



145
Universidad Nacional Autónoma
de México

Facultad de Química

Curso Práctico de Laboratorio de
Fermentaciones Industriales.

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a n

Raúl Pérez Avila

José Ramón Verde Calvo



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS 1978

CLAS _____

ADG ~~M.T. 309~~

333

PCRA _____

REC _____



JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE:

PRESIDENTE:	ENRIQUE GARCIA GALLIANO.
VOCAL:	EMILIO BARRAN HERNANDEZ
SECRETARIO:	WENCESLAO FUENTES SOLIS
1er. SUPLENTE:	EDUARDO BARZANA GARCIA
2do. SUPLENTE:	FIDEL FIGUEROA MARTINEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

LABORATORIO 202

FACULTAD DE QUIMICA, U. N. A. M.

SUSTENTANTES:	RAUL PEREZ AVILA
	JOSE RAMON VERDE CALVO

ASESOR DEL TEMA:	WENCESLAO FUENTES SOLIS
------------------	-------------------------

I N D I C E .

	PAG.
Introducción	4
Capítulo	5
Técnicas y Fundamentos de Análisis	
Práctica No. 1	19
Técnicas de Análisis en Vinos de Mesa	
Capítulo II	24
Obtención de Biomasa	
Práctica No. 2	45
Obtención de Biomasa	
Capítulo III	49
Fermentación Alcohólica	
Práctica No. 3	81
Elaboración de Vino de Mesa	
Práctica No. 4	85
Elaboración de Ron	
Capítulo IV	89
Fermentación Acética	
Práctica No. 5	110
Modificación al Método Francés o de Orleans	
Práctica No. 6	113
Método de Acetificación Sumergida	
Capítulo V	117
Fermentación Láctica	
Práctica No. 7	142
Elaboración de Col Acida	
Práctica No. 8	146
Elaboración de Yogurt	
Capítulo VI	150
Fermentación Cítrica	
Práctica No. 9	162
Obtención de Acido Cítrico	
Conclusiones	166
Bibliografía	168

INTRODUCCION:

Fueron varios los objetivos que nos motivaron a realizar el presente trabajo:

El primero fué recopilar y ampliar las prácticas que se venían impartiendo en la materia de Fermentaciones Industriales.

El segundo, Preparar de acuerdo con el maestro, material didáctico de fácil comprensión a diversos niveles ya que esta materia acusa un defecto muy grande, que es el de, aceptar alumnos de quinto a octavo semestre, esto hace que el impartir el curso sea difícil, sobretodo por las deficiencias de los alumnos de quinto y sexto semestre, por no haber llevado todas las materias necesarias para adquirir los conocimientos suficientes para cursar una materia del octavo semestre, este trabajo les indica las técnicas y fundamentos que ligados a los conocimientos impartidos en teoría, les permitirán una mejor comprensión del curso práctico.

El tercero que el alumno tenga una secuencia lógica de los pasos a seguir en todas y cada una de las prácticas, en las cuales se le explican con detalle el método a seguir, el material a emplear, el manejo de equipo y la evaluación de la práctica.

Tecnología de Alimentos o en la Biblioteca Principal de la facultad, También se recomienda el uso de la Biblioteca Central de Chapingo, así como las bibliotecas del, I.M.I.T., y la del A.T.A.M., en donde la información es amplia y abundante.

CAPITULO I.

TECNICAS Y FUNDAMENTOS DE ANALISIS
- TECNICAS PARTICULARES DE LAS ---
PRACTICAS.

PRACTICA No. 1

TECNICAS DE ANALISIS EN VINOS DE -
MESA.

TECNICAS Y FUNDAMENTOS DE ANALISISI.- BIOMASA.

I.1. DETERMINACION DE AZUCARES POR EL METODO DE FEHLING.

(7)(22)

(Reductores Directos y Totales)

Basado en la reducción que sufre el cobre (II) por acción del grupo aldehído de los monosacáridos.

Reactivos:

- Solución A: Disolver 34.639 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 12 g de MgSO_4 en agua y llevar a 500 ml. Filtrar si es necesario.
- Solución B: Disolver 170 g de tartrato doble de sodio y potasio y 50 g de NaOH en agua y llevar 500 ml filtrar si es necesario.
- Sacarosa Q.P.
- HCl concentrado
- Azul de Metileno al 0.2 %
- NaOH al 40 %

Valoración del Reactivo de Fehling. Pesar 475 mg de sacarosa Q.P. y colocarla en un matraz aforado de 100 ml con un poco de agua (30 a 40 ml). Si la sacarosa está muy húmeda se puede secar en una estufa a una temperatura de 80°C como máximo. Añadir 5 ml de HCl concentrado, se le introduce un termómetro y se coloca a baño maría y cuando la temperatura del matraz llega a 63°C se mantiene ésta durante 3 min., se saca y se enfría rápidamente al chorro de agua.

Ya frío se neutraliza con sosa al 40 %. Por separado en un vaso de precipitado, se ponen 5 ml de HCl concentrado, (de la misma fuente de donde se tomó para hacer la inversión de la sacarosa) se le agregan de 20 a 30 ml de agua destilada y unas gotas de fenolftaleína y se titula con la sosa concentrada al 40 %, la cantidad de mililitros gastados de NaOH son los que se añaden al matraz aforado en donde se hizo la inversión, con el objeto de neutralizar; éste paso

es importante, ya que si no está bien neutralizada la solución, - no se podrá ver el vire durante la titulación del factor.

La solución invertida de la sacarosa se coloca en una bureta y - va añadiendo de 2 en 2 ml a un matraz Erlenmeyer que contiene -- 5 ml de la solución A, 5 ml de la solución B, 50 ml de agua destilada y cuerpos de ebullición; se calienta a ebullición y en es te momento se empieza a añadir la solución de azúcar invertida.

Cuando casi todo el reactivo ha pasado del color azul al color-rojo ladrillo (precipitado de Cu₂O) se le agregan unas gotas de- la solución de azul de metileno y se continua adicionando la so- lución azucarada lentamente, teniendo la precaución de que el -- reactivo no deje de estar en ebullición.

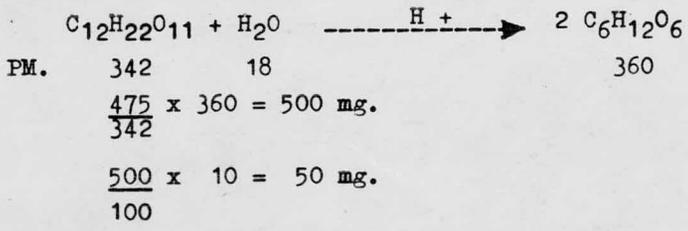
El final de la reacción se comprueba sacando breves segundos el- matraz de la fuente de calor y observando, sobre una superficie- blanca, la parte superior del líquido que debe ser incolora y en el fondo encontrarse un precipitado rojo ladrillo. Esta titula- ción debe tomarse como referencia. Repetirla añadiendo casi todo el volumen de la solución de azúcar empleada en la valoración -- anterior, hervir durante 2 minutos, agregar el indicador y conti- nuar la titulación hasta el punto final.

Repetir la determinación hasta encontrar dos resultados que con- cuerden con una diferencia de 0.2 ml

CALCULOS Y REACCIONES:

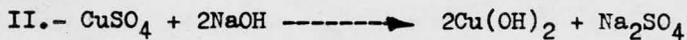
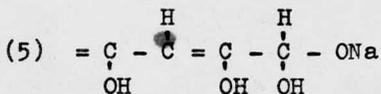
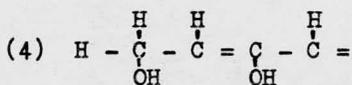
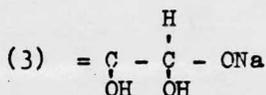
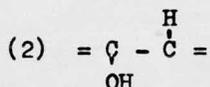
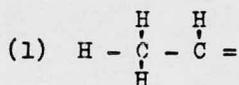
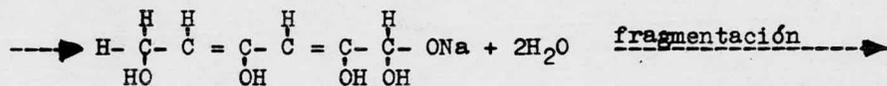
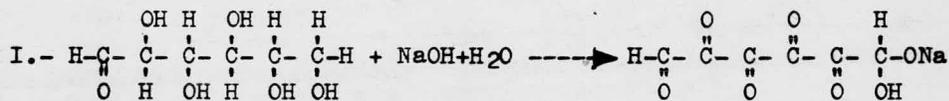
FACTOR = 9 ml / gotas x 5

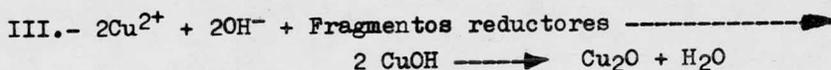
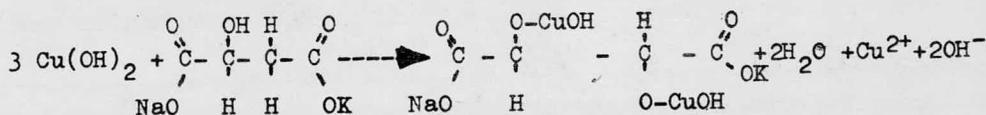
Para calcular el factor se toma en cuenta la siguiente reacción



Cada 10 ml de solución contienen 50 mg de azúcar invertida. Tomando en cuenta éste dato, cuando se efectúa la titulación de sacarosa invertida, se puede conocer la cantidad de miligramos- de monosacáridos que reducen 10 ml de solución de Fehling.

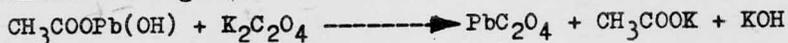
Las reacciones que se llevan a cabo son las siguientes:





- Determinación de Azúcares Reductores Directos:

Defecación de la muestra.- Se toma una alícuota de la muestra en un matraz aforado de 100 ml, se agregan de 40 a 50ml de agua destilada. En un papel se pesa (en balanza analítica un gramo de subacetato de plomo, éste se va agregando poco a poco, agitando cada vez el matraz, hasta que haya precipitación de las materias grasas y protéicas, (no es necesario agregar todo el subacetato) se pesa nuevamente el papel para saber por diferencia, la cantidad exacta de subacetato que se añadió, para así, calcular la cantidad de oxalato de potasio necesaria para neutralizar el subacetato, mediante la siguiente reacción:



PM 286

166

286 g --- 166 g

Peso exacto --- x g

Calculada la cantidad de oxalato de potasio, se pesa y se agrega al matraz, se agita y se filtra. El filtrado se coloca en la bureta y se titula de manera similar a la valoración del reactivo de Fehling.

CALCULOS:

$$\% \text{ RD} = \frac{F \times \text{Vol. Tot. de sol.} \times 100}{\text{Vol. gastado} \times \text{Muestra en mg}}$$

$$= \frac{F \times 100}{\text{ml gastados}}$$

- Determinación de Azúcares Reductores Totales:

A una alícuota de la muestra se le invierte como se hizo con la sacarosa, se neutraliza, se afora, se defeca, se filtra y se titula de la misma forma que los anteriores, o se -

puede tomar una alícuota de la muestra que se defecó para reductores directos; y nada más se hace la inversión, continuando de la misma manera.

CALCULOS:

$$\% RT = \frac{F \times 100 \times \text{Vol. Tot. de Sol.} \times 100}{\text{Alícuota} \times \text{Vol. gastado} \times \text{Muestra en mg.}}$$

$$\frac{F \times 100}{PA} \times \frac{100}{\text{mg gast.}}$$

I.2 DETERMINACION DE LA ACIDEZ TOTAL.(7)(45)

En una muestra de 25 ml eliminar el CO₂ si está presente, calentar casi a ebullición durante 30 segundos.

Colocar 200 ml de agua destilada hervida y fría en un matraz Erlenmeyer, adicionar unas gotas de solución indicadora de fenolftaleína, neutralizar la solución con NaOH 0.1 N, agregar 5 ml de la muestra hervida y valorar con solución de NaOH -- 0.1 N informar en ácido propiónico de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Acido Propiónico} = \frac{\text{mLOH}^- \times \text{N OH}^- \times 0.074 \times 100}{5}$$

I.3 DETERMINACION DE ACIDEZ VOLATIL.(7) (45)

5 min
Tome 50 ml de la muestra y caliente casi a ebullición durante un minuto, enfríe y adapte un sistema de destilación, agregue aproximadamente 200 ml de agua destilada y neutra, ajuste el calor hasta que la destilación sea continua y uniforme, colecte 200 ml del destilado, titule éste con solución 0.1 N, usando fenolftaleína como indicador.

CALCULOS:

$$\% \text{ Acido Acético} = \frac{\text{mLOH} \times \text{N OH} \times 0.06 \times 100}{\text{ml de muestra}}$$

I.4 DETERMINACION DE ACIDEZ FIJA.(7) (45)

Calcular la acidez fija por diferencia en por ciento de ácido propiónico:

$$AF = AT - AV$$

AF: Acidez Fija
 AT: Acidez Total
 AV: Acidez Volátil

I.5 DETERMINACION DE pH. (45)

Se puede medir directamente el pH en un potenciómetro calibrado o en su defecto con papel pH indicador.

I.6 DETERMINACION DE BIOMASA. (28)

Se toma una cantidad conocida en ml de muestra (ésta varía de 50 a 10 ml con respecto a la facilidad o dificultad de filtración) y se pasa sobre un filtro Millipore, al terminar la operación -- el papel filtro se seca en una estufa a 40°C y por diferencia de peso se obtiene la cantidad de biomasa,

II. FERMENTACION ALCOHOLICA

Productos no destilados.

I.1 DETERMINACION DE ACIDEZ TOTAL. (6)

En una muestra de 25 ml eliminar el CO₂ si está presente calentando bajo un sistema a reflujo durante 20 minutos.

Colocar 200 ml de agua destilada hervida y fría en un matraz -- Erlenmeyer y continuar como dice "I.2" informar en ácido tartárico

I.2 METODO PARA LA DETERMINACION DE ETANOL. (6) (45)

Este método se basa en la diferencia que existe de los puntos -- de ebullición entre los componentes volátiles y materia sólida -- en un mosto, vino o bebida alcohólica.

Método. -- Se toman 100 ml de muestra en un matraz aforado de 100ml se pasa el contenido a un matraz de destilación de fondo plano de 500 ml de capacidad, se lava el matraz aforado con dos porciones -- de 10 ml y una de 5 ml de agua destilada. Esta agua de lavado se agrega al matraz de destilación, se monta el aparato de destilación (matraz de fondo plano, trampa de Kjeldahl, y refrigerante) -- teniendo cuidado que las juntas se encuentren firmes.

Se destila casi 100 ml, recibiendo en el mismo matraz en el cual se tomó la muestra, hay que acompletar a 100 ml con unas gotas de agua destilada. La destilación debe hacerse en un tiempo de 30 a 60 minutos y a una velocidad uniforme. Es conveniente adicionar -- cuerpos de ebullición al matraz de destilación antes de efectuar -- ésta operación.

Para el caso de mostos recién fermentados, adicionar un poco de antiespumante; así como agregar solución de NaOH 0.1 N a los vinos, mostos y vinagres que contengan grandes cantidades de ácido acético antes de efectuar la destilación, (se recomienda antes de hacer esta determinación tener el por ciento de acidez total para poder neutralizar eficazmente y no tener errores en la cuantificación del etanol.

Una vez que el etanol ha sido separado del mosto o bebida alcohólica de la sustancia a analizar, existen varias opciones para la cuantificación de éste: (6).

- a.- Determinación con Hidrómetro.
- b.- Determinación con Picnómetro.
- c.- Determinación con Balanza Hidrostática.
- d.- Determinación por Oxidación Química.

Aquí solamente se describirán las dos técnicas más comunes en el laboratorio.

- a.- Determinación con Hidrómetro.- Existen una gran cantidad de hidrómetros calibrados directamente en por ciento en volumen de etanol, la mayoría están calibrado a 15.5°C.

Si la temperatura de la muestra es diferente, la corrección respectiva tendrá que ser aplicada (en la tabla 11 del libro 6).

En una probeta limpia y seca, y en caso de que no lo esté, enjuaguese con el líquido que se ensaya, llénese hasta las tres cuartas partes, su diámetro ha de ser lo suficientemente grande como para que el hidrómetro flote con facilidad. Se introduce con suavidad en la probeta procurando que no rose con las paredes de ésta. Tome la temperatura del líquido, cuando el alcoholómetro esté quieto procédase a la lectura. (13).

- b.- Determinación con Picnómetro.- Este método es considerado como un estandar internacional y aprobado como una técnica oficial en el AOAC. (7)

La técnica es la de Determinación de la Gravedad Específica y la conversión de ésta a por ciento de alcohol se encuentra en tablas en el AOAC.

II.3 DETERMINACION DE ACIDEZ VOLATIL. (7)(45)

Tome 50 ml de muestra y pongalos a reflujo durante 20 minutos (para expulsión del CO₂), enfríe y lave el refrigerante con agua destilada y neutra (aproximadamente 200 ml), adapte un sistema de destilación, ajustando el calor hasta que el volumen sea de 200 ml, titule éste con solución 0.1 N de NaOH, usando fenolftaleína como indicador. Reporte en por ciento de ácido acético como se indica en "I.3".

II.4 DETERMINACION DE ACIDEZ FIJA. (7) (45)

Calcular la acidez fija por diferencia en por ciento de ácido tartárico como se indica en "I.4".

- Productos destilados.

II.5 DETERMINACION DE ACIDEZ TOTAL. (7) (45)

Neutralice aproximadamente 250 ml de agua destilada, hervida y fría en una capsula de porcelana, agregue 25 ml de muestra y titule con 0.1 N de NaOH usando fenolftaleína como indicador. Reportar en por ciento de ácido tartárico.

II.6 DETERMINACION DE ACIDEZ FIJA. (7) (45)

Evapore 25 a 50 ml de muestra en una capsula de porcelana, en un sistema de baño maría, seque 30 minutos a 100°C, disuelva y transfiera el residuo, con algunas porciones de alcohol neutro de aproximadamente los mismos grados GL que la muestra, usando 25 ml en toda la operación, esto se agrega a un matraz con 250 ml de agua hervida, fría y neutra, titular con NaOH 0.1 N y fenolftaleína. Reportar en por ciento de ácido tartárico.

II.7 DETERMINACION DE ACIDEZ VOLATIL. (7) (45)

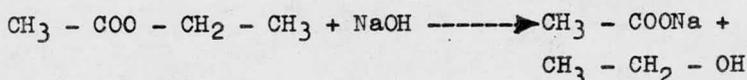
Calcular la acidez volátil por diferencia en por ciento de ácido acético:

$$\text{ACIDEZ VOLATIL} = \text{ACIDEZ TOTAL} - \text{ACIDEZ FIJA.}$$

II.8 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE ESTERES. (7) (22)

Esta determinación está basada en una titulación o valoración inversa y consiste en valorar una sustancia "A" (acetato de etilo) agrgándole una cantidad conocida y en exceso de un --- reactivo "B" (hidróxido de sodio), que consume la totalidad - de "A". Se valora después el exceso de "B" por otro reactivo "C" (HCl) convenientemente elegido mediante otra reacción --- química.

