. Esta densidad, refleja el contenido de azúcares que posteriormente las levaduras transformarán en etanol y en otros metabolitos.

Cuando el mosto no presenta la concentración necesaria de azúcar, que garantice una fermentación adecuada, debe ser suplementada. La cantidad de azúcar que debe ser añadida, dependerá del vino que se desee elaborar, y la variedad y madurez de la uva utilizada.

e. Adición de fuente nitrogenada

La fuente nitrogenada es indispensable para que las levaduras lleven a cabo el proceso de fermentación. Por consiguiente, para asegurar su disponibilidad, se suplementa con sales de amonio. Algunos productores alternativamente utilizan úrea, por su bajo costo; sin embargo, actualmente su uso no es recomendable por problemas que ocasionan en la salud de los consumidores, este hecho se encuentra en etapa de investigación.

4.5. Inoculación

La fermentación alcohólica puede ser llevada a cabo por las levaduras nativas propias de la uva. Estas levaduras están presentes en poblaciones mixtas y no garantizan la obtención de vinos de buena calidad. Por lo tanto, es recomendable eliminarlas y luego adicionar cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* previamente aislados y seleccionados para este fin.

La levadura que será usada como inóculo, es propagada inicialmente en placas conteniendo ASG y luego en mosto de uva en cultivo aireado y/o agitado. Las condiciones de incubación deben permitir una óptima producción de biomasa.

4.6. Encubado y fermentación

El mosto suplementado e inoculado, se acondiciona en la cuba máximo hasta los 4/5 de su capacidad. Luego, se cierra herméticamente y en la tapa se



incorpora 75 cm de tubo de látex o en una manguera de 5mm de diámetro exterior. Este dispositivo tiene la finalidad de permitir la salida del CO<sub>2</sub> que se forma durante el proceso de fermentación.

El dispositivo de salida de CO<sub>2</sub> puede sumergirse en una solución de cloruro de sodio saturada. La velocidad de burbujeo es un indicador de la velocidad de fermentación.

La marcha del proceso debe monitorearse cada 24 horas, durante 5 a 8 días. Las variables que se miden son el pH, la densidad, el porcentaje de azúcares totales y el grado alcohólico, Los datos de cada medición deben ser registrados en una ficha. El tiempo de fermentación depende de la levadura utilizada y de la temperatura de fermentación.

#### 4.7. Pasteurización

Alcanzado el grado alcohólico y la concentración de azúcares residuales deseados, se eliminan los hollejos (en caso de no haber sido eliminados antes) y el vino joven es vertido en “damajuanas” debidamente higienizadas.

Las “damajuanas” son colocadas en el baño maria y sometidas a tratamiento térmico. La pasteurización se realiza generalmente en encubados cortos, a 65°C por 30 min. Sin embargo, según estudios realizados utilizando *S. cerevisiae* MIT L-51, la pasteurización es suficiente a 60°C por 15 minutos. En encubados largos esta etapa de pasteurización no es necesaria.

Culminada la pasteurización las damajuanas son sometidas a un enfriamiento rápido y se inicia la sedimentación de las “heces”.

#### 4.8. Clarificación

Durante la clarificación se elimina la turbidez del “vino” por la adición de sustancias que permitan la adhesión de partículas enturbiantes. Se puede usar albúmina de huevo, gelatina, bentonita, etc. Que provoquen la floculación coloidal de los componentes responsables de la turbidez. Estas sustancias al precipitar arrastran las partículas en suspensión al fondo del recipiente que los contiene y el vino se torna transparente. Alternativamente se puede clarificar por sedimentación natural y trasiego.

Es necesario analizar los métodos de clarificación disponibles y elegir el más adecuado. Se debe considerar los aspectos económicos y la calidad del producto final.

#### 4.9. Embotellado

Culminada la clarificación, es recomendable repartir el vino en botellas nuevas, limpias, debidamente higienizada y secas. Luego del embotellado, debe rotularse adecuadamente indicando la fecha de producción y los insumos usados en su fabricación o los aditivos incorporados posteriormente.

#### 4.10. Maduración

En esta etapa de maduración, el vino joven experimenta un conjunto de cambios físicos y químicos que le van a brindar su bouquet característico.