REACCION:



Técnica.- Se transfieren 25 ml del destilado a un matraz de 250 ml, se neutraliza la acidez libre, ya conocida, y se aña de un exceso de NaOH 0.1 N. El matraz se conecta a un condensador con agua para reflujo y se calienta una hora en baño - maría. Se deja enfriar y se titula el álcali con HCl 0.1 N. El exceso de álcali no debe de ser menor de 2 ml ni mayor - de 10 ml de NaOH 0.1 N.

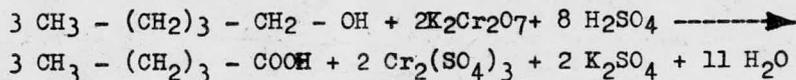
CALCULOS:

Un ml de HCl 0.1 N equivale a 8.1 mg de acetato de etilo.

II.9 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE ACEITE DE FUSEL. (7) (22)

(Mezcla de alcoholes superiores valorada como alcohol --- amílico).

Basada en la siguiente reacción de óxido reducción:



Despues de titular el exceso de álcali en la determinación de ésteres, se transfiere la solución a un embudo de separación y se extráe cuatro veces con CCl_4 , usando porciones de 20,15,10 y 5 ml respectivamente. Se lavan las extracciones combinadas de CCl_4 con tres porciones de 25 ml de solución de NaCl saturada, y con dos porciones de 25 ml de solución saturada de sulfato de sodio.

La mezcla se agita durante un minuto. Se transfiere la capa

de CCl_4 a un matraz conteniendo 25 ml de solución oxidante (esta solución oxidante se prepara disolviendo 10 g de dicromato de potasio en 90 ml de agua y se adicionan 10 ml de ácido sulfúrico) y se hierve a reflujo durante una hora. Pasado ese tiempo se deja enfriar, se añaden 50 ml de agua através del refrigerante y se destila hasta que queden 25ml en el matraz de destilación; se añaden 25 ml más de agua y se vuelve a destilar hasta que queden 15 a 25 ml en el matraz de destilación, (el destilado debe ser incoloro) titular el destilado con NaOH 0.1 N usando fenolftaleína como indicador.

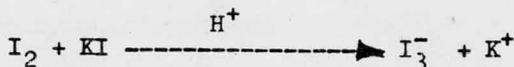
CALCULOS:

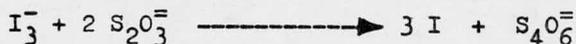
Un ml de NaOH 0.1 N equivale a 8.8 mg de alcohol amílico.

II.10 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE ALDEHIDOS. (7) (22)

Basado en una valoración yodométrica.

En un matraz con tapón esmerilado se miden 100 ml de agua-destilada recientemente hervida y fría, se agregan 10 ml del destilado (II.2) y en seguida 25 ml de una solución de bisulfito de sodio 0.05 N. Se tapa el matraz y se deja en reposo durante 30 minutos, agitando de vez en cuando. Pasado ese tiempo se añaden 25 ml de solución valorada de tiosulfato de sodio 0.05 N. Cuando la solución presenta un color amarillo paja, se agregan de 5 a 10 gotas de solución de almidón al 1 %, la mezcla se torna azul, se adiciona solución de tiosulfato hasta la decoloración completa. se efectúan las mismas determinaciones con una prueba en blanco, conteniendo las mismas cantidades de yodo y bisulfito de sodio que la muestra. Las reacciones que se llevan a cabo son las siguientes: (22)





CALCULOS;

$$\text{Acetaldehído} = \frac{(\text{ml Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ muestra} - \text{ml Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ blanco}) \times N \text{ Tios} \times \text{Eq AcO}}{\text{Vol de la muestra}}$$

III.- FERMENTACION ACETICA.

III.1 DETERMINACION DE ACIDEZ TOTAL. (7) (45)

Diluya 10 ml de muestra con agua destilada, hervida, fría y neutra en una capsula de porcelana, adicione unas gotas de fenolftaleína y titule con 0.5 N de NaOH agitando constantemente. Reportar en por ciento de ácido acético tomando en cuenta para los cálculos la dilución hecha.

III.2 DETERMINACION DE ACIDEZ FIJA. (7) (45)

Una muestra de 10 ml se evapora hasta la mitad en un sistema de baño maría, titular la acidez fija y calcular la acidez volátil como ácido acético por diferencia.

III.3 DETERMINACION DE ACIDOS MINERALES. (45) (50)

(Adulteración de Vinagres).

Desde el punto de vista cualitativo, se conocen distintos métodos para poner en manifiesto en los vinagres, los ácidos minerales libres que contienen.

- se sabe que las trazas de sulfato se encuentran usualmente en vinagre, pero si la cantidad excede de 0.03 % (como H_2SO_4), se puede suponer una alteración de éste. La adición de ácidos minerales puede ser detectada por pruebas muy sencillas:

a.- Mezcle 2 ml de muestra con 2 ml de alcohol y dos gotas de anaranjado de metilo. Un color rojo indica un valor bajo de pH debido a la adición de ácidos minerales. El pH de productos que contienen 4 % de ácido acético, rara vez baja hasta 2.9 para vinagre de malta y de 2.5 para productos artificiales.

b.- Violeta de Metilanilina.- Este indicador no cambia de color en contacto con los ácidos orgánicos, en cambio, si en el vinagre existen ácidos minerales como ácido sulfúrico, clorhídrico o nítrico, que son los más empleados - en ésta clase de fraudes, adquiere entonces matices verdosos.

Se hace la prueba tomando 10 ml de vinagre que se colocan en un tubo de ensaye, añadiendo luego unas gotas de solución de metilanilina al 0.01 %.

c.- Rojo Congo.- El rojo congopuede emplearse también para ésta investigación por la propiedad que tiene de pasar - del rojo al azul en presencia de ácidos minerales.

La presencia de trazas de mercurio es indicativo de la presencia de un 80 % de ácido acético comercial.

IV.- FERMENTACION LACTICA.

IV.1 DETERMINACION DE LACTOSA POR EL METODO DE FEHLING.(7) (45) (Modificación Soxhlet).

Reactivos:

A.- Para la defecación de la muestra:

- 1.- Solución acuosa de acetato de plomo.
- 2.- Solución acuosa de sulfato de sodio.
- 3.- **Ácido acético** glacial Q.P.

B.- Para la determinación de lactosa en el filtrado:

- 1.- Soluciones Fehling "A" y "B" (método de preparación dado en I.1).
- 2.- Solución estandar de lactosa: disolver 10 g de lactosa anhidra pura con solución al 0.2 % de ácido benzoico, aforar a 1000 ml; tomar 20 ml y aforarlos a 100ml 1 ml de esta solución contiene 2 mg de lactosa.
- 3.- Solución acuosa de azul de metileno al 0.25 %.

Valoración y Titulación de la Solución de Fehling.- Mezclar en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, 5 ml de solución "A" y - 5 ml de solución "B", agregar 50 ml de agua destilada, calentar a ebullición y sin quitar el mechero, añadir con una bureta, solución estandar de lactosa para efectuar la reduc

ción total del cobre (aproximadamente 40 ml) de tal manera - que solo falte agregar de 0.5 a 1.0 ml para terminar la titulación. Mantener la ebullición moderada por dos minutos, sin separar la flama; agregar 1 ml de solución de azul de metileno y añadir más solución estandar de lactosa, gota a gota, - hasta decoloración del indicador.

Factor = ml gastados de sol. estandar x 0.002 g

Defecación de la Muestra.- Se colocan 10 ml de leche en un - matraz volumétrico de 100 ml, se añaden 25 ml de agua y 6 ml de solución saturada de acetato de plomo, 10 ml de solución saturada de sulfato de sodio y 1 ml de ácido acético glacial, se deja reposar durante 30 minutos, se afora y se filtra empleando papel seco, se desechan los primeros 20 ml del filtrado.

Determinación de Lactosa en el Filtrado.- Seguir la misma - técnica que para la valoración de la solución de Fehling, - sustituyendo la solución estandar por el filtrado de la muestra de leche.

CALCULOS:

$$\frac{\text{Factor x 10000}}{\text{ml gastados}} = \text{g/l de lactosa}$$

NOTA: En la titulación no deben gastarse ni menos de 15- ni más de 50 ml y el tiempo total de titulación no debe ser más de 3 minutos.

IV.2 DETERMINACION DE ACIDEZ TOTAL EN LECHE.(7) (45)

Medir exactamente 20 ml de leche en un matraz y diluir agregando 40 ml de agua recientemente hervida y fría, añadir -- 2 ml de fenolftaleína y titular con NaOH 0.1 N hasta vire -- rosa persistente. Reportar en por ciento de ácido láctico.

CALCULOS:

$$\% \text{ g de } \acute{\text{a}}\text{c l}\acute{\text{a}}\text{c}\text{t}\text{ic}\text{o} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N NaOH} \times 0.09 \times 100}{\text{ml de muestra}}$$

BIBLIOGRAFIA:

4, 5, 6, 7, 13, 18, 24, 28, 34, 43, 45, 53, 54, 58, 63, 64.

PRACTICA No. 1.
TECNICAS DE ANALISIS EN VINOS DE MESA.

I.- OBJETIVO: El comprender y llevar a cabo las técnicas de análisis más utilizadas en el curso.

II.- MATERIAL:

- Cinco matraces Erlenmeyer de 250 ml.
- Un matraz aforado de 100 ml.
- Un matraz de fondo plano de 500 ml.
- Una bureta de 50 ml.
- Tres pipetas volumétricas de 5 ml.
- Un termómetro de - 10 a 250°C.
- Cuerpos de ebullición.
- Papel filtro.
- Papel pH.
- Una botella de vino de mesa comercial.

III.- REACTIVOS:

- Solución de Fehling "A"
- Solución de Fehling "B"
- Solución de NaOH concentrada.
- Solución de NaOH 0.1 N.
- Solución de HCl concentrada.
- Solución de HCl 0.1 N.
- Solución de fenolftaleína.
- Solución de azul de metileno.

IV.- EXPERIMENTO:

Al vino de mesa comercial se le somete al siguiente análisis:

- 1.- Determinación de Acidez Total.
- 2.- Determinación de Etanol.
- 3.- Determinación de Acidez Volátil.
- 4.- Determinación de Acidez Fija.
- 5.- Determinación de Azúcares Reductores por el Método de Fehling.

DESCRIPCION DE CADA DETERMINACION:

1.- DETERMINACION DE ACIDEZ TOTAL.

En una muestra de 25 ml eliminar el CO₂ si está presente, calentando bajo un sistema de reflujo durante 20 minutos.

Colocar 200 ml de agua destilada hervida y fría en un matraz Erlenmeyer, adicionar unas gotas de solución indicadora de - fenolftaleína, neutralizar la solución con NaOH 0.1 N, agregar 5 ml de la muestra hervida y valorar con una solución de NaOH 0.1 N, informar en por ciento de ácido tartárico de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Acido Tartárico} = \frac{m\text{LOH} \times N \text{ OH} \times 0.074 \times 100}{5}$$

2.- DETERMINACION DE ETANOL.

Se toman 100 ml de muestra en un matraz aforado de 100 ml, se pasa el contenido a un matraz de fondo plano de 500 ml de capacidad, se lava el matraz aforado con dos porciones de 10 ml y una de 5 ml de agua destilada, se monta un aparato de destilación (matraz de fondo plano, trampa de Kjeldahl, y refrigerante) teniendo cuidado que las juntas se encuentren bien firmes. Se destila casi 100 ml, recibiendo en el mismo matraz en el cual se tomó la muestra, se acompleta a 100 ml con unas gotas de agua destilada. La destilación debe hacerse en un tiempo de 30 a 60 minutos y a una velocidad uniforme. La cuantificación del Etanol se hace por medio de gravedad específica, la conversión de ésta a por ciento de alcohol se encuentra en tablas en el AOAC (7).

3.- DETERMINACION DE ACIDEZ VOLATIL.

Tome 50 ml de muestra y pongalos a reflujo durante 20 minutos (para expulsión del CO₂), enfríe y lave el refrigerante con agua destilada y neutra (aproximadamente 200 ml), adapte un sistema de destilación,ajustando el calor hasta que el volumen sea aproximadamente 200 ml, titule éste con solución 0.1 N de NaOH, usando fenolftaleína como indicador. Reporte en por ciento de ácido acético como se indica:

$$\% \text{ Acido Acético} = \frac{m\text{LOH} \times N \text{ OH} \times 0.06 \times 100}{50}$$

4.- DETERMINACION DE ACIDEZ FIJA.

Calcular la acidez fija por diferencia en por ciento de ácido tartárico: $AF = AT - AV$.

AF: Acidez Fija, AT: Acidez Total, AV; Acidez Volátil.

5.- DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES POR EL METODO DE FEHLING.

Reactivos:

- Solución " A " disolver 34.639 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 12 g de MgSO_4 en agua y llevar a 500 ml, filtrar si es necesario.
- Solución " B " disolver 170 g de tartrato doble de sodio y potasio y 50 g de NaOH en agua, llevar a 500 ml, filtrar si es necesario.
- Sacarosa Q.P.
- HCl concentrado.
- Azul de metileno al 0.2 %
- NaOH al 40 %

Valoración del Reactivo de Fehling. - Pesar 475 mg de sacarosa Q.P. y colocarla en un matraz aforado de 100 ml con un poco de agua (de 30 a 40 ml). Si la sacarosa está muy húmeda se seca en una estufa a una temperatura de 80°C , como máximo. Añadir 5ml de HCl concentrado, se le introduce un termómetro y se coloca a baño maría, cuando la temperatura en el matraz llega a 63°C , se mantiene durante 3 minutos, se saca y se enfría rápidamente al chorro de agua. Ya frío se neutraliza con sosa al 40 %.

Por separado en un vaso de precipitado, se ponen 5 ml de HCl concentrado (de la misma fuente de donde se tomó para hacer la inversión de la sacarosa), se le agregan de 20 a 30 ml de agua destilada y unas gotas de fenolftaleína y se titula con la sosa concentrada al 40 %, la cantidad de mililitros gastados de NaOH son los que se añaden al matraz aforado en donde se hizo la inversión, este paso es importante, ya que si no está bien neutralizada la solución nos interferirá durante la titulación del factor.

La solución invertida de la sacarosa se coloca en una bureta y se va añadiendo de dos en dos ml a un matraz Erlenmeyer que contiene: 5 ml de la solución "A", 5 ml de la solución "B", 50 ml de agua destilada y cuerpos de ebullición; se calienta a ebullición y en este momento se empieza a añadir la solución de azúcar invertida. Cuando casi todo el reactivo ha pasado del color azul al color rojo ladrillo (precipitado de Cu_2O), se le añaden unas gotas de azul de metileno y se continua agregando la solución azucarada, muy lentamente, teniendo la precaución de que el reactivo no deje de estar en ebullición.

El final de la reacción se comprueba sacando breves segundos el matraz de la fuente de calor y observando, sobre una superficie blanca la parte superior del líquido, que debe ser incolora y en el fondo un precipitado rojo ladrillo.

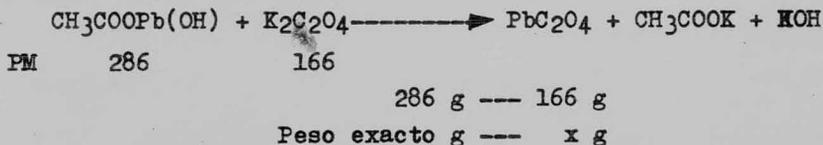
Esta titulación debe tomarse como referencia. Repetirla añadiendo casi todo el volumen de la solución de azúcar, en la titulación anterior, hervir durante 2 minutos, agregar el indicador y continuar la titulación hasta el punto final. Repetir la valoración hasta encontrar dos resultados que concuerden con una diferencia de 0.2 ml.

CALCULO DEL FACTOR:

$$\text{Factor} = a \text{ ml gastados} \times 5$$

Determinación de Azúcares Reductores Directos:

Defecación de la muestra.- Se toma una alícuota de la muestra en un matraz aforado de 100 ml, se agregan de 40 a 50 ml de agua destilada. En un papel se pesa (en balanza analítica) un gramo de subacetato de plomo, éste se va agregando poco a poco, agitando cada vez el matraz, hasta que haya precipitación de las materias grasas y protéicas, (no es necesario agregar todo el subacetato). Se pesa nuevamente el papel para saber por diferencia, la cantidad exacta del subacetato que se añadió, para así, calcular la cantidad de oxalato de potasio necesaria para neutralizar el subacetato, mediante la siguiente reacción:



Calculada la cantidad de oxalato de potasio, se pesa y se agrega al matraz, se agita y se afora a 100 ml. Se deja reposar y se filtra. El filtrado se coloca en la bureta y se titula de manera similar a la valoración del reactivo de Fehling.

CALCULOS:

$$\% \text{ RD.} = \frac{\text{F} \times 100 \text{ v. T} \times 100 \frac{1}{2} \text{ dilución}}{(\text{ml gastados}) \text{ Alícuota } \frac{1}{2} \text{ peso}}$$

Determinación de Azúcares Reductores Totales:

Una alícuota de la muestra se invierte (como se hizo con la sacarosa QP.) se neutraliza, se afora, se defeca, se filtra y se titula de la misma forma que los anteriores, o se puede tomar una alícuo-

ta de la muestra que se defecó para reductores directos, y solamente se hace la inversión, continuando de la misma manera que en los anteriores pasos.

CALCULOS:

$$\% \text{ RT.} = \frac{F \times 100}{\text{PA.}} \times \frac{100}{\text{ml gastados}}$$

PA. Parte Alícuota.

CUESTIONARIO:

1.- ¿ Cree UD. que esté completo el análisis físico químico del vino de mesa. Por que?

2.- Reportar todos los datos en una tabla en por ciento.

METODO DE EVALUACION:

La Dirección General de Normas da los siguientes límites para el vino de mesa:

ESPECIFICACIONES	MINIMO	MAXIMO
Grado alcohólico GL real a 15°C(% de alcohol en volúmen a 15°C).....	6	15
Reductores totales previa inversión g/l	-	80
Acidez total (ac.tartárico) g/l.....	4.0	8.75
Acidez volátil corregida (ac.acético)g/l	-	1.2

La evaluación se hace con los datos reportados por los alumnos, - estos deben ser lógicos, de acuerdo con la tabla reportada y con el criterio del maestro.

BIBLIOGRAFIA:

4,5,6,7,13,18,24,28,34,43,45,53,54,58,63,64.

CAPITULO II.

OBTENCION DE BIOMASA.

- ASPECTOS BIOQUIMICOS DE LA LEVADURA
- DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO.
- DISEÑO DEL MEDIO.
- DISEÑO DEL FERMENTADOR.

PRACTICA No . 2

OBTENCION DE BIOMASA.

OBTENCION DE BIOMASA

Inroducción:

Se llama producción de BIOMASA al proceso mediante el cual se sitúa a un microorganismo (levaduras en este caso) en óptimas condiciones de crecimiento, para obtener su producción en forma amplia y controlada.

USOS Y APLICACIONES:

La biomasa se encuentra ampliamente establecida en el campo industrial, siendo una de las más fuertes en la Industria de Levadura de Panificación en la cual se suele emplear variedades seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae*, (las características generales de éste tipo de levaduras se encuentran reportadas en el inciso "14" en PRUEBAS DE LA ACTIVIDAD DE LA LEVADURA). En la Industria Vinícola en la cual se usan algunas especies de *Saccharomyces* como son: *S. cerevisiae*, *S. beticus*, *S. oviformis* y --- otros, a éstas levaduras se les conoce con el nombre genérico de "Levaduras de Vino". En la Industria Cervecera el *S. cerevisiae* y el *S. carlsbergensis* son los dos microorganismos más usados. En la Industria Farmacéutica las levaduras también se encuentran distribuidas y son utilizadas bajo dos formas principalmente: en pastillas como levadura de cerveza, en suspensiones como levadura Z-37, el primero usado como complemento alimenticio y el segundo como restablecedor de la flora intestinal.

En los últimos años el mundo y principalmente los países en desarrollo como México, se ha presentado una falta en el consumo de proteínas, el alza en los precios de la carne, cereales y granos ha favorecido que las personas de escasos recursos económicos bajen aún más su consumo de proteínas, por ésto es que la presencia de una nueva fuente de proteínas barata es indispensable en un futuro inmediato.

Por lo tanto podemos ver a las levaduras como un nuevo producto nutritivo, portador de una rica fuente de proteínas que pueden ser incluidas en las diferentes dietas, ya sea para consumo animal o para consumo humano.

La proteína microbiana tiene algunas ventajas sobre la proteína derivada de la agricultura como son:

- a).- La proteína unicelular no depende de condiciones climatológicas.
- b).- El tiempo de duplicación de la masa celular es muy corto.
- c).- La proteína unicelular puede ser mejorada por experimentación genética.
- d).- El crecimiento no está limitado por superficie, ni por la escasez de luz solar.
- e).- La proteína unicelular puede ser utilizada fácilmente - como suplemento o complemento de los granos en la alimentación animal.
- f).- La tasa de crecimiento de la proteína unicelular es amenudo quinientas veces más que las fuentes de proteínas vegetales y mil veces mayor que las proteínas animales.

Los principales problemas que se presentan en el uso - de la proteína unicelular son:

- a).- Los procesos de proteína unicelular son nuevos y se requiere un período de tres a cinco años para la construcción de plantas a escala industrial.
- b).- En el caso de la alimentación humana, la composición - del producto de proteína unicelular, debe ser analizada cuidadosamente para asegurar la ausencia de impurezas que podrían causar daños a la salud.
- c).- La necesidad de desarrollar diferentes medios para introducir la proteína unicelular dentro de la dieta convencional.

ASPECTOS BIOQUIMICOS DE LA LEVADURA:

Metabólicamente la levadura es predominantemente anaerobea facultativa, este microorganismo es capaz de crecer de dos modos: en ausencia de aire (fermentación), o en presencia de éste (respiración; metabolismo oxidativo).

La presencia de oxígeno molecular, induce a cambios en la producción de energía en el metabolismo, lo cual repercute en el proceso de respiración a una fermentación.

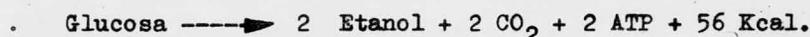
El metabolismo de la levadura como el de otros microorganismos consiste en generar energía o mecanismos degradativos (catabolismos) y consumo de energía o biosíntesis (anabolismo), los cuales involucran una transferencia de grupos de átomos o electrones. El crecimiento es el resultado del balance de la reacción oxidación-reducción. Parte de esta energía libre obtenida en el catabolismo es conducida a la biosíntesis de proteínas y otras necesidades de la célula.

Metabolismo Anaerobio:

Por definición la fermentación es un proceso anaerobio, en el cual hay una transformación de carbohidratos y liberación de energía.

La transformación de glucosa a ácido pirúvico es conocida como vía de Embden-Meyerhof.

La fermentación significa la conversión de hexosas, principalmente: glucosa, fructosa, ~~manosa~~, galactosa, en ausencia de aire a dióxido de carbono, etanol y energía.



Al rededor del 40 % de esta energía es liberada como calor, el resto es preservada en los enlaces finales de fosfato en la molécula de ATP (Adenosin Trifosfato).

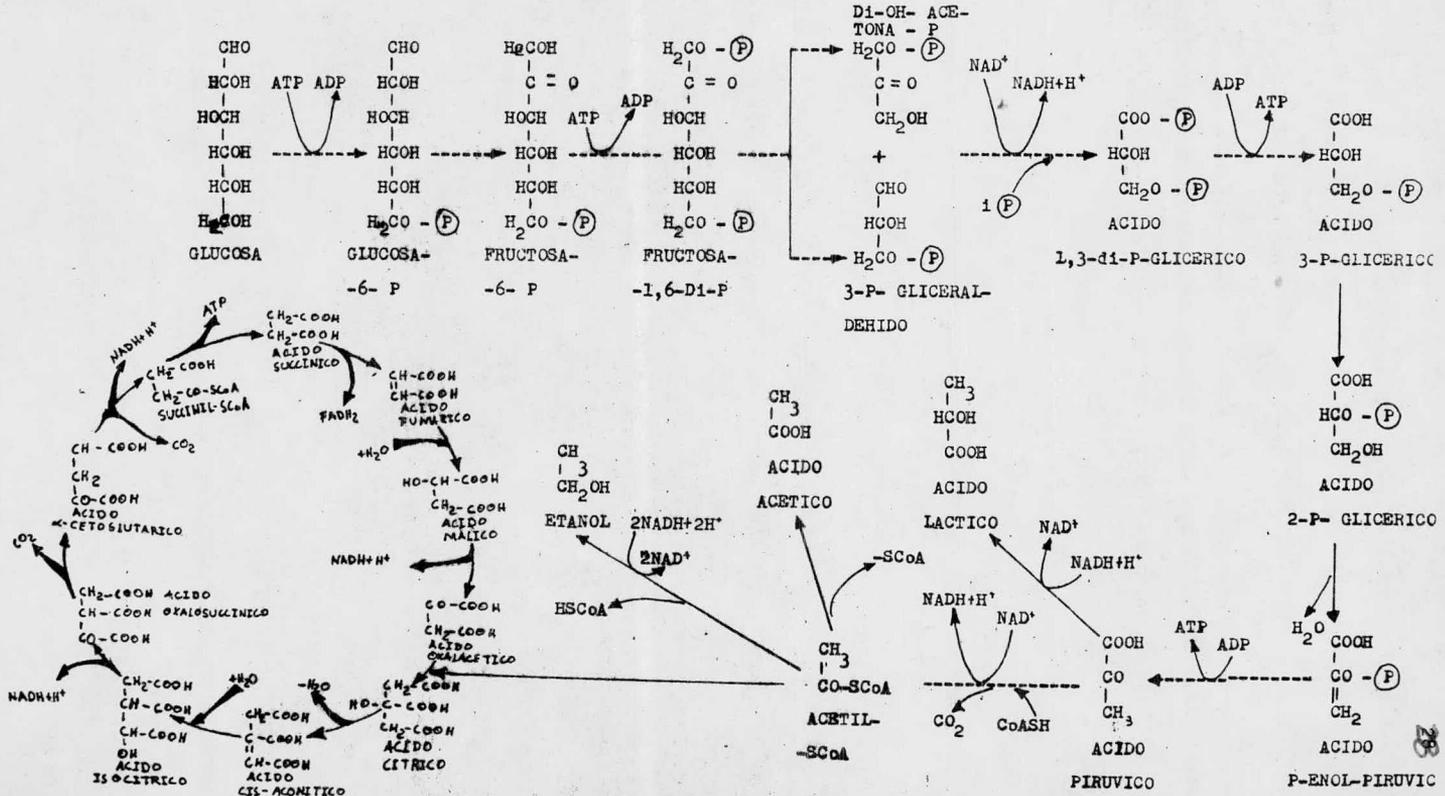
Cuando menos el 95 % de glucosa catabolizada por levaduras, va a etanol y dióxido de carbono vía Embden-Meyerhof, también se obtienen otros productos en menor cantidad como: glicerol, ácidos orgánicos, aceite de fúsel (que es una mezcla de alcoholes de alto peso molecular, principalmente, pentanoles, butanoles, y propanoles).

Metabolismo Aerobio:

Para las levaduras el metabolismo aerobio o respiración es predominante ya que es el mecanismo productor de energía, de la célula.

El camino oxidativo conocido como el, ciclo de los ácidos tricarboxílico o ciclo de Krebs, es el encargado de proporcionar las estructuras de los carbonos utilizados en la síntesis de aminoácidos y para la construcción de múltiples macromoléculas constituyentes de la célula.

INTERRELACION DE LAS VIAS METABOLICAS



OBJETIVO:

La obtención de BIOMASA a nivel laboratorio así como los controles que se requieren.

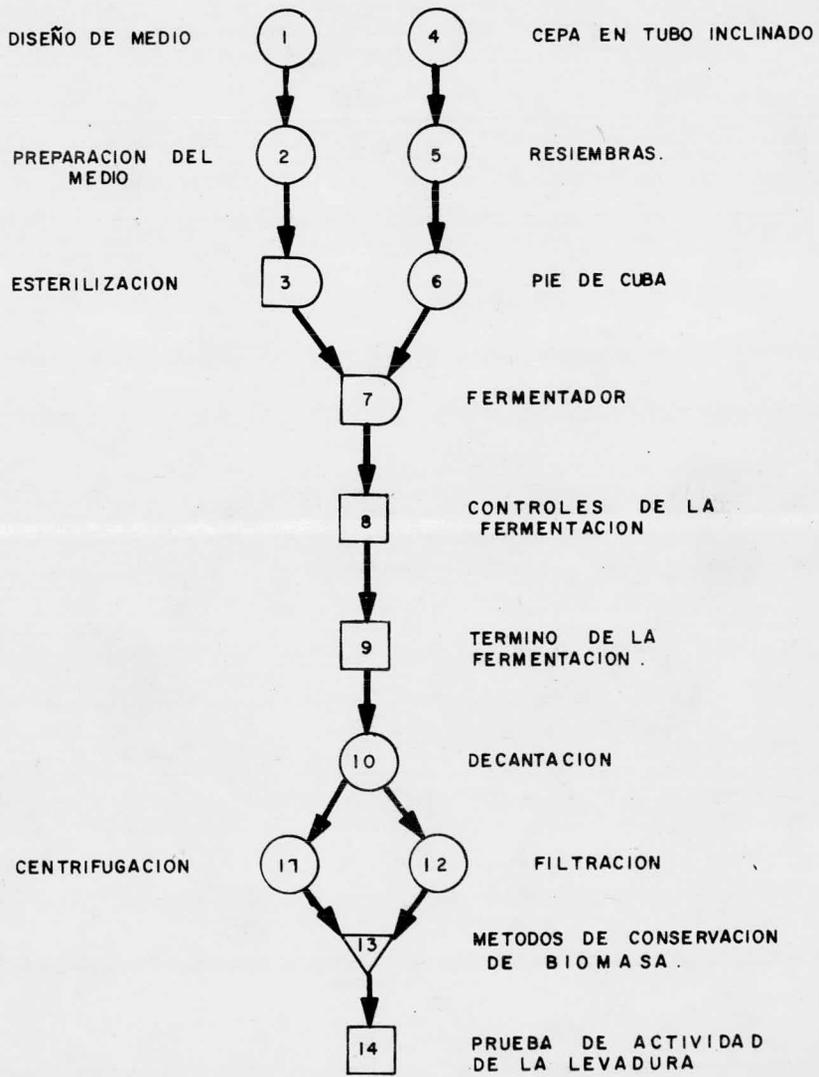
MATERIAL:

- Fermentador:
 - Un frasco de boca ancha de 3000 ml
 - Un tapón de hule (del tamaño de la boca del frasco)
 - Una bomba de aireación
 - Un termostato
 - Tubo de vidrio de 5 mm \emptyset
 - Manguera de hule de 5 mm \emptyset
 - Una bujía (piedra para romper la burbuja de aire)
 - Un embudo de separación
 - Algodón
- Cinco matraces Erlenmeyer de 250 ml
- Dos pipetas volumétricas de 5 ml
- Un matraz aforado de 100 ml
- Una bureta de 50 ml
- Mechero con manguera
- Tripie y tela de asbesto
- Un termómetro de - 10° a 260°C
- Un embudo de cola larga
- Cuerpos de ebullición
- Papel pH
- Papel filtro

REACTIVOS:

- Solución de Fehling "A"
- Solución de Fehling "B"
- Solución de NaOH concentrada
- Solución de NaOH 0.1 N
- Solución de HCl concentrada
- Solución de HCl 0.1 N
- Solución de Fenolftaleína
- Solución de Azul de Metileno
- Metabisulfito de Potasio
- Oxalato de Potasio
- Subacetato de Plomo

DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO PARA LA OBTENCIÓN DE
" B I O M A S A "



DESCRIPCION DE LAS OPERACIONES

- DISEÑO DE MEDIO

El requerimiento c elular fue propuesto por el Dr. Jhonson de la Universidad de Wisconsin el cual realizó un estudio de la composición de la levadura (47) cuya síntesis se encuentra en la tabla.- El microorganismo para su crecimiento necesita de diferentes fuentes nutritivas, entre las más importantes tenemos:

La fuente de Energía y la fuente de Carbono las cuales se toman de Carbohidratos (Hexosas, también necesita de una fuente de Nitrógeno y Minerales que se toman de sales inorgánicas, las vitaminas y los cofactores necesarios se a adiran al momento de iniciar la producción de BIOMASA.

CALCULO DEL MEDIO

a).- Fuente de Energía.

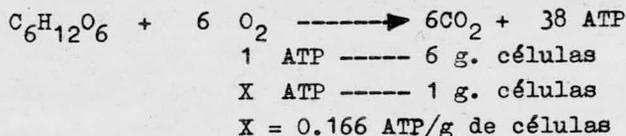
Esta energía esta dada en forma de Adenosin Trifosfato (ATP) el cual se forma a partir de Adenosin Difosfato (ADP). Durante la oxidación de los Carbohidratos a CO_2 en la glicol sis y el ciclo de Krebs.

Tabla No.

COMPOSICION DE LAS LEVADURAS (en base seca)	
ELEMENTO	% EN PESO
Carbono	50.0
Nitrógeno	10.0
Oxígeno	26.0
Hidrógeno	10.0
Fósforo	2.0
Calcio	0.9
Potasio	0.5
Azufre	0.35
Magnesio	0.17
Sodio	0.15
Zinc	0.017
Fierro	0.01
Manganeso	0.003
Cobre	0.002

Vía Metabólica	Número de Moles de ATP Formados	
	Algas, Levaduras y Hongos	Bacterias
Glicólisis:		
Glucosa \rightarrow 2 piruvato	2	2
Oxidación de:		
2 NADH + 2H ⁺	2 x 3 = 6	2 x 1 = 2
Ciclo del ATC		
Piruvato \rightarrow 3CO ₂ + 3H ₂ O		
Oxidación de:		
4 NADH + 4H ⁺	4 x 3 = 12	4 x 1 = 4
1 FADH ₂	1 x 2 = 2	1
Succinil SCoA \rightarrow 1 ATP	1 = 1	1
	15	6
2 Piruvato \rightarrow 6CO ₂ + 6H ₂ O	2 x 15 = 30	2 x 6 = 12
Glucosa + 3O ₂ \rightarrow 6CO ₂ + 6H ₂ O	38	16

Por lo tanto se puede ver que la Oxidación de una mol de - Hexosa nos produce 38 ATP. Sabemos que cada ATP producido proporciona la Energía suficiente para obtener seis gramos de células (1)



$$180 \text{ g Hexosa --- } 38 \text{ ATP}$$

$$X \text{ g Hexosa --- } 0.166 \text{ ATP}$$

$$X = 0.786 \text{ g Hexosa/g células}$$

b).- Fuente de Carbono.

La fuente de carbono representa el 50 % de los requerimientos de la levadura en base seca.

$$1 \text{ g células --- } 0.5 \text{ g Carbono}$$

$$180 \text{ g Hexosa --- } 72 \text{ g Carbono}$$

$$X \text{ g Hexosa --- } 0.5 \text{ g Carbono}$$

$$X = 1.25 \text{ g Hexosa/g células}$$

Por lo tanto para producir 1 g de células se necesita:

0.786 g Hexosa como Fuente de Energía

1.250 g Hexosa como Fuente de Carbono

2.036 g Hexosa total

2.036 g de Hexosa como Fuente total para un gramo de células.

c).- Fuente de Nitrógeno.

1 g de células necesita 0.1 g de nitrógeno. Este se va a --
agregar en forma de fosfato de amonio dibásico.

132.15 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ --- 28 g nitrógeno

x g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ --- 28/g nitrógeno

x = 0.472 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ /g células

d).- Fuente de Fósforo.

El fósforo no es necesario agregarlo ya que va incluido en
varias fuentes en forma de iones, fosfato y excede al 2 % --
del fósforo requerido.

e).- Fuente de Calcio.

1 g de células necesita 0.9/g de calcio y se añade como clo
ruo de calcio.

110.9 g CaCl_2 --- 40 g calcio

x g CaCl_2 --- 0.009 g calcio

x = 0.0249 g CaCl_2 /g células

f).- Fuente de Potasio.

La fuente de potasio representa el 0.5 % de los requerimien
tos de la levadura y se adiciona en forma de sulfato de --
potasio.

174.27 K_2SO_4 --- 78 g potasio

x g K_2SO_4 --- 0.005 g potasio

x = 0.011 g K_2SO_4 /g células

g).- Fuente de Azufre.

La fuente de azufre no se añade por formar parte de las ---
fuentes de potasio, magnesio, manganeso, zinc, sodio, fie
rro y cobre lo cual sobrepasa lo necesario para el microor
ganismo.

h).- Fuente de Magnesio.

El magnesio que se requiere es de 0.17 % y se agrega en forma de sulfato de magnesio heptahidratado.

$$246.3 \text{ g MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \text{ --- } 24.3 \text{ g magnesio}$$

$$x \text{ g MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \text{ --- } 0.0017 \text{ g magnesio}$$

$$x = 0.017 \text{ g MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g células}$$

i).- Fuente de Manganeseo.