El tiempo de maduración no debe ser menor de seis meses, en ella se generan cambios positivos o negativos, por lo tanto se debe realizar bajo condiciones adecuadas de temperatura, oscuridad, tiempo, etc. Además, debe evitarse un contacto con sustancias de olor fuerte, como: petróleo, gasolina, detergentes, etc.

### V. RESULTADOS

<b>Día</b>	<b>pH</b>	<b>Densidad</b>	<b>Azúcares Totales (%)</b>	<b>Grado alcohólico (%)</b>	<b>Observaciones</b>
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					





CUESTIONARIO

1. ¿Se podrá preparar vino sin adicionar ningún inóculo de levadura? Explique cómo elaboraría un vino a escala industrial si su respuesta es afirmativa.

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. ¿En qué consiste la maduración de vinos? Explique

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....



4. Elabore un diagrama de flujo para elaborar vino tinto.





### ANEXO 1. Corrección de densidad

Las uvas que se cultivan y se comercializan en nuestra Región, no son uvas vinateras, por lo que su densidad no es la adecuada para ser utilizadas en la producción de vinos; por lo que es necesario adicionar azúcar para garantizar una fermentación adecuada.

Los cálculos se hacen del modo siguiente:

- Se filtra el mosto y se mide la densidad.

Ejemplo: 1, 04. Para ello se puede usar un densímetro, un brixómetro o alternativamente se calcula con la fórmula siguiente:

$$\text{Densidad} = \text{Masa} / \text{Volumen}$$

- Se determina la cantidad de azúcar que corresponde a la densidad del mosto, según la Tabla de equivalencias del Anexo 2.

Ejemplo: La densidad de 1,04 del mosto, equivale según la Tabla, a 17 onzas de azúcar por galón de mosto.

- Se decide el tipo de vino que se desea elaborar.

Ejemplo: vino dulce.

Tipo de vino	Densidad inicial de fermentación
Dulce	1,12
Semi seco	1,10
Seco	1,08

- Se ubica en la tabla de equivalencias las onzas de azúcar por galón de mosto que corresponden a la densidad de 1,12 que se desea alcanzar.

Ejemplo: La densidad de 1, 12 equivale a 50 onzas de azúcar por galón.

- Se resta la concentración de azúcar correspondiente a la densidad que se desea alcanzar para elaborar un vino dulce, menos la concentración de azúcar que presenta el mosto.

Ejemplo: Se desea llegar a 50 onzas de azúcar por galón de mosto y el mosto obtenido tiene solo 17. Calcular las onzas de azúcar que se debe añadir.

$$50 - 17 = 33 \text{ onzas por galón}$$

- La diferencia anterior expresada en onzas de azúcar por galón de mosto, se convierte a g/litro. Tomando en consideración que 454g equivale a 16 onzas y un galón a 3,78 litros. Se decide el tipo de vino que se desea elaborar.
- Se pesa el azúcar, se adiciona a la cuba y se disuelve adecuadamente.

## ANEXO 2. TABLA DE CONVERSIÓN

Loxford Wine-Beer Tester (Adaptado por Eva Villanueva Tarazona)

Specific Gravity	Sugar (Onz/gallon)
1,010	2
1,020	4
	7
1,030	9
	12
1,040	15
	17
1,050	19
	21
1,060	23
	25
1,070	27
	29
1,080	31
	33
1,090	36
	38
1,100	40
	42
1,110	44
	46
1,120	48
	50
1,130	52
	54
1,140	56
	58
1,150	60
	62

## **ANEXOS**

## PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

### 1. Agar Almidón Extracto de Levadura (AA-EL)

Peptona	5,0 g
Extracto de Levadura	3,0 g
Cloruro de sodio	3,0 g
Almidon soluble	2,0 g
Agar	15,0 g
Extracto de suelo	1000 ml. pH 7,0

Preparación del extracto de suelo: Pesar 100g de suelo (Sin partículas gruesas). Aforar a 1 Lt, filtrar y autoclavar durante 15 minutos a 121°C, 15 lb. de presión.

Adicionar inhibidores para hongos y/o bacterias Gram negativas.