La fuente de manganeseo es el 0.003 % de los requerimientos del microorganismo y se añade como sulfato de manganeseo hidratado.

$$168.94 \text{ g MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} \text{ --- } 54.94 \text{ g manganeseo}$$

$$x \text{ g MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} \text{ --- } 0.00003 \text{ g manganeseo}$$

$$x = 0.0000922 \text{ g MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O/g células}$$

j).- Fuente de Zinc.

El zinc que se requiere es del 0.017 % y se agrega como sulfato de zinc heptahidratado.

$$287.54 \text{ g ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \text{ --- } 65.37 \text{ g zinc}$$

$$x \text{ g ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \text{ --- } 0.00017 \text{ g zinc}$$

$$x = 0.000747 \text{ g ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O/g células}$$

k).- Fuente de Cobre.

La fuente de cobre es del 0.002 % de los requerimientos de la levadura y se añade en forma de sulfato de cobre pentahidratado.

$$249.68 \text{ g CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \text{ --- } 63.54 \text{ g cobre}$$

$$x \text{ g CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \text{ --- } 0.00002 \text{ g cobre}$$

$$x = 0.0000785 \text{ g CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O/g células}$$

l).- Fuente de Sodio.

El sodio corresponde al 0.15 % de los requerimientos de la levadura y se adiciona en forma de cloruro de sodio.

$$58.44 \text{ g NaCl} \text{ --- } 22.99 \text{ g sodio}$$

$$x \text{ g NaCl} \text{ --- } 0.0015 \text{ g sodio}$$

$$x = 0.00381 \text{ g NaCl/g de células}$$

.- Fuente de Hierro.

La fuente de hierro representa el 0.017 % de los requerimientos de la levadura y se añade, como sulfato ferroso.

278.03 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ --- 55.84 g hierro

x g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ --- 0.00017 g hierro

x = 0.000846 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /g células

CUADRO DE REQUERIMIENTOS

ELEMENTO	g/l NECESARIOS	g DE LA SAL A AÑADIR	
Carbono	0.50	2.036	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
Nitrógeno	0.10	0.472	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
Calcio	0.009	0.0249	CaCl_2
Potasio	0.005	0.011	K_2SO_4
Magnesio	0.0017	0.017	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Sodio	0.0015	0.00381	NaCl
Zinc	0.00017	0.000747	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Hierro	0.0001	0.000846	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Manganeso	0.00003	0.0000922	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Cobre	0.00002	0.0000785	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

*) NOTA: Datos reportados para la obtención de un gramo de ---- células por litro de medio.

.- Preparación del Medio.

Se pesan cuidadosamente todas y cada una de las sustancias en una balanza analítica. Se disuelven las sales en las dos terceras partes del volumen total de agua y los carbohidratos en el volumen restante.

.- Esterilización.

Se esteriliza el medio a una temperatura de 121°C y una presión de 1.4 Kg/cm^2 durante 10 minutos. Después de esterilizar se enfría al medio al chorro de agua, una vez frío se mezclan las dos soluciones teniendo cuidado de hacerlo en una zona estéril. A continuación se mide y ajusta el pH el cual debe de estar en un rango de 4.5 a 4.7

- Cepa en Tubo Inclinado

A los alumnos se les proporciona un tubo con medio inclinado que contiene la cepa a trabajar, este microorganismo puede ser: *Saccharomyces cerevisiae* ó *Candida utilis*. Ambos microorganismos se encuentran clasificados y están a disposición de los alumnos en el laboratorio de Tecnología de Alimentos.

CLASIFICACION

S.	c.	NRRL Y-567
C.	u.	ATCC Y-900
C.	u.	AT Y-4256

- Resiembra.

Se toman 50 ml del medio en donde se procede a resembrar el microorganismo, una o dos asadas son suficientes para la incorporación del microorganismo en un medio líquido.

Las condiciones en que se debe de poner el microorganismo son:

MICROORGANISMO	TEMPERATURA OPTIMA	pH
<i>cerevisiae</i>	28 - 30° C	4.5 4.7
<i>utilis</i>	30 - 32° C	4.5 4.7

El medio es sometido a un sistema de incorporación de oxígeno ya sea por cualquiera de los métodos comunes como son: una mesa de agitación ó una barra magnética, con una bomba de aireación, esta debera de contener una bujía para romper la burbuja de aire y aumentar la superficie de contacto de estas y por lo tanto favorecer un aumento en el oxígeno disuelto en el medio.

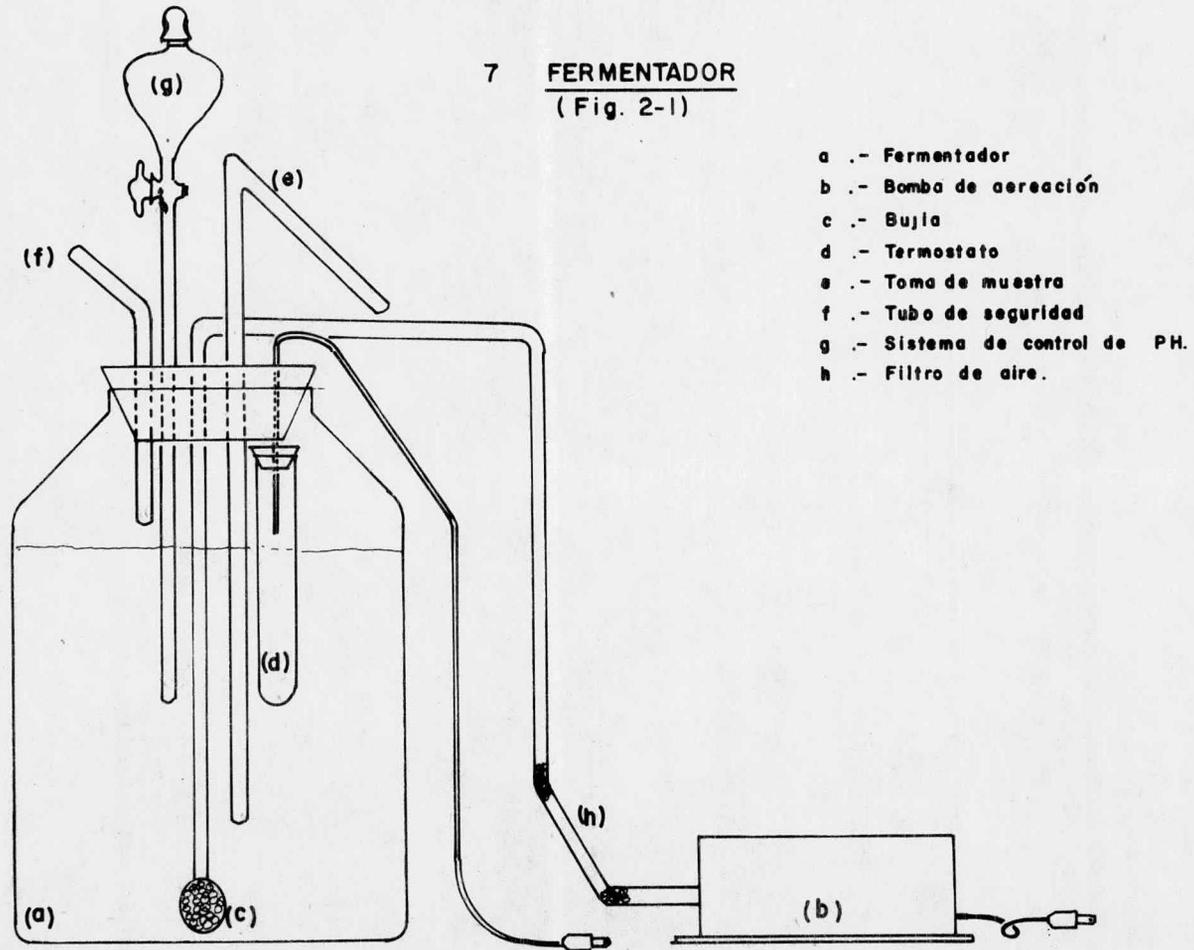
- Pie de Cuba

Una vez que se observa desarrollo en el matraz se procede a aumentar el volúmen hasta un 10 % del volúmen final del fermentador. Las condiciones de oxígeno disuelto, pH y temperatura, deben ser las mismas.

7.- Fermentador. (Fig. 2.1)

- a.- Aparato para el crecimiento de la levadura, él cual es manuable y adecuado para la producción de biomasa.
- b.- Bomba de Aireación.- La aireación es uno de los factores de mayor importancia en la producción de biomasa. Ya que es esencial al proporcionar un volumen adecuado de aire en burbujas suficientemente finas para que se efectúe la oxigenación eficiente del medio.
- c.- Bujía.- La finalidad de la bujía es fraccionar la burbuja de aire, aumentando la superficie de contacto entre el medio y el oxígeno; obteniéndose mayor cantidad de oxígeno disuelto, estimulando el desarrollo del microorganismo aerobio, además de ayudar a la agitación del medio.
- d.- Termostato.- Sirve para mantener la temperatura constante durante la fermentación este factor es importante para que el microorganismo se desarrolle mejor y en menor tiempo. La temperatura al comenzar la fermentación se mantiene a 25° - 26°C y gradualmente se permite que suba hasta 30°C en el final de la fermentación.
- e.- Toma de Muestra.- Se construye de acuerdo al inciso (e) de la figura 2.1, haciendo un doblez de 60° del tubo de vidrio, con lo que se facilitan las tomas de muestras, además de que no se contamina el medio al momento de tomar una muestra.
- f.- Tubo de Seguridad.- Este sistema se usa como medida de seguridad, para la presión que ejerce la bomba de aireación, ya que de no contar con este puede llegar a destapar el fermentador, provocando esto una posible contaminación del medio.
- g.- Sistema de Control de pH.- El pH se mantiene ajustando el medio cada vez que sea necesario con adición de hidróxido de amonio o ácido sulfúrico.
- h.- Filtro de Aire.- Se construye este filtro, para evitar que entre al medio en fermentación microorganismos provenientes del sistema de alimentación de oxígeno.

7 FERMENTADOR
(Fig. 2-1)



Este filtro puede elaborarse por medio de diferentes materiales como: algodón-carbón activado-algodón; fibra de vidrio-carbón activado-fibra de vidrio.

Este sistema debe ser adaptado a la salida del aire de la bomba de aireación.

.- Controles de la Fermentación

Estos controles son físicos y químicos, dentro de los primeros están: Temperatura, Agitación, Cantidad de Oxígeno que entra al sistema, Determinación de Biomasa.

Los controles químicos son: pH, Acidez Volátil, Acidez Total, Acidez Fija, Reductores Totales, Reductores Directos.

Estos controles se deben efectuar de preferencia dos veces al día durante el transcurso de la fermentación.

.- Termino de la Fermentación.

El final de la fermentación es detectado por la sustancia nutritiva limitante, siendo en este caso los carbohidratos. La determinación de azúcares indica el momento en que la fermentación ha concluido. Cuando esto sucede se desconecta el sistema de aireación y se deja reposar para que los microorganismos se depositen en el fondo.

), 11, 12.- Métodos de Separación.

Se utilizan los métodos de separación de sólidos de un sistema líquido como son: decantación, centrifugación y filtración.

3.- Métodos de Conservación de Biomasa.

Existen diversos sistemas de conservación de microorganismos, entre los más importantes se encuentran:

- Resiembras en placas y tubos
- Deseccación.
- Liofilización.

De éstos, el de más fácil acceso para el estudiante es el método de secado en una estufa a 40°C debiendo tener cuidado que la temperatura no exceda a 45°C.

El por ciento de humedad de la biomasa es importante debido a que de ésta depende el que la levadura se conserve ya que puede sufrir la autólisis ó autosolubilización, esto ocurre cuando las enzimas de la levadura, principalmente ---

proteasas, que digieren los compuestos de alto peso molecular de la célula de levadura.

El proceso puede ser inducido por calentamiento de la levadura, a una temperatura en la cual la célula se muere y en donde la actividad de la enzima es alta (al rededor de 50°C)

La autólisis ocurre naturalmente en vinos y en otras fermentaciones, si la célula de levadura queda en contacto con el líquido fermentado después de haber terminado la fermentación. La autólisis puede ser estimulada por incremento de la temperatura (30 a 55°C) por adición de agentes plasmólizantes (sales) o por adición de cloroformo o acetato de etilo, los cuales afectan la permeabilidad de la pared celular.

Durante la autólisis las macromoléculas son hidrolizadas a pequeñas moléculas por las enzimas: carbohidrasas, nucleasas, proteasas, y otras. Este factor es utilizado para la creación de autólizado de levadura o más comunmente conocido como extracto de levadura, substancia que tiene un gran empleo en la preparación de medios de cultivo para el microorganismo.

Contaminaciones.

La producción de biomasa normalmente contiene otros microorganismos, aunque estos se encuentran en una cantidad mínima, entre los más comunmente reportados se encuentran: bacterias del género *Leuconostoc*, organismos homofermentativos del género *Lactobacillus*, algunos coliformes usualmente *Aerobacter aerogenes* y ocasionalmente *E. coli*, esporas *B. subtilis* y levaduras salvajes; *Cándida utilis* o *Rhodotorula*. Se ha encontrado que las siguientes especies crecen más rápidamente que el *S. cerevisiae* en cultivos mixtos y son:

S. paradoxus, *C. utilis*, *T. minor*, *C. krusei*, *C. mycoderma*.

Se sabe también que en pequeñas concentraciones que van de 5 a 10 %, las levaduras salvajes aumentan la producción final de biomasa, pero tienen el inconveniente de hacer decrecer la actividad y estabilidad de la levadura.

Prueba de Actividad de la Levadura

Características generales de las levaduras.- Las levaduras deben tener ciertas propiedades para poder ser utilizadas en la industria de la panificación como es: Estabilidad Bioquímica ----

(características uniformes y constantes), capacidad para fermentar la masa de harina vigorosamente (excelente potencia - hinchadora de la masa), fácil dispersabilidad en agua, buenas cualidades de conservación (posibilidad de resistir a la autólisis) y buena apariencia durante un período razonable, a las temperaturas normales de manipulación así como la capacidad para reproducirse perfectamente y con buen rendimiento en el medio de propagación.

Determinación del tiempo de fermentación.

Se pesan 5 g de levadura y se mezclan con 160 ml de una solución isotónica al 2.5 % y se añaden a 250 g de harina de trigo, se calienta todo previamente a 35°C

Se amasa durante 5 minutos y se pasa a un molde engrasado, - que tiene las siguientes medidas:

15 cm. de longitud

10 cm. de ancho

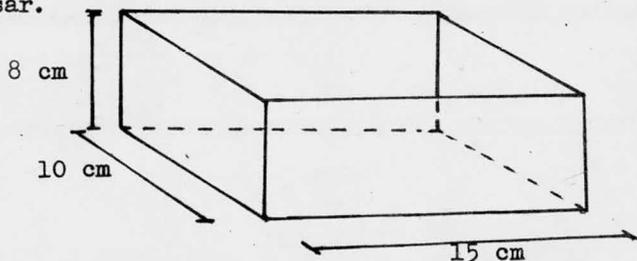
8 cm. de altura

Se introduce en la masa una varilla graduada en centímetros - y se mete en una estufa que esté a 35°C anotando el tiempo - que tarda en subir la masa 1 centímetro

Clasificación de la levadura:

TIEMPO (min.)	CLASE
70 - 80	Muy Buena
81 - 90	Buena
91 - 100	Satisfactoria
101 - más	Insuficiente

El tiempo de la fermentación se considera desde el momento - en que se coloca la levadura mezclada con la harina, para -- amasar.



- Determinación de Humedad

Se pesan de 2 a 3 g de levadura en un pesafiltro puesto a peso constante, se seca en la estufa a 40°C se enfría en un de secador y se pesa de nuevo. Calcular el por ciento de humedad.

- Determinación del Poder de Conservación

Parte de la levadura obtenida se comprime en un tubo de ensayo y se incuba a 35°C durante 4 días. La levadura no debe -- presentar ningún cambio.

Pesar de 2 a 3 g de levadura en una caja Petri, manteniéndola a temperatura ambiente durante 6 días. La levadura no debe -- presentar ningún cambio.

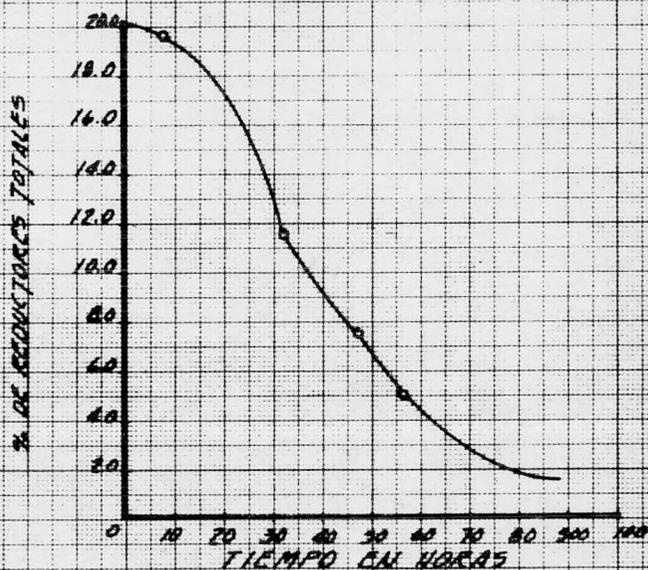
CUESTIONARIO.

- 1.- ¿Como influyen los macro y micro nutrientes en el metabolismo de los microorganismos?
- 2.- Explique el mecanismo de la fermentación desde el punto de vista bioquímico.
- 3.- Mencione 4 usos de la levadura a nivel industrial.
- 4.- Explique un método industrial para la obtención de --- biomasa.
- 5.- Gráfica y tabla de acidéz total Vs. tiempo.
- 6.- Gráfica y tabla de reductores totales Vs. tiempo.
- 7.- Resultados de la prueba de actividad de la levadura.

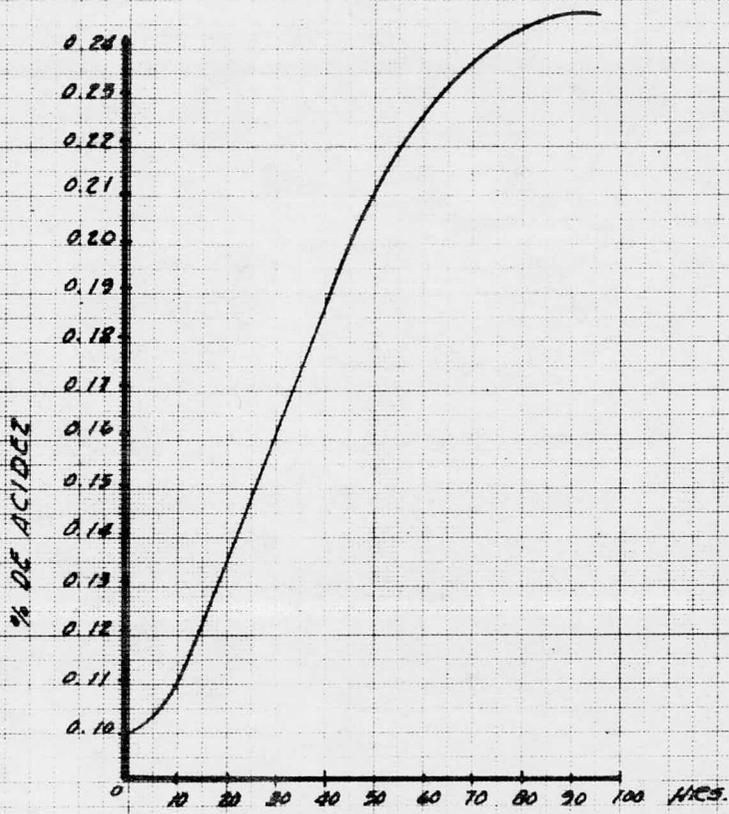
BIBLIOGRAFIA.

1,7,8,9,15,17,19,20,21,25,28,29,30,35,37,40,42,47,48,51,52,61,67.

OBTENCION DE BIOMASA



TIEMPO	% R.T.
0	20.29
8	19.38
24	16.86
32	11.52
48	7.54
56	4.94
72	3.71
80	1.89



TIEMPO	% ACIDEZ
0	0.098
8	0.102
24	0.141
32	0.171
48	0.199
56	0.218
72	0.238
80	0.240
96	0.242

OBTENCION
DE
BIOMASA.

PRACTICA No. 2

OBTENCIÓN DE BIOMASA

- I.- OBJETIVO: La obtención de biomasa a nivel laboratorio, así como el aprendizaje de los controles que se requieren durante el proceso.
- II.- MATERIAL:
- Fermentador:
 - Un frasco de boca ancha de 3000 ml.
 - Un tubo de vidrio de 5 mm ϕ .
 - Un tapón de hule (del tamaño de la boca del frasco).
 - Una bomba de aireación.
 - Una manguera de hule de 5 mm ϕ .
 - Una bujía (piedra para romper la burbuja de aire)
 - Cinco matraces Erlenmeyer de 250 ml.
 - Un matraz aforado de 100 ml.
 - Una bureta de 50 ml.
 - Tres pipetas volumétricas de 5 ml.
 - Un termómetro de - 10 a 260°C.
 - Cuerpos de ebullición.
 - Papel pH.
 - Papel filtro.
- III.- REACTIVOS:
- Solución de Fehling "A"
 - Solución de Fehling "B"
 - Solución de NaOH concentrada.
 - Solución de NaOH 0.1 N.
 - Solución de HCl concentrada.
 - Solución de HCl 0.1 N.
 - Solución de fenolftaleína.
 - Solución de azul de metileno.
 - Metabisulfito de potasio.
 - Oxalato de potasio.
 - Sub acetato de plomo.
- IV.- EXPERIMENTO:
- Se monta el fermentador (*), se esteriliza junto con sus implementos, con una solución de metabisulfito de potasio (150mg/l)

En la preparación del medio (*) se pesan todas y cada una de las sustancias en una balanza analítica, se disuelven las sales en las dos terceras partes del volumen total de agua, y los carbohidratos en el volumen restante.

Se esteriliza el medio a una temperatura de 121°C y una presión de 1.4 Kg/cm² durante 10 minutos. Después de esterilizar se enfría el medio al chorro de agua, una vez frío, se mezclan las dos soluciones teniendo cuidado de hacerlo en una zona estéril, una vez en el fermentador se mide y se ajusta el pH, el cual debe de estar en un rango de 4.5 a 4.7.

Se hace un pie de cuba para que el microorganismo se adapte al nuevo medio de crecimiento, esto se hace colocando en un matraz estéril de 250 ml, 100 ml del medio diseñado y el inóculo (un 10%) proporcionado por el maestro del laboratorio, (el microorganismo puede ser *Candida utilis* o *Saccharomyces cerevisiae*) se le adapta un sistema de incorporación de aire, como puede ser; el colocar el matraz en una mesa de agitación o con una bomba de aireación (bomba de pecera) con una bujía para romper la burbuja de aire y aumentar la superficie de contacto del oxígeno con el medio.

Una vez que se observa desarrollo en el matraz, se vacía su contenido en el fermentador, empezando a contar desde este momento el tiempo de fermentación.

Controles en la Fermentación. - Estos son físicos y químicos, dentro de los primeros están: Temperatura, Agitación, Cantidad de oxígeno que entra al sistema y Determinación de biomasa.

Los controles químicos son: pH, Acidez Volátil, Acidez Fija, Acidez Total, Reductores Directos y Reductores Totales. Estos controles se llevan a cabo dos veces al día, durante el transcurso de la fermentación. El final de la fermentación será detectado, cuando ya no se encuentre en el medio la sustancia nutritiva limitante que en este caso son los carbohidratos, cuando esto sucede se desconecta el sistema de aireación y se deja reposar para que los microorganismos se depositen en el fondo. Para la separación de la biomasa del medio, se pueden utilizar los métodos de: decantación, centrifugación y filtración.

Para la conservación de los microorganismos se les somete a un proceso de secado en una estufa a 40°C.

PRUEBAS PARA LA DETERMINACION DE LA CALIDAD DE LA LEVADURA.

1.- Determinación del Tiempo de Fermentación.

Se pesan 5 g de levadura y se mezclan con 160 ml de una solución isotónica al 2.5 %, se añaden 250 g de harina de trigo - (todo esto calentado previamente a 35°C, se amasa durante 5 minutos y se pasa a un molde engrasado, el cual tiene las siguientes medidas: 15 cm de longitud, 10 cm de ancho y 8 cm de altura. Se introduce en la masa una marilla graduada en centímetros y se mete en una estufa a 35°C. Anotando el tiempo que tarda en subir la masa un centímetro.

Clasificación de la levadura:

TIEMPO(min.)	CLASE
70 - 80	Muy Buena
81 - 90	Buena
91 - 100	Satisfactoria.
101 - más	Insuficiente

El tiempo de la fermentación se considera desde el momento en que se coloca la levadura mezclada con la harina para amasar.

2.- Determinación del Poder de Conservación.

- a.- A una parte de la levadura obtenida se le comprime en un tubo de ensaye y se incuba a 35°C durante 4 días. La levadura no debe presentar ningún cambio.
- b.- Pesar de dos a tres g de levadura en una caja petri, manteniéndola a temperatura ambiente durante 6 días. La levadura no debe presentar ningún cambio.

3.- Determinación de Humedad.

Se pesan de 2 a 3 g de levadura en un pesafiltro puesto a peso constante, secar en la estufa a 105-108°C durante 4 horas, enfriar en desecador y pesar de nuevo. Calcular en por ciento la humedad.

V.- CUESTIONARIO:

- 1.- ¿ Como influyen los macro y micronutrientes en el metabolismo de los microorganismos ?
- 2.- Explique el mecanismo de la fermentación desde el punto de vista bioquímico.

- 3.- Mencione cuatro usos de la levadura a nivel industrial.
- 4.- Explique un método industrial para la obtención de bio masa.
- 5.- Gráfica y tabla de acidez total Vs. tiempo.
- 6.- Gráfica y tabla de reductores totales Vs. tiempo.
- 7.- Resultado de las pruebas para la determinación de la - calidad de la levadura.

VI.- METODOS DE EVALUACION:

El alumno será evaluado en función de los siguientes pa rámetros:

- Rendimiento de la fermentación (optimo de 3 a 4 g de cé lulas por litro en base seca)
 - Todos los datos obtenidos en los controles de la fermen tación reportados en gráficas y tablas.
 - Determinación del tiempo de fermentación (aceptable de 70 a 90 minutos).
- Resultados de la determinación del poder de conservación.

(*) NOTA: Tanto el diseño del medio como la fabricación del fer mentador son dados por el maestro en una clase previa a la sesión de laboratorio.

BIBLIOGRAFIA:

1,7,8,9,15,17,19,20,21,25,28,29,30,35,37,40,42,47,48,51,52,61,67.

CAPITULO III.

FERMENTACION ALCOHOLICA.

- BIOQUIMICA DE LA FERMENTACION ALCOHOLICA.
- CLASIFICACION DE BEBIDAS ALCOHOLICAS.
- DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO.

PRACTICA No. 3

ELABORACION DE VINO DE MESA.

PRACTICA No. 4

ELABORACION DE RON.

FERMENTACION ALCOHOLICA.

INTRDUCCION:

Una de las industrias más amplias y abundantes dentro del ramo de productos fermentados es la industria de obtención de alcohol. Su diversificación es tal que podemos obtener alcohol de casi todos los productos que contengan hidratos de carbono.

El etanol es obtenido por la acción de las levaduras sobre los azúcares fermentables. Las materias primas pueden clasificarse en tres grupos principalmente:

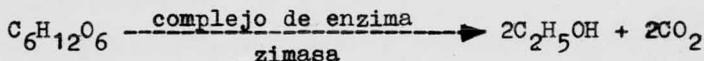
- a.- Materias con alto contenido de sacarosa.- Como azúcar de caña, melazas y jugos de frutas.
- b.- Materias que contienen almidón.- Este grupo comprende todos los cereales como son: maíz, malta, cebada, avena, centeno, trigo, arroz, sorgo y otros. También incluye a las patatas, batatas o boniatos, pataca (girasol), yuca y otras substancias.
- c.- Materias celulósicas.- Como la madera y los residuos de fabricación de la pasta de papel.

BIOQUIMICA DE LA FERMENTACION ALCOHOLICA.

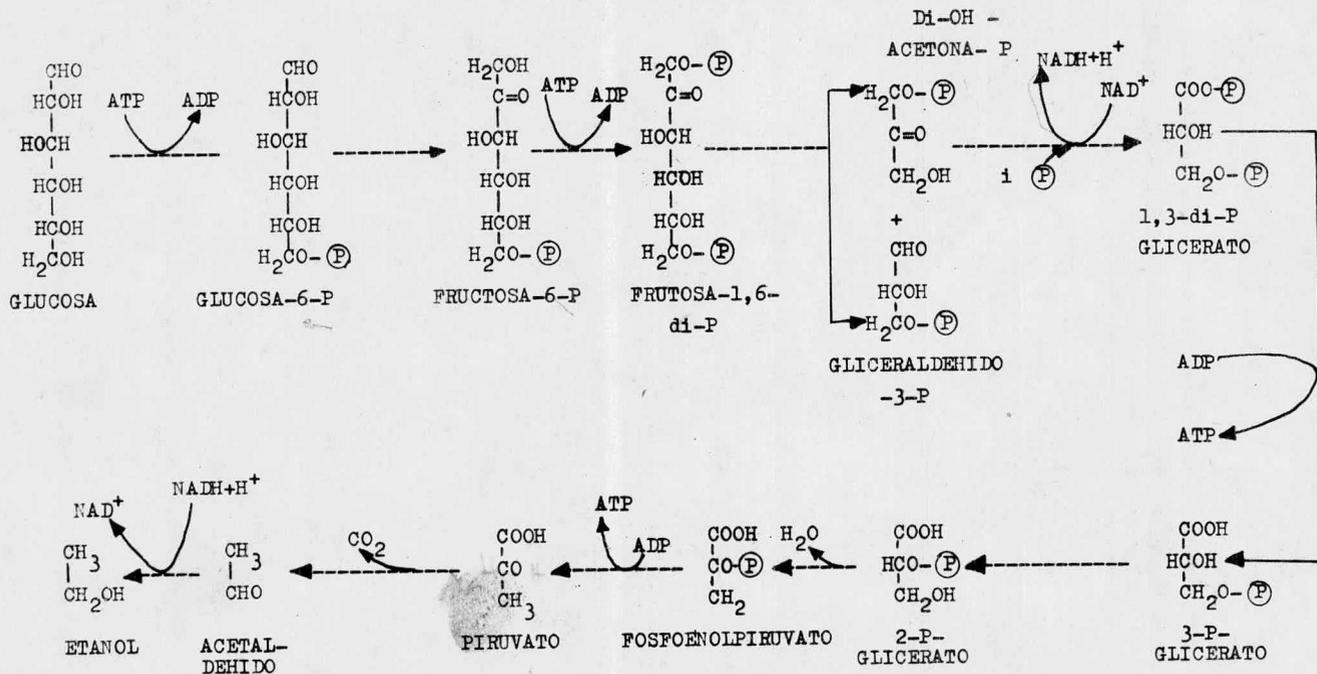
La ruta metabolica por la cual los microorganismos utilizan los carbohidratos y los pasos para el rompimiento anaerobio de la glucosa a piruvato es la vía de la Glicólisis o ruta Embden-Meyerhof pasando despues de piruvato a etanol.

En realidad, intervienen gran número de reacciones estrechamente relacionadas que pueden dividirse en pasos de oxidación-reducción y fosforilación, y ciertas reacciones especiales. Todas esas reacciones son catalizadas por enzimas específicas.

Una ecuación que representa simplemente el proceso total por el cual el azúcar es transformado en etanol y dióxido de carbono es la siguiente:



BIOQUIMICA DE LA FERMENTACION
ALCOHOLICA



** (P) = H₂PO₃

CLASIFICACION DE BEBIDAS ALCOHOLICAS

BEBIDAS ALCOHOLICAS	MATERIA PRIMA	CARACTERISTICAS ESPECIFICAS	GL°
I.- PRODUCTOS NO DESTILADOS. - Fermentación Alcohólica directa.			
a).- Pulque	Agua Miel (Maguey pulquero)	"1" Líquido translúcido, de color ambarino, de olor y sabor característicos	2° a 4°
b).- Tepache	Jugo de piña cascara de piña, azúcar.	Bebida de moderación	1° a 3°
c).- Vinos:			
1.- Vino Tinto	Uvas	"2" Líquido alcohólico transparente de color y sabor característicos. Dulces o secos: de mesa De postre	12° a 14° 14° a 21°
2.- Vino Rosado	Uvas		
3.- Vino Blanco	Uvas		
4.- Champaña	Vino Blanco, Azúcar de 4a4.3 g/l. Acido cítrico.	Vino Efervecente	12°
d).- Vinos de otros frutos			
1.- Sidra	Manzana o pera	"3" Líquido transparente diáfano de color amarillo claro o ambarino de olor y sabor a manzanas y/o peras.	6°
FERMENTACION ALCOHOLICA INDIRECTA.			
e).- Cerveza.	Malta, lupulo, jarabe de maiz y otros granos	Bebida de moderación	menos de 6°

BEBIDAS ALCOHOLICAS	MATERIA PRIMA	CARACTERISTICAS ESPECIFICAS	GL°
II.- PRODUCTOS DESTILADOS:			
a).- Licores destilados.			
1.- Brandy (Cognac)	Uva	"4" Originario de Cognac Francia Añejamiento en barricas	38° a 40°
2.- Ron	Melazas de caña de azúcar	"5" Añejamiento en barricas	38° a 40°
3.- Whisky	Maíz, Sorgo, Trigo, Centeno, cebada y patatas.	"6" Originario de Escocia Añejamiento en barricas	42° a 43°
4.- Ginebra	Cereales; trigo, -- arroz esencias (enebro, angelica, naranja cárdamo, cilantro, -- anis, mostaza, comino.	"7" Líquido incoloro o ligeramente amarillento, transparente, de olor y sabor característicos. Alto contenido de especias (Mezclados en caliente) *	40°
b).- Aguardientes; Alcohol Potable, Alcohol Neutro.			
1.- Vodka	Cereales, patatas, esencias (angelica o enebro)	"8" Alcohol suave, puro, neutro exento de aceite de Fúsel.	40° a 50°
2.- Tequila	Agave (Especie Tequilera Weber, variedad azul).	"9" Originario de Tequila Jalisco, alcohol con buen contenido de esteres y aceite de Fúsel.	40° a 43°
3.- Mezcal	Agave (de la especie Esperrima Jacobo, Amarilidáceas, Maguey de cerro, Bruto o cenizo.)	"10" Líquido transparente, incoloro o ligeramente amarillento, cuando ha sido envejecido en madera.	44° a 49°

BEBIDAS ALCOHOLICAS	MATERIA PRIMA	CARACTERISTICAS ESPECIFICAS	GL°
c).- LICORES DE ALCOHOLES DESTILADOS.			
Mezclados en frío *			
1.- Cordiales (licores propios)			
- Licores Superfinos	Frutas y esencias.	de 40 a 60.....	40°
- Licores Finos	" " "	de 30 a 40.....	35°
- Licores Semi Finos	" " "	de 22 a 30.....	30°
- Licores Ordinarios	" " "	de 12 a 20.....	25°
2.- Amargos			
Aperitivos:			
- Vermut.	Vino blanco, alcohol azúcar y esencias.	Bebidas alcoholicas pobres en contenido de alcohol y azúcar y ricas en substancias amargas.	15 a 18°
<p>* NOTA.- Los licores obtenidos por destilación de los principios aromáticos, previa maceración en alcohol, son siempre los que proporcionan unos sabores y aromas más finos y delicados. La maceración es empleada de preferencia en las elaboraciones de licores de frutas o ratáfias.</p> <p>En las elaboraciones denominadas " en frío" por esencias, aceites esenciales y extractos, se han generalizado, en gran manera, por su simplicidad de elaboración y también por la economía del costo de producción.</p>			

ANOTACIONES ANEXAS AL CUADRO.

Algunos productos se encuentran reglamentados por la Dirección General de Normas. A continuación se dará la definición y -- algunas características de las bebidas normadas.

"1"- Norma Oficial Mexicana para "Agua Miel". DGN-V-22-1972.

Definición.- Se entiende por agua miel, el jugo que se obtiene mediante el raspado previo del cajete o cavidad central del maguey pulquero.

Maguey Pulquero.- Es la planta de la que se obtiene el agua miel para la producción del pulque, que se cultiva principalmente en los estados de México, Hidalgo y Tlaxcala y corresponde a ciertas especies del género - Agave.

"2"- Norma Oficial de Calidad para Vinos de Mesa.

DGN-V-12-1971. Definición.- Se entiende por Vino de Mesa la bebida resultante, exclusivamente, de la fermentación alcohólica completa o parcial del mosto de uva -- fresca, en contacto o no de sus orujos.

Mosto de uva.- Es el producto líquido resultante del pisado, escurrido o prensado de la uva fresca y susceptible a ser corregido por falta de acidez y/o azúcar; -- ésta última adicionada en una proporción no mayor de -- 5 kilogramos de sacarosa por hectolitro de mosto.

Orujos de uva.- Es el complejo de partes sólidas de la uva fresca estrujada.