### 2. Agar Almidón (AA)

Extracto de carne	3,0 g	
Peptona	5,0 g	
Almidón soluble	2,0 g	pH 7,0 +/- 0,2
Agar	15,0 g	
Agua destilada	1000 ml	

### 3. Solución de Lugol

Yodo	1,0 g
Yoduro de potasio	2,0 g
Agua destilada	300 ml.

### 4. Agar ENDO

Peptona	10,0 g	
Hidrógeno fosfato dipotásico	2,5 g	
Lactosa	10,0 g	pH 7,4 +/- 0,2
Sulfito sódico anhidro	3,3 g	
Pararosanilina (Fucsina)	0,3 g	
Agar	15 g	
Agua destilada	1000 ml	

### 5. Caldo Verde Brillante Bilis Lactosa (BRILA)

Peptona	10,0 g	
Lactosa	10,0 g	
Bilis de buey desecada	20,0 g	pH 7,2 +/- 0,1
Verde brillante	0,0133	
Agua destilada	1000 ml	

### 6. Caldo Lauril Sulfato

Triptosa	20,0 g	
Lactosa	5,0 g	
Cloruro de sodio	5,0 g	pH 6,8 +/- 0,1
Laurilsulfato sal sódica	0,1 g	
Hidrógeno fosfato dipotásico	2,75 g	
Dihidrógeno fosfato potásico	2,75 g	
Agua destilada	1000 ml	

### 7. Caldo EC

Peptona de caseína	20,0 g	
Lactosa	5,0 g	
Mezcla de sales biliares	1,5 g	
Cloruro de sodio	5,0 g	pH 6,9 +/- 0,1
Hidrógeno fosfato dipotásico	4,0 g	
Dihidrógeno fosfato potásico	1,5 g	
Agua destilada	1000 ml	

### 8. Caldo Úrea

Extracto de levadura	0,1 g	
Dihidrógeno fosfato potásico	9,1 g	
Hidrógeno fosfato disódico	9,5 g	pH 6,8 +/- 0,1
Úrea	20,0 g	
Rojo de fenol	0,01 g	
Agua destilada	1000 ml	

### 9. Agar Mc CONKEY

Peptona de caseína	17,0 g	
Peptona de carne	3,0 g	
Cloruro sódico	5,0 g	
Lactosa	10,0 g	
Mezcla de sales biliares	1,5 g	pH 7,1 +/- 0,1
Rojo neutro	0,03 g	
Cristal violeta	0,001 g	
Agar	13,5 g	
Agua destilada	1000 ml	

### 10. Agar Salmonella - Shigella

Peptona	10,0 g	
Lactosa	10,0 g	
Bilis de buey desecada	8,5 g	
Citrato sódico	10,0 g	
Tiosulfato sódico	8,5 g	pH 7,0 +/- 0,1
Citrato de amonio y hierro	1,0 g	
Verde brillante	0,0003 g	
Rojo neutro	0,025 g	
Agar	12,0 g	
Agua destilada	1000 ml	

### 11. Agar hierro tres azúcares (TSI)

Peptona de caseína	15,0 g	
Peptona de carne	5,0 g	
Extracto de carne	3,0 g	
Extracto de levadura	3,0 g	
Cloruro de sodio	5,0 g	
Lactosa	10,0 g	pH 7,4 +/- 0,1
Sacarosa	10,0 g	
D(+) Glucosa	1,0 g	
Citrato amonio de hierro (III)	0,5 g	
Tiosulfato sódico	0,3 g	

Rojo de fenol	0,024 g
Agar	12,0 g
Agua destilada	1000 ml

### 12. Agar Lisina– Hierro (LIA)

Peptona de carne	5,0 g	
Extracto de levadura	3,0 g	
D(+) Glucosa	1,0 g	
L-Lisina monoclorhidrato	10,0 g	
Tiosulfato de sodio	0,04 g	pH 6,7 +/- 0,1
Citrato de amonio y hierro (III)	0,5 g	
Púrpura de bromocresol	0,02 g	
Agar	12,5 g	
Agua destilada	1000 ml	