Clasificación.

El vino de mesa se clasifica en tres tipos con un solo grado de calidad.

TIPO I.- Tinto.- Es el producto de la vinificación de los mostos de uvas tintas, con maceración -- más o menos prolongada de sus orujos, o de -- la vinificación de mostos de uvas cuyo jugo es tinto.

TIPO II.- Blanco.- Es el producto de la vinificación -- de los mostos de uvas blancas o de mostos -- blancos de uvas tintas.

TIPO III.- Rosado.- Es el producto de la vinificación de los mostos de uvas rosadas o de uvas tintas con maceración parcial de los orujos o de las mezclas de vinos blanco y tinto.

-El vino se considera como seco cuando contenga menos de 4g. por litro de materias reductoras espresadas en azúcar invertido.

-Se consideran abocados, semisecos o dulces los que tengan un contenido de azúcares superior a los 4 g/l.

"3"- Norma Oficial de Calidad para Sidra gasificada.DGN-V-11-1970.

Definición.- bebida que se obtiene por fermentación alcohólica del zumo de manzanas frescas o del zumo mezclado de manzanas y peras; el de peras en proporción máxima del 10 %, con adición de jarabe para endulcorar al terminar la fermentación y gas carbónico a una presión de dos o más atmosferas.

Clasificación.

La Sidra gasificada será de tres tipos con un grado de calidad cada uno:

TIPO I.- Sidra seca.- con 2 g/l. de azúcar.

TIPO II.- Sidra semidulce o semiseca con 5 g/l.máximo de -- azúcar.

TIPO III.- Sidra dulce.- con 10 g/l. máximo de azúcar.

"4"- Norma Oficial Mexicana para Brandy.DGN-V-18-1972.

Definición.- Es el aguardiente de uva que se envejece naturalmente en barricas de roble o encino, hasta que adquiere los caracteres organolépticos específicos de éste producto.

Aguardiente de uva.- es el producto resultante de la destilación de los vinos obtenidos por la fermentación alcohólica del mosto de la uva fresca, concentrada o no.

OBSERVACIONES.

-Las bebidas obtenidas por la mezcla de alcoholes no vnicos con esencias, edulcorantes o cualquier otra sustancia, no -- podrán ser consideradas dentro de ésta norma.

-Dilución.- Para alcanzar la graduación G.L.real requerida, se debe usar agua destilada, agua desmineralizada, agua -- suavizada o agua potable.

"5"-Norma Oficial de Calidad para Ron. DGN-V-2-1970

Generalidades.- El Ron es un líquido transparente, de olor y sabor característicos que se aprecian mediante pruebas de catado. Las propiedades Físicas y Químicas de un Ron en gene--ral, son comparables a las de un alcohol etílico de la misma concentración. Sus diferencias estriban solo, en el mayor contenido de sustancias congénéricas encontradas en el Ron, así como de productos de extracción por contacto con la madera - de las barricas en que se guarda para su maduración o añeja--miento y eventualmente de agregados edulcorantes y caramelo.

Definición.- Es el producto obtenido por fermentación alcohólica y destilación del jugo de caña de azúcar, ya sea natu--ral o concentrado, incluyendo las mieles incristalizables de fabricación del azúcar de caña.

Maduración.- Es el proceso de transformación lenta del pro--ducto recién destilado, que le permite adquirir las caracte--rísticas organolépticas, típicas, del Ron, por procesos quí--micos y Físicos que tienen lugar en forma natural durante su permanencia en barricas o cubas de madera apropiada, quema--das o nó en su superficie interna.

Independientemente de las características del destilado, no se define como Ron ninguno que haya sido madurado durante un lapso inferior a 8 meses.

La maduración debe efectuarse en recipientes cuya capa--cidad máxima sea de 600 litros.

Añejo ó Añejado.- Deben aplicarse éstos términos a los Rones que hayan sido madurados, durante un período mínimo de 2 años. Los fabricantes de Ron deben comprobar, al menos ante inspección de facturas y existencia de producto en maduración, el tiempo de retención medio para una marca determina--da.

Mezclas.- Para que una mezcla se considere Ron, el com--ponente más joven debe tener 8 meses como mínimo y para que se considere Ron añejo éste mínimo debe de ser de 2 años.

Clasificación.

El Ron se clasifica en dos tipos con un grado de calidad cada uno:

TIPO I.- Ron.

TIPO II.- Ron Añejo o Añejado.

- Los términos de extraañejo, super añejo, extra viejo y similares podrán aplicarse a Rones que se comprueben que tengan más de 3 años de añejamiento.

6"- Norma Oficial Mexicana para Whisky. DGN-V-1-1969.

Definición.- Es el producto obtenido por destilación directa de mostos fermentados y preparados únicamente con malta y cereales como materias primas, en las que la sacarificación se efectúa por la acción de las diastasas de la malta y/o -- concentrados diastásicos y susceptibles a ser rectificadas -- en los límites característicos para cada uno de ellos y que es sometido en recipientes de encino o roble a un proceso de añejamiento, cuando menos durante 3 años, para el sub tipo - D.O.(destilación en olla), y dos años para el sub tipo D.T. (destilación en torres),

Clasificación.

El Whisky se clasifica en 9 tipos por materia prima y proceso de mezclado y en 3 sub tipos por proceso de destilación.

- Por materia prima empleada:

TIPO I.- Whisky de centeno o centeno malteado: es el proveniente de un mosto, cuya composición debe contener como mínimo 51% de granos de centeno o centeno malteado.

TIPO II.- Whisky de trigo o trigo malteado: es el proveniente de un mosto cuya composición debe contener como mínimo 51 % de granos de trigo o trigo malteado.

TIPO III.- Whisky de maíz: es el proveniente de un mosto cuya composición debe tener como mínimo 51 % de --- granos de maíz, se le podrá denominar Whisky --- Bourbon.

TIPO IV.- Whisky de cebada o cebada malteada (malta): es el proveniente de un mosto cuya composición debe contener como mínimo 51 % de cebada o cebada malteada (malta).

- TIPO V.- Es el resultado de la mezcla de los Whiskies cuyos tipos e sub tipos se mencionan en el proceso de destilación, en el cual predomina el 51 % de uno de los tipos mezclados; con adición de agua para obtener la graduación alcohólica requerida.
- TIPO VI.- Es el resultado de la mezcla de Whiskies del tipo V en proporciones diversas en la que se le agrega agua para obtener la graduación alcohólica requerida.
- TIPO VII.- Es el resultado de la mezcla de Whisky importado de Escocia, en proporción no menor del 25 % en volúmen, de Whisky nacional en una proporción no mayor de 75 % en volúmen.
- El Whisky importado, debe ser de malta y destilado en alambique de olla.
- TIPO VIII.- Es el resultado de la mezcla de Whisky importado en una proporción no menor de 1.5 % en volúmen y de Whisky nacional en una proporción no mayor del 98.5 % en volúmen. El total de la mezcla debe contener un mínimo de 25 % de Whisky de malta. El Whisky importado será de malta y destilado en alambiques de olla.
- TIPO IX.- Es el resultado de la mezcla de Whisky importado, en una proporción no menor del 1.5 % en volúmen, y el Whisky nacional en una proporción no mayor del 98.5 % en volúmen. El Whisky importado puede ser de maíz, centeno, y/o trigo.

-Por proceso de destilación.

Subtipo D.O. Son los destilados en alambiques de olla a una concentración alcohólica inferior a --
80° GL.

Subtipo D.T. Son los destilados en torres de destilación continuo, a una concentración alcohólica máxima de 95° GL.

Subtipo O.T. Son las cobinaciones de las dos anteriores.

Color.- Para uniformizar el color se debe permitir el empleo de caramelo.

7"- Norma Oficial de Calidad para Ginebra DGN-V-20-1970.

Definición.- Es la bebida alcohólica obtenida por la redestilación de alcohol etílico proveniente de productos naturales, en contacto con bayas de enebro y otras semillas, -cortezas y raíces aromáticas.

La redestilación se lleva a cabo en alambiques de --- olla y los ingredientes aromáticos llamados comunmente botánicos, se introducen directamente en el seno del líquido o se colocan en la parte superior de la olla en sacos o canastos apropiados.

Clasificación.

La ginebra se clasifica en dos tipos, con un grado de calidad cada uno.

TIPO I.- Ginebra dulce.

TIPO II.- Ginebra seca o extra seca.- Este tipo de Ginebra es la que no contiene azúcar.

Color.- La Ginebra puede presentar un color ligeramente -- amarillento, éste puede ser originado por un almacenamiento corto de la Ginebra en barricas de roble o por la adición de caramelo.

8"- Norma oficial de calidad para Vodka DGN.-V-19-1970.

Generalidades.- El Vodka es un líquido incoloro o ligeramente amarillo, trasparente de olor y sabor característico que se aprecian mediante pruebas de catado.

Las propiedades Físicas y Químicas de un Vodka en general son comparables a las de un alcohol etílico de la misma concentración, sus diferencias estriban en el destufado del producto final.

Definición.- Se entiende por Vodka la bebida obtenida por fermentación alcohólica de mostos provenientes de productos naturales, sometidos posteriormente a destilación y -rectificación; pudiéndose tratar con carbón activado u -- otros absorbentes registrados por la Secretaría de Salu--bridad y asistencia y/o aromatizarse con productos vegeta--les naturales.

"9"- Norma Oficial de Calidad para Tequila.DGN-V-7-1976.

Alcance.- Esta norma se limita al aguardiente que proviene de agaves del especie Tequilana Weber, variedad azul, cultivados en el estado de Jalisco y zonas de estados co--lindantes que presenten características ecológicas seme--jantes a dicho estado.

Definición.- Es el aguardiente regional, obtenido por des--tilación y rectificación de mostos preparados unicamente con los azúcares extraídos de las cabezas cocidas de aga--ves Tequilana Weber variedad azul, sometidos previamente a fermentación alcohólica con levaduras adecuadas selec--cionadas o no; este tequila deberá denominarse " 100 % -de agave" previa autorización. También podrá' permitirse la adición de hasta 49 % de otros azúcares en la prepara--ción de mostos.

El Tequila es un líquido de olor y sabor suigéneris, ---transparente, incoloro o ligeramente amarillento después de madurado, en recipientes de madera o roble o encino. Se entiende por maduración la transformación lenta que -le permite adquirir al producto las características orga--nolépticas deseadas, por procesos Físico-Químicos que en forma natural, tienen lugar durante su permanencia en --las barricas.

Tequila Blanco.- Es el producto obtenido en la rectifica--ción sin agregar nada más que agua de dilución para ajus--tar la graduación comercial requerida, debiendo tener un reposo mínimo de 20 días.

Tequila Reposado.- Es el producto que se deja madurar por lo menos 4 meses en recipientes de madera de roble o encino.

Tequila Añejo.- Es el producto sometido a un proceso de maduración, por lo menos un año en barricas de madera de roble o encino, estableciéndose que la edad para éste Tequila se la proporcionará el componente más joven.

Clasificación.

De acuerdo a su elaboración, el Tequila se clasifica en:

- a).- Tequila 100 % de Agave.- Es aquel que proviene de los mostos que única y exclusivamente contienen azúcares -- provenientes de los " agaves " Tequilana Weber, variedad azul.
- b).- Tequila.- Es aquel que proviene de los mostos a los que se les ha adicionado " hasta un 49 % de otros azúcares ajenos al agave azul Tequilana Weber ".

"10"-Norma Oficial de Calidad para Mezcal DGN-R10-1949.

Definición.- Se entiende por mezcal, el aguardiente obtenido del Agave Esperrima Jacobi, Amarilidáceas (Maguey de Cerro, - Bruto o Cenizo); Agave Weberi Celsa, Amarilidáceas (Maguey Liso); Agave Potatorum Zucc, Amarilidáceas (Maguey de Mezcal), y otras especies del mismo género que se cultivan ---- principalmente en los estados de: San Luis Potosí, Zacatecas, Coahuila, Nuevo León, Oaxaca, y Sinaloa, en las tierras y -- condiciones climatológicas que les son características. De -- éstos Agaves, se usarán las partes constitutivas del tallo y de las bases de las pencas maduras, se someterán a la acción del calor con objeto de acelerar la formación de monosas; y por medios mecánicos, se extraerá el jugo, separándolo del - bagazo y se le agregará agua para diluir hasta la concentración conveniente. El líquido así obtenido, se fermentará a temperatura adecuada, por acción de levaduras, seleccionadas o no, propias de los mismos Agaves, y una vez que haya terminado la fermentación, se destilará, obteniéndose un producto - de una riqueza alcohólica real, comprendida entre 45° y 50° GL.

Generalidades.- El Mezcal es un líquido transparente, incoloro o ligeramente amarillento, cuando ha sido envejecido en depósitos de madera, de olor y sabor característicos, con fuerte cantidad de alcohol y débil proporción de extractos.

Clasificación.

El Mezcal comprende dos tipos A y B, con un solo grado de calidad cada uno.

TIPO "A".- Mezcal Natural.

TIPO "B".- Mezcal Añejo, con dos años mínimos de añejamiento - en barriles de madera de encino en bodegas anexas a las plantas de envasado.

OBJETIVO:

Tener las bases y conocimientos suficientes y necesarios para poder elaborar alcohol y cualquier tipo de bebida producidos a partir de éste.

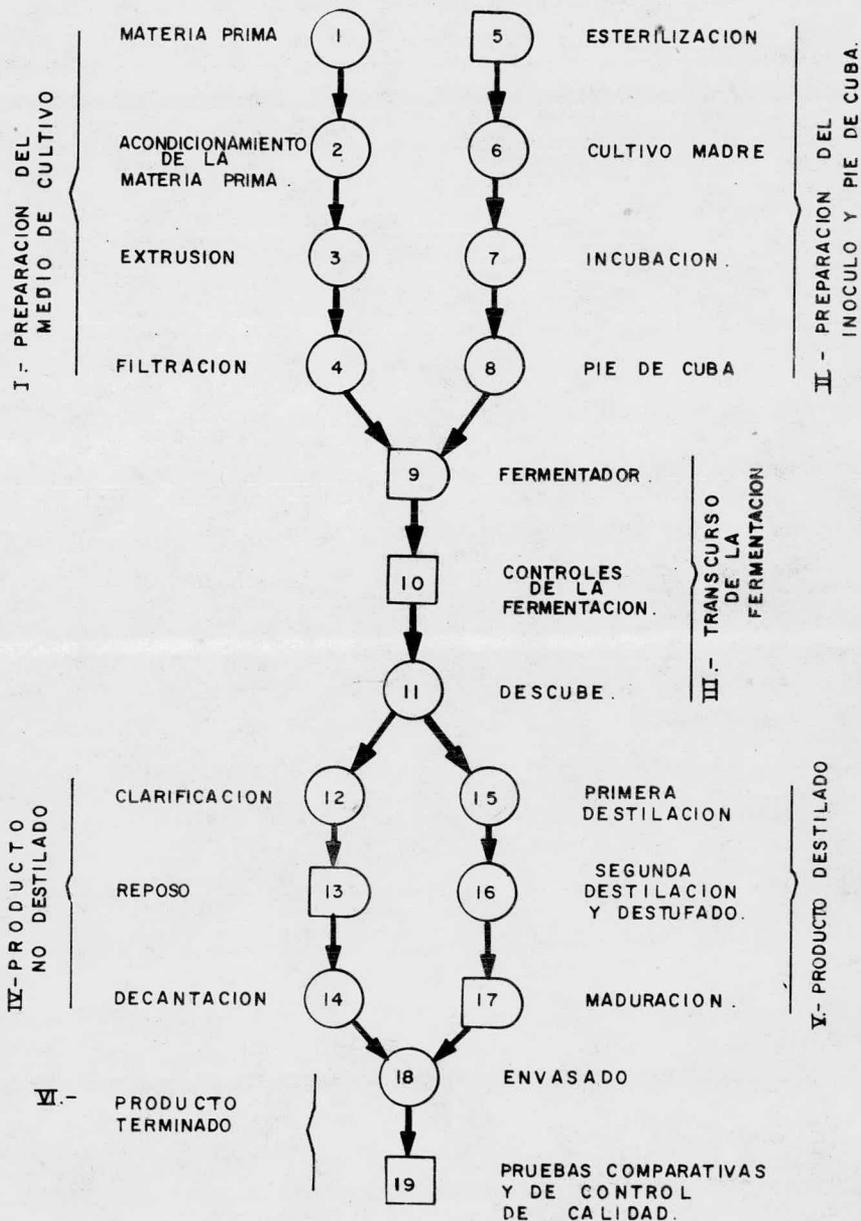
MATERIAL:

- Un fermentador (el utilizado en la práctica de Obtención de Biomasa, con todos sus dispositivos excepto el sistema de aireación).
- Cuatro matraces Erlenmeyer de 250 ml.
- Un matraz de fondo plano de 1 litro con tapón de hule.
- Tres pipetas volumétricas de 5 ml.
- Una bureta de 50 ml.
- Un embudo de cola larga.
- Un soporte universal.
- Dos pinzas de tres dedos.
- Un mechero con manguera.
- Una tela de asbesto.
- Un refrigerante con manguera.
- Una trampa Kjeldahl.
- Un termómetro de -10° a 260°C .
- Cuerpos de ebullición.
- Papel pH.
- Papel filtro.
- Tela de muselina (1m).

REACTIVOS:

- Solución de Fehling "A"
- Solución de Fehling "B"
- Solución de NaOH concentrada.
- Solución de NaOH 0.1 N.
- Solución de HCl concentrada.
- Solución de HCl 0.1 N.
- Solución de fenolftaleína.
- Solución de azul de metileno.
- Metabisulfito de potasio.
- Oxalato de potasio.
- Subacetato de plomo.

DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO PARA LA OBTENCION DE BEBIDAS ALCOHOLICAS 65



DESCRIPCION DE CADA OPERACION.

Todos los pasos de este diagrama hasta el inciso 14 estan - destinados a la elaboraci3n de vino tinto (los pasos 15, 16, 17, son para aquellos productos que requieran de una o m3s destilaciones durante su proceso de obtenci3n). Si el alumno desea fabricar otra bebida alcoh3lica ya sea un producto destilado o no, podra hacer uso de este diagrama como base de su trabajo, modific3ndolo en las partes que a 3l le convengan en funci3n de un estudio previo realizado sobre los pasos particulares en el proceso de obtenci3n en la bebida alcoh3lica escogida.

I.- PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO.

1.- MATERIA PRIMA:

Uvas enteras.- La calidad de nuestra materia prima es - factor primordial para la obtenci3n de un buen vino de mesa. Las uvas deber3n estar maduras para obtener la mayor cantidad de carbohidratos, adem3s de tener una baja acidez, debe - ser una uva sana, que no se halla empezado a fermentar.

2.- ACONDICIONAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA:

Lavado de uvas.- Un lavado es conveniente para eliminar el polvo y la tierra que puedan traer las uvas, siendo adem3s el motivo principal el de quitar la flora microbiana silvestre que pudieran contener 3stas.

3.- EXTRUSION:

La uva desgranada se estruja a mano para la obtenci3n - del mosto. La uva no debe de ser molida en licuadora por que esto provocar3a la ruptura de las semillas aumentando la astringencia del producto final.

4.- FILTRACION:

Esta operaci3n puede realizarse con un pa3o, manta de - cielo o gasa, recibiendo el producto en un recipiente limpio.

Una vez obtenido el mosto, a este se le practica el siguiente an3lisis qu3mico:

- Reductores Directos.
- Reductores Totales
- Acidez Vol3til.

- Acidez Fija.
- Acidez Total.
- pH.

Este mosto se guarda en matraces o frascos limpios de preferencia color ambar, se llenan lo más posible, para evitar el contacto con el oxígeno del aire, se almacenan en refrigeración o - en su defecto en un lugar fresco y apartado de la luz.

PREPARACION DEL INOCULO Y PIE DE CUBA.

En esta parte de la práctica se va a trabajar con el 10-15 % del volumen total del mosto a preparar (el volumen total puede ser de 2 a 3 litros).

5.- ESTERILIZACION:

Esterilización Física.- A 200 ml del mosto (obtenido en los pasos 1, 2, 3 y 4) se les coloca en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se calientan a ebullición un minuto, se tapa con un algodón y un capuchón de aluminio, se enfría al chorro de agua.

Esterilización Química.- Tanto al mosto inicial como a los 200 ml que se acaban de calentar se les agregan 150 mg/l de metabisulfito de potasio ($K_2S_2O_5$) teniendo cuidado de agregarle la sal en una zona estéril.

6.- CULTIVO MADRE Y RESIEMBRA:

El maestro del laboratorio facilitará al alumno un tubo de ensaye con cepa de *Saccharomyces cerevisiae* variedad *ellipsoideus*, la cual procederá a resembrar en 50 ml del medio obtenido en el paso "5".

7.- INCUBACION:

Se incuba el matraz a una temperatura de 28°-30°C de --- preferencia en una mesa de agitación controlada o en un cuarto de incubación con temperatura constante.

8.- PIE DE CUBA.

Una vez que el microorganismo está acondicionado al medio líquido, se procede a la preparación del pie de cuba, esto se logra agregando 50 a 150 ml más del mosto estéril (esta cantidad depende del volumen final que se quiera trabajar este debe ser del 10 %). Se somete a las mismas condiciones-

de temperatura que en el paso anterior.

III.- TRANSCURSO DE LA FERMENTACION.

9.- INOCULACION:

Uno o dos dias son suficientes para que el pie de cuba se encuentre en franca fermentación, por lo tanto ya podemos inocular con este el resto del mosto obtenido. El mosto guardado en refrigeración se coloca en el fermentador el cual ha sido previamente esterilizado. El tiempo de fermentación se empieza a contar desde este momento.

10.- CONTROLES DE LA FERMENTACION:

Durante el transcurso de la fermentación se llevan los siguientes controles:

- Reductores Directos.
- Reductores Totales.
- Acidez Total.
- Acidez Volátil.
- Acidez Fija.
- Por ciento de Alcohol.
- pH.
- Temperatura.
- Producción de CO₂

El final de la fermentación puede ser detectado por el valor de los azúcares reductores totales de la muestra, cuando éstos se acerquen a cero o permanezcan constantes, nos indica la terminación de la fermentación o algun problema en ella (si es que el valor es todavía muy alto).

11.- DESCUBE:

Se entiende por descube la separación del vino de las heces de éste, debe hacerse por medio de una decantación. Los recipientes donde se recibe el vino, se llenan totalmente, teniendo la precaución de dejar un pequeño espacio entre la superficie del líquido y el tapón para alojar el CO₂ que todavía pueda producirse.

IV.- PRODUCTOS NO DESTILADOS.

Existen varios sistemas para la clarificación de un vino ya sea en escala industrial o a nivel laboratorio, entre los-

más comunes se encuentran:

- a.- Con ácido tánico.- Se disuelven en un poco de vino 50 a 80 mg/l de ácido, una vez disuelto se agrega al volumen total del vino y se agita perfectamente, a continuación se añaden de 30 a 50 mg/l de grenetina, dispersa en un poco de vino o agua caliente, se agrega y se agita perfectamente hasta su disolución total en el vino y se deja reposar, (para decantarlo después).
- b.- Se agrega un poco de vino de 80 a 150 mg/l de bentonita se agita y se deja reposar.
- c.- A continuación se dará una tabla de los clarificantes más comunes, cantidades y vinos en donde se recomienda su empleo:

CLARIFICANTES.

CLARIFICANTE	CANTIDAD	V I N O
Caseína	3 - 5 g/Hl	Vino Blanco y Rosado
Ictiocola	1 - 2 g/Hl	Vino Blanco y Rosado
Gelatina	3 - 4 g/Hl	Vino Blanco y Rosado
Albúmina	8 -16 g/Hl	V. Claretos y Tintos Finos
Agar-Agar gel al 1 %	15 -30 g/Hl	V. Viscosos y Musilaginosos
Fitatos	20 mg/Hl	En la mayoría de los V. que adolescan de un elevado con- tenido de hierro.
Bentonitas	50-150 g/Hl	En V. enturbiados por subs- tancias albuminoides
Bentonitas	hasta 400 g/Hl	V. difícil clarificación
Caolín	hasta 100 g/Hl	V. Blanco, Dulces y Viscosos
Carbón	10 -20 g/Hl	En V. matiz amarillento obs- curo
Carbón activado	50 - 100 g/Hl	En V. pardos para ser deco- lorados

El alumno puede escoger de estas, la que más le agrada o puede utilizar otros métodos investigados por él.

13- REPOSO:

El vino se deja sedimentar de 24 a 48 horas, sin importar el método de clarificación empleada y en refrigeración o

en un lugar de baja temperatura.

14.- DECANTACION:

El vino es separado de todos los sólidos precipitados—después de la clarificación. Una vez decantado el vino se le agregan otros 50 mg/l de metabisulfito de potasio ($K_2S_2O_5$) y se llena casi completamente el recipiente donde se trasiega—el vino y se mantiene cerrado.

AÑEJAMIENTO RAPIDO Ó ARTIFICIAL DEL VINO.

Cuando ha terminado la fermentación, el vino generalmente es ta verde, áspero y desagradable a los paladares sensibles. No obstante se distinguen más o menos enmascarados por el sabor a frutas, diversos aromas característicos de ciertas variedades de uvas pero aún así es muy difícil todavía preveer cual será el bouquet—del vino. Este exceso de juventud se acentúa progresivamente en el transcurso del año, en donde se produce una neta suavidad, esta —suavidad, es el resultado de un conjunto de reacciones que iniciadas en los toneles, continúan de manera lenta mientras el vino envejece. Se trata de cierta disminución de acidez (fermentación Malo-Láctica), esterificaciones, oxidaciones, reducciones que poco a poco transforman el vino.

Todas éstas reacciones químicas en presencia de un catalizador, se pueden acelerar en cuanto a su tiempo de reacción, por lo tanto es posible darle a unos vinos jóvenes algunas características de un vino "hecho" en un tiempo más corto que el que se requiere por el procedimiento natural.

El método que se debe emplear en un proceso de añejamiento rápido, depende de dos factores primordialmente: primero la composición y características de la bebida alcoholica a tratar y segundo—el material disponible en el laboratorio.

PROCEDIMIENTO RAPIDO-PROCEDIMIENTO MONTI.

El doctor Eudo Monti de Turin es el autor de uno de los mejores métodos de envejecimiento rápido de los vinos. Los resultados que se obtiene son parecidos a los conseguidos con el procedimiento natural de crianza.

METODO:

El sistema Monti consiste en enfriar el vino a menos de 50°C y saturado con aire esterilizado (haciéndolo pasar por alcohol y glicerina o cualquier otro método efectivo), y finalmente subdividido, durante 6 horas. Luego se deja el líquido en reposo, siempre a la misma temperatura durante 48 horas, al cabo de cuyo tiempo se repite la aireación, otras 6 horas, dejándolo reposar en frío (4°C) otras 48 horas y repitiendo por tercera vez la aireación durante 6 horas. Se quita el vino del recipiente en el cual ha sido aireado— y enfriado se le pasa a las cubas puestas en un local a temperatura no superior a 30°C, durante tres semanas, se enfría de nuevo el vino, pero ya no se le satura de aire. Se filtra y conserva en envases de madera, (en su defecto en garrafrones de vidrio con viruta de madera no resinosa) a los cuales llega como si hubiese sufrido un añejamiento natural de algunos años.

El sistema de Monti es de aplicación general, sirve para toda clase de vinos que puedan ser añejados y para mostos y demás zumos de frutas dulces, las cuales como consecuencia del enfriamiento y aireación se enriquecen en aroma haciéndose más agradables como bebida.

En el sistema de Monti, el añejamiento es debido al frío y el aire, el frío insolubiliza el cremor y la materia colorante (en los vinos tintos) con lo cual el vino se despoja y se "hace" adquiriendo tan pronto aclara, el paladar propio de los vinos hechos. El aire en el líquido frío se disuelve en una cantidad mucho mayor que el que admitiría a la temperatura ordinaria, siendo por lo tanto esta oxidación intensa la que ha determinado la formación de dicho depósito y el desarrollo del bouquet, es así que en otros experimentos realizados por Monti, el vino sometido al frío pero sin contacto con el aire no se afeja.

Existen otros métodos de añejamiento rápido como son:

- Por medio de una Pasteurización .
- Por asoleo (efecto de la temperatura y la luz del sol).
- Por medio de electricidad ya sea corriente alterná o continua.
- Por medio de oxígeno, ozono, etc.

Sea cual fuere el método a seguir, todos y cada uno de ellos tienen sus ventajas y desventajas. Son aplicables para diferentes tipos de vinos con características propias, dadas por la gran variedad de uvas que existen en el mercado.

Los vinos se han querido añejar por métodos rápidos desde hace mucho tiempo, pero ninguno ha podido competir con lo que la naturaleza hace.

Los vinos creados naturalmente no han podido ser igualados y probablemente pase mucho tiempo antes de que se perfeccione alguno de los métodos mencionados o que se invente otro nuevo. Lo más factible que suceda, y ya está pasando es que cambien las costumbres de beber el vino, y éstos sean consumidos más jóvenes.

La comercialización y la cada vez más creciente población hace que los vinos lleguen al mercado con mucho menos tiempo de añejamiento (de 6 a 12 meses en barrica) cosa que anteriormente no se acostumbra.

V.- PRODUCTOS DESTILADOS.

Este tipo de productos constituye una gran parte de la industria de bebidas alcohólicas, ya que su volumen de ventas en productos de espíritus destilados como: Ron, Whisky, Brandy, Ginebra, -- Cordiales y Licores es muy cuantiosa y año con año se va incrementando.

Tanto la materia prima como los cuidados durante la fermentación, el proceso de destilación y el tipo de maduración, son los factores más importantes en la obtención de un producto de buena calidad. Sabemos que la destilación es la separación de los constituyentes de una mezcla líquida por la vaporización parcial de la misma y la recuperación de vapores y residuo. Esta separación completa de los componentes depende de las propiedades de los mismos. El método más común de separación consiste en calentar a ebullición conducir los vapores a un sistema de enfriamiento donde puedan ser recolectados.

Las instalaciones de destilación empleadas pueden ser varias-- Alambiques, Calderas de marcha continua acopladas a columnas de -- rectificación, Aparatos de rectificación doble, etc.

A nivel laboratorio se recomienda que la primera destilación sea una destilación simple, y en la segunda se utilice una columna

de fraccionamiento (refrigerante) con el relleno poroso, también se puede empacar la columna con piedras de ebullición, perlas de vidrio o fibra de vidrio.

Por lo tanto para llevar a cabo una destilación el factor importante que hay que cuidar es la temperatura, se tiene que conocer el punto de ebullición de la sustancia que deseamos destilar, además debemos tomar en cuenta la presión de vapor, que es la presión en la cual las fases líquida y gaseosa están en equilibrio a una temperatura dada.

15.- PRIMERA DESTILACION.

Este proceso es una destilación simple y tiene como único fin el de separar los componentes alcohólicos, así como los aldehidos, ésteres y cetonas además de todos los compuestos contenidos en el aceite de Fúsel del mosto fermentado. Esto se logra destilando de 55 a 90°C a una presión normal.

16.- SEGUNDA DESTILACION Y DESTUFADO.

En este paso al aparato de destilación se le adapta una columna de fraccionamiento y separamos las partes principales de la destilación que son;

- Cabeza (temperaturas menores de 72°C).
- Corazón (temperaturas entre 72^o-76°C).
- Colas (temperaturas mayores de 76°C).

Una vez separados estos compuestos, a la parte denominada Corazón se le somete a un proceso de destufado (deodorizado) esto se hace con el fin de quitar los malos olores que provengan de la materia prima, este paso solamente se hace para productos que requieran en su obtención de un alcohol puro y sin olores extraños como es el caso de la Vodka, Ginebra, cremas y licores.

17.- MADURACION.

Durante la maduración se mejora el carácter de los productos destilados, se va atenuando los aromas poco agradables también se desarrolla el color y en general el producto se suaviza, durante los primeros meses se lleva a cabo el principi

pal cambio en los ésteres, ácidos, sólidos, aldehidos, en el--
furfural, en el aceite de fúsel y en la coloración.

El Ron, Whisky y Brandy se deben de añejar en barricas -
de roble blanco requemados, generalmente se emplean tone
les corrientes. El tiempo de maduración fluctúa entre varios-
meses a algunos años.

Los principales factores que intervienen durante el pro-
ceso de maduración son: La efectividad en el proceso de desti-
lación (composición de la cifra no alcohólica) su porcentaje
de alcohol, la naturaleza de los toneles a emplear (de prefe-
rencia de roble blanco y nuevo), temperatura y humedad relati-
va de la bodega de añejamiento, la acción del oxígeno y el --
tiempo de maduración.

VI.- PRODUCTO TERMINADO.

18.- ENVASADO.

El envasado se debe de hacer en botellas de vidrio de me-
dio o tres cuartos de litro limpia; se llena la botella hasta
el cuello teniendo cuidado de dejar un espacio entre la super-
ficie del líquido y el tapón de corcho para alojar una posi-
ble producción de gases.

Se debe de fabricar una etiqueta con todas las especi-
ficaciones que ampara la norma de etiquetas para bebidas alcohó-
licas de la Dirección General de Normas.

19.- PRUEBAS COMPARATIVAS Y DE CONTROL DE CALIDAD.

A una botella con bebida alcohólica comercial semejante
a la obtenida en el laboratorio y a ésta última se les practi-
can los siguientes análisis:

a.- Análisis Físicos:

- Apariencia.
- Presencia o Ausencia de Gas.
- Color.
- Sabor.
- Olor.
- Astringencia.
- Textura.
- Cuerpo.

b.- Análisis Químicos:

- Reductores Directos.
- Reductores Totales.
- Acidez Volátil.
- Acidez Fija.
- Acidez Total.
- pH.
- Por ciento de Alcohol.

Si los productos son destilados también se les puede -- determinarseles:

- Aceite de Fúsel.
- Esteres.
- Aldehidos.

Se debe reportar en cuadros los resultados tanto físicos como químicos, anexando observaciones, aclaraciones o comentarios.

C U E S T I O N A R I O

- 1.- Mecanismo de la fermentación alcohólica.
- 2.- ¿Diga por qué en la elaboración de vino, se agraga metabisulfito de potasio ($K_2S_2O_5$) y como actúa?
- 3.- ¿Qué es una destilación, como se efectúa y que factores hay -- que tomar en cuenta?
- 4.- ¿Cual es el objeto de la clarificación?
- 5.- ¿Qué es un trasiego?
- 6.- ¿Por que se determina acidez volátil en los vinos?
- 7.- De los siguientes productos alcohólicos mencione:
 - a.- Materia prima de donde puede provenir.
 - b.- Por ciento de alcohol.
 - c.- Otras dos características importantes con respecto a ese - producto.

Los productos son:

- Alcohol desnaturalizado.
- Alcohol potable.
- Aguardiente.
- Vino rosado
- Licor de naranja.

- Crema de limón.
- Whisky. ✓
- Brandy. ✓
- Ron. ✓
- Sidra. ✓

8.- Reportar en tablas y gráficas:

- Acidez total vs. tiempo.
- Acidez volátil vs. tiempo.
- Acidez fija vs. tiempo.
- Reductores directos vs. tiempo.
- Reductores totales vs. tiempo.
- Por ciento de alcohol vs. tiempo.

9.- Rendimiento y eficiencia de la fermentación, el rendimiento - se calcula por medio de un balance, anexando calculos y tabla

BIBLIOGRAFIA

4,5,6,7,10,13,13,18,22,23,24,28,29,30,31,32,36,39,41,43,49,51,
53, 54,57,58,60,62,64,65,66,70.

MD

BALANCE DE LA FERMENTACION ALCOHOLICA

MICROORGANISMO Saccharomyces cerevisiae.