### 13. Caldo Selenito

Peptona de carne	5,0 g	
Lactosa	4,0 g	
Selenito de sodio	4,0 g	pH 7,0 +/- 0,2
Hidrógeno fosfato dipotásico	3,5 g	
Dihidrógeno fosfato potásico	6,5 g	
Agua destilada	1000 ml	

### 14. Caldo Tetracionato

Peptona de caseína	2,5 g	
Peptona de carne	2,5 g	
Mezcla de sales biliares	1,0 g	
Carbonato de calcio	10,0 g	pH 7,0 +/- 0,1
Tiosulfato de sodio	3,0 g	
<u>Aditivo:</u>		
Yoduro de potasio	5,0 g	
Yodo	6,0 g	
Eventualmente verde brillante	0,01 g	
Agua destilada	1000 ml	



### 15. Caldo Peptonado

Peptona	20 g	
Cloruro de sodio	5 g	pH 7,0 +/- 0,1
Agua destilada	1000 ml	

### 16. Caldo Lactosado

Peptona de gelatina	5,0 g	
Extracto de carne	3,0 g	pH 6,9 +/- 0,1
Lactosa	5,0 g	
Agua destilada	1000 ml	

### 17. Agar Nutritivo

Peptona de carne	5,0 g	
Extracto de carne	3,0 g	pH 7,0 +/- 0,2
Agar	15 g	
Agua destilada	1000 ml	

### 18. Agar Sabouraud

Peptona	10,0 g	
Dextrosa	40,0 g	pH 5,6 +/- 0,2
Agar	15,0 g	
Agua destilada	1000 ml	

### 19. Reactivo de Kovacs

Alcohol amílico o isoamílico	75,0 ml
Ácido clorhídrico	25,0 ml
Para dimetil amino benzaldehido	5,0 g

### 20. Solución Salina Fisiológica

Cloruro de sodio	0,85 g
Agua destilada	100 ml

**21. Agar Plate Count (Agar peptona de caseina glucosa extracto de levadura)**

Peptona de caseina	5,0 g	
Extracto de levadura	2,5 g	
D(+) Glucosa	1,0 g	pH 7,0 +/- 0,1
Agar	14,0 g	
Agua destilada	1000 ml	

**22. Agar Papa Dextrosa**

Infusión de papa (preparada a partir de 200g de papa)

D (+) Glucosa	20,0 g	pH 5,6 +/- 0,1
Peptona	4,0 g	
Agar	15,0 g	

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adams, M. R y M. Moss. 1997. Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza. España.
- Barnett, H. L; B. Hunter. 1998. Ilustred General of Imperfect Fungi. 4<sup>da</sup> edición. The American Phytopathological Society. EEUU.
- Gilman, J. 1963. Manual de los Hongos del suelo. Traducción de la 2<sup>da</sup> edición revisada. Compañía editorial Continental S. A. México D. F.
- Madrid, A. y J. Madrid. 2001. El nuevo manual de Industrias alimentarias. Edición ampliada y corregida. 3<sup>ra</sup> edición. AMV Ediciones. Madrid.
- Mendo, M. 1985. Lecciones de Microbiología y Medios de Cultivo. Ediciones Laborales SRL. Lima, Perú.
- Pascual, M. y V. Calderón. 1998. Microbiología Alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. 2<sup>da</sup> edición . Editorial Díaz de Santos, S. A. Madrid- España.
- Pelczar, M.; Reid, R. y Chan, E. 1982. Microbiología. 2<sup>da</sup> edición, editorial Mac Graw-Hill. Mèxico.
- Ratto, M; L. Vega y T. Garrido. 1983. Control Microbiológico de leche y productos lácteos. Métodos recomendados. 1<sup>ra</sup> edición. Editorial CLEIBA. Lima. Perú.
- Villanueva, E; H. Robles; N. Otiniano y B. Soriano. 2006. Aislamiento y selección primaria de bacterias productoras de amilasas. Guía de práctica de Microbiología Industrial. Universidad nacional de Trujillo, Trujillo. Perú.
- Vargas, A. 2004. Selección y evaluación de bacterias del género *Bacillus* productoras de amilasa en cultivo sumergido. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.