SUSTRATO. Glucosa al 18 %

PRODUCTO	PM	# C	%	Moles	mili Moles	mili Moles de C.
Glucosa $C_6H_{12}O_6$	180	6	18	0.1	100	600
ac.Fija ac.Tartárico $C_4H_6O_6$	150	4	0.11	0.00073	0.73	2.92
						<u>602.92</u> TOTAL
Etanol C_2H_6O	46	2	4.6	0.1	100	200
CO_2	44	1	6.0	0.136	136	136
ac.Volátil ac.Acético $C_2H_4O_2$	60	2	0.151	0.0025	2.5	5.0
ac.Fija ac.Tartárico $C_4H_6O_6$	150	4	0.157	0.001	1.0	4.0
Azúcares Residuales Glucosa $C_6H_{12}O_6$	180	6	0.53	0.0029	2.9	17.4
						<u>362.4</u> TOTAL

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{mMC. Productos} \times 100}{\text{mMC. Reactivos}} = \frac{362.4 \times 100}{602.92} = 60.1 \%$$

RENDIMIENTO DE LA FERMENTACION ALCOHOLICA

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{mMC. Productos} \times 100}{\text{mMC. Reactivos}}$$

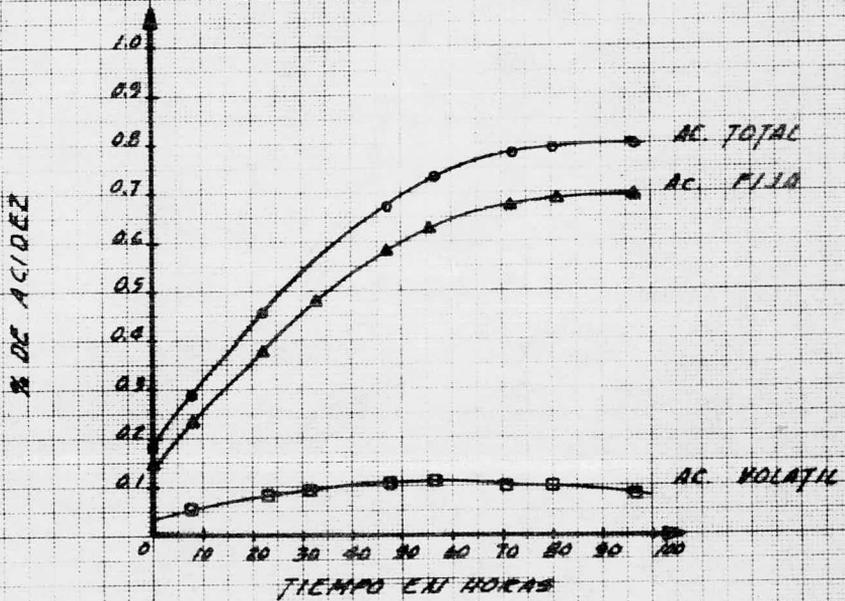
EFICIENCIA DE LA FERMENTACION ALCOHOLICA

$$\% \text{ EFICIENCIA DE LA F} = \frac{\text{Alcohol Producido} \times 100}{\text{T. F. C.}}$$

T. F. A. = Teórica Formación de Alcohol, a partir del azúcar fermentada.

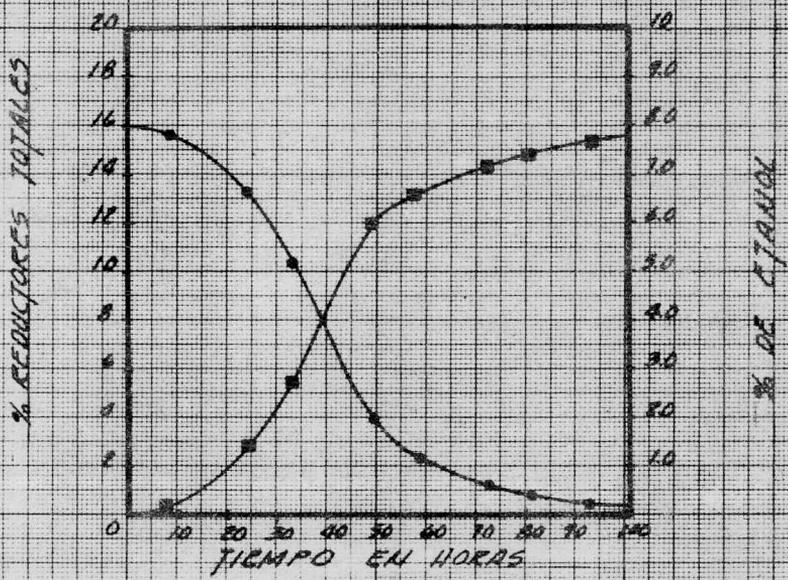
710

GRAFICA DE LA FERMENTACION ALCOHOLICA



TIEMPO	ACIDEZ		
	TOTAL	FIJA	VOLATIL
0	0.1708	0.1423	0.0285
8	0.2846	0.2313	0.0533
24	0.4483	0.3789	0.0694
32	0.5550	0.4803	0.0747
48	0.6672	0.5704	0.0868
56	0.7401	0.6226	0.1185
72	0.7614	0.6760	0.0854
80	0.7823	0.6987	0.0906
96	0.7996	0.7011	0.0985

GRAFICOS DE LA FERMENTACION ALCOHOLICA



TIEMPO	% R. TOTALES	% ETANOL
0	15.78	0.00
8	15.82	0.18
24	13.25	1.37
32	10.47	2.71
48	3.81	6.0
56	2.49	6.56
72	1.82	6.98
80	0.76	7.32
96	0.43	7.66

● % R. TOTALES
 ■ % ETANOL

PRACTICA No. 3

FERMENTACION ALCOHOLICA I.- PRODUCTO NO DESTILADO.

ELABORACION DE VINO DE MESA.

I.- OBJETIVO: La fabricación de un producto no destilado, los controles durante la fermentación y un análisis del vino obtenido.

II.- MATERIAL:

- Un fermentador (el utilizado en la práctica de Obtención de Biomasa con todos sus dispositivos).
- Cuatro matraces Erlenmeyer de 250 ml.
- Un matraz de fondo plano de 1 litro con tapón de hule.
- Tres pipetas volumétricas de 5 ml.
- Una bureta de 50 ml.
- Un embudo de cola larga.
- Un soporte universal.
- Dos pinzas de tres dedos.
- Un mechero con manguera.
- Una tela de asbesto.
- Un refrigerante con mangueras.
- Una trampa Kjeldahl.
- Un termómetro de - 10 a 260°C.
- Cuerpos de ebullición.
- Papel pH, papel filtro.
- Uva.- 3 kilogramos o su equivalente en jugo de uva (no comercial) para obtener de 1 a 2 litros de mosto a una concentración de 18 a 20 % de azúcares reductores.

III.- REACTIVOS:

- Solución de Fehling "A"
- Solución de Fehling "B"
- Solución de NaOH concentrada.
- Solución de NaIH 0.1 N.
- Solución de HCl concentrada.
- Solución de HCl 0.1 N.
- Solución de fenolftaleína.
- Solución de azul de metileno.
- Metabisulfito de potasio.
- Oxalato de potasio.

IV.- EXPERIMENTO:

Preparación del Medio de Cultivo.- Las uvas deberán estar lo más maduras posibles para obtener la mayor cantidad de carbohidratos, -así como la acidez lo más bajo que sea posible, debe ser una uva sana, que no se haya empezado a fermentar. Se lavan las uvas para quitar polvo, tierra, además de la flora microbiana silvestre que pudieran contener éstas.

La uva se desgrana y se estruja a mano para la obtención del mosto. Se filtra el mosto en un paño, manta de cielo o gasa, y se le practica el siguiente análisis químico: Reductores Directos, Reductores Totales, Acidez Volátil, Acidez Fija, Acidez Total y pH.

Este mosto se guarda en matraces o frascos limpios, de preferencia color ambar, se deben llenar lo más posible, para evitar el contacto con el oxígeno del aire, se almacena en refrigeración o en su defecto en un lugar fresco y apartado de la luz.

Preparación del Inóculo y Pie de Cuba.- Esterilización, a 200 ml del mosto obtenido, se les colocan en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, se calientan a ebullición un minuto y se tapa con un algodón y un capuchón de aluminio, se enfría al chorro de agua. Tanto al mosto inicial como a los 200 ml que se acaban de calentar se les agregan 150 mg/l de metabisulfito de potasio ($K_2S_2O_5$).

Se facilita al alumno un tubo de ensaye con cepa de *Saccharomyces cerevisiae* variedad ellipsoideus, el cual se resiembran en 50ml del medio puesto en ebullición. Se debe incubar a una temperatura de 28-30°C, de preferencia en una mesa de agitación controlada o en un cuarto con temperatura constante. Una vez que el micro-organismo está acondicionado al medio líquido, se procede a la preparación del pie de cuba, esto se logra agregando 50 a 150 ml más del mosto estéril y manteniéndolo en las mismas condiciones de temperatura y aireación. Uno o dos días después se puede inocular el resto del mosto obtenido.

Controles en la fermentación.- Estos son: Reductores Directos, Reductores Totales, Acidez Volatil, Acidez Fija, Acidez Total,

Por ciento de Etanol, pH, Temperatura y Producción de Dióxido de Carbono. Los controles deben hacerse cuando menos dos veces al día durante el transcurso de la fermentación. El final de ésta es detectado por los reductores totales.

Se descuba el vino (separación del vino de las heces) y los recipientes en donde se recibe el vino, deben llenarse casi totalmente teniendo la precaución de dejar un pequeño espacio entre la superficie del líquido y el tapón para alojar el CO_2 que todavía pueda producirse. Existen varios sistemas para la clarificación de un vino, ya sea en escala industrial o a nivel laboratorio, entre los más comunes se encuentran: Caseína de 30 a 50 mg/l, para vino blanco y rosado, Albúmina de 80 a 160 mg/l, para vinos claretes y tintos finos, Agar-Agar (Gel al 1%) de 150 a 300 mg/l, para vinos viscosos y mucilaginosos, Carbón activado de 0.5 a 1.0 g/l, para vinos pardos para ser decolorados.

El alumno puede escoger de éstas la que más le acomode o puede utilizar otros métodos investigados por él.

El vino se deja sedimentar de 24 a 48 horas sin importar el método de clarificación empleado, se guarda en refrigeración o en un lugar de baja temperatura. El vino es separado de todos los sólidos precipitados después de la clarificación. Una vez decantado el vino se le agregan otros 50 mg/l, de metabisulfito de potasio.

El envasado se debe de hacer en botellas de vidrio de medio o tres cuartos de litro, limpias; se llena la botella hasta el cuello teniendo cuidado de dejar un espacio entre la superficie del líquido y el tapón de corcho para alojar una posible producción de gases.

Se fabrica una etiqueta con todas las especificaciones que ampara la norma de etiquetas para bebidas alcoholicas de la Dirección General de Normas.

Pruebas Comparativas y de Control de Calidad.- A una botella de vino de mesa comercial y al vino obtenido en el laboratorio se les practican los siguientes análisis:

1.- Análisis Físicos: Apariencia, Presencia o ausencia de gas, color, olor, sabor, astringencia, textura y cuerpo.

b.- Análisis Químicos: Reductores Directos, Reductores Totales, - Acidez Volátil, Acidez Fija, Acidez Total, pH, Porcentaje de - Etanol.

Se debe reportar en cuadros los resultados tanto físicos como químicos, anexando aclaraciones o comentarios, además de observaciones sobre las diferencias más notables, entre el vino comercial y el vino del laboratorio, explicando la posible causa de ésta diferencia, así como recomendaciones para que en una repetición del - trabajo práctico ésta diferencia disminuya o desaparezca.

CUESTIONARIO:

- 1.- Mecanismo de la fermentación alcohólica.
- 2.- Diga por qué en la elaboración de vino, se agrega metabisulfito de potasio y como actúa éste.
- 3.- ¿Cual es el objeto de la clarificación?
- 4.- ¿Que es un trasiego?
- 5.- ¿Por qué se determina acidez volátil en los vinos?

METODOS DE EVALUACION:

El alumno será evaluado en función de:

- El rendimiento de la fermentación, obtenido por medio de un balance (aceptable desde un 70%)
- Todos los datos obtenidos en los controles de la fermentación, - reportados en gráficas y tablas.
- Las pruebas comparativas y de control de calidad. La Dirección- General de Normas da los siguientes límites para el vino de mesa

ESPECIFICACIONES	MINIMO	MAXIMO
Grado alcohólico °GL real a 15°C (% de alcohol en volumen a 15°C).....	6	15
Reductores totales previa inversión g/l ..	-	80
Acidez total (ac. tartárico) g/l	4.0	8.75
Acidez volátil corregida (ac. acético) g/l	-	1.2

- Los resultados de los análisis físicos.
- Las conclusiones y observaciones.

BIBLIOGRAFIA.

4,5,6,7,10,13,14,18,22,23,24,28,29,30,31,32,36,29,41,43,49,51,53,54,57,58,60,62,64,65,66,70.

PRACTICA No. 4

FERMENTACION ALCOHOLICA II.- PRODUCTO DESTILADO.

ELABORACION DE RON.

- I.- OBJETIVO: La obtención en el laboratorio de un producto destilado, los controles durante la fermentación y un análisis físico químico del ron obtenido.
- II.- MATERIAL:
- Un fermentador (El utilizado en la práctica de Obtención - de Biomasa con todos sus dispositivos).
 - Cinco matraces Erlenmeyer de 250 ml.
 - Un matraz de fondo plano de 1 litro con tapón de hule.
 - Tres pipetas volumétricas de 5 ml.
 - Una bureta de 50 ml.
 - Un embudo de cola larga.
 - Dos soportes universales.
 - Tres pinzas de tres dedos.
 - Un mechero con manguera.
 - Una tela de asbesto.
 - Dos refrigerantes.
 - Una trampa Kjeldahl.
 - Un termómetro de - 10 a 260°C.
 - Cuerpos de ebullición.
 - Papel pH.
 - Papel filtro.
 - Un litro de jugo de caña (guarapo) o la cantidad equivalente para obtener de dos a tres litros de jugo de caña, con una concentración de 14 a 18% de azúcares reductores totales
- III.- REACTIVOS:
- Solución de Fehling "A"
 - Solución de Fehling "B"
 - Solución de NaOH concentrada.
 - Solución de NaOH 0.1 N.
 - Solución de HCl concentrada.
 - Solución de HCl 0.1 N.
 - Solución de fenolftaleína.
 - Solución de azul de metileno.
 - Oxalato de potasio.
 - Subacetato de plomo.

EXPERIMENTO:

Preparación del Medio de Cultivo.- Se mide y ajusta (de 14 a 18%) la cantidad de reductores totales de guarapo, el volúmen puede ser de dos a tres litros, se pesan 362 mg/l de sulfato de amonio-dibásico ($(\text{NH}_4)_2\text{HSO}_4$), y la misma cantidad de fosfato de amonio-dibásico ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), se disuelven éstas sales en 10 ml de agua destilada y se esterilizan tanto las sales inorgánicas como los-carbohidratos en matraces separados, a una temperatura de 121°C y 1.4 Kg/cm² de presión durante 10 minutos. Se enfrían y se mezclan en una zona estéril, se ajusta el pH a 4.8-5.0, con solución de H_2SO_4 diluido.

Preparación del Inóculo y Pie de Cuba.- Se facilita al alumno un tubo de ensaye con cepa de *Saccharomyces Cerevisiae*, el cual se procede a recembrar en 50 ml del medio preparado, se incuba a una temperatura de 28 a 30°C , de preferencia en una mesa de agitación controlada o en un cuarto con temperatura constante. Una vez que el microorganismo se ha acondicionado al medio líquido, se prepara un pie de cuba, esto es, se agregan de 100 a 150 ml más del mosto estéril y se mantiene en las mismas condiciones de temperatura y aireación. Uno o dos días después se inocula el resto del mosto obtenido, manteniéndolo a una temperatura de 28 a 30°C ya sin agitación.

Controles Durante la Fermentación.- Estos son: Reductores Directos, Reductores, Totales, Acidez Volátil, Acidez Fija, Acidez Total, Por ciento de Etanol, pH, Temperatura y Producción de CO_2 . Estos controles se deben hacer dos veces al día durante el transcurso de la fermentación. Cuando el valor de los reductores totales se aproxime a cero o permanezca constante en un valor bajo, -ésto nos indicará el final de la fermentación.

Destilación.- Se llevan a cabo dos destilaciones, la primera es una destilación simple, y en la segunda se utiliza una columna de fraccionamiento (refrigerante) con relleno poroso, también se puede empacar la columna con piedras de ebullición, perlas de vidrio o fibra de vidrio.

Primera Destilación.- Este proceso es una destilación simple y tiene como único fin el de separar todos los componentes alcohólicos, así como los aldehidos, ésteres y cetonas además de todos -

Los compuestos contenidos en el aceite de fúsel del mosto fermentado. Esto se logra destilando de 55-90°C, a presión normal.

Segunda Destilación.- En este paso al aparato de destilación se le adapta una columna de fraccionamiento, y se separan las partes principales en una destilación que son: Cabeza (temperaturas menores de 72°C), Corazón (temperaturas entre 72-76°C) y Colas (temperaturas mayores a 76°C). El ron debe contener cantidades muy pequeñas de ácidos, ésteres, aceite de fúsel etc. El ron también debe pasar por un período de maduración, pero por falta de tiempo este paso no se lleva a cabo en el laboratorio (*). Se le debe dar al ron presencia comercial, por lo tanto se le puede agregar un poco de azúcar quemada para darle el color característico. Se envasa en botellas de vidrio de medio o tres cuartos de litro limpias, se llena la botella hasta el cuello y se tapa con un tapón de corcho. Se fabrica una etiqueta con todas las especificaciones que ampara la norma de etiquetas para bebidas alcoholicas de la Dirección General de Normas.

Pruebas Comparativas y de Control de Calidad.- A una botella de ron comercial y al ron obtenido en el laboratorio se les practican los siguientes análisis:

- a.- Análisis Físicos: Apariencia, Color, Olor, Sabor, Textura, Astringencia y Cuerpo.
- b.- Análisis Químicos: Acidez Volátil, Acidez Fija, Acidez Total, pH, Porcentaje de Etanol, Aldehidos, Esteres y alcoholes superiores.

Se reporta en cuadros los resultados físicos y químicos, anexando aclaraciones o comentarios, además de observaciones sobre las diferencias más notables, entre el ron comercial y el ron del laboratorio, explicando la posible causa de ésta diferencia, así como recomendaciones para que en una repetición del trabajo práctico, ésta diferencia disminuya o desaparesca.

QUESTIONARIO:

- 1.- ¿Que es una destilación, como se efectua y que factores hay que tomar en cuenta?
- 2.- ¿Se puede obtener ron a partir de otras materias primas?
- 3.- De los siguientes productos alcoholicos mencione:

- a.- Materia prima de donde puede provenir.
 b.- Porcentaje de alcohol.
 c.- Otras dos características importantes con respecto a ese producto.

Los productos son: Alcohol desnaturalizado, alcohol potable, -- aguardiente, vino rosado, licor de naranja, crema de limón, -- whisky, brandy, champaña, cidra.

- 4.- Reportar en tablas y gráficas: acidez total Vs tiempo, acidez volátil Vs tiempo, acidez fija Vs tiempo, reductores directos Vs tiempo, reductores totales Vs tiempo, por ciento de etanol producido Vs tiempo.
- 5.- Rendimiento de la fermentación, obtenida por medio de un balance de ésta, anexando cuadro y calculos.
- METODOS DE EVALUACION: El alumno será evaluado en función de:
- El rendimiento de la fermentación (aceptable desde un 70%).
 - Todos los datos obtenidos en los controles de la fermentación reportados en gráficas y tablas.
 - Los resultados de las pruebas comparativas y control de calidad, cotejados con el siguiente cuadro que da la Dirección General de Normas para la producción de ron en México:

ESPECIFICACIONES	MINIMO	MAXIMO
Grado alcohólico GL real a 15°C (% de alcohol en volumen a 15°C).....	38	55
Aldehidos (como acetaldehido) mg/l	--	500
Acidez total (en ac. acético) mg/l	--	1200
Esteres (en acetato de etilo) mg/l	--	20
Alcoholes superiores mg/l	--	4000

- Los resultados de los análisis físicos.
- Las respuestas del cuestionario.

BIBLIOGRAFIA.

4,5,6,7,10,13,14,18,22,23,24,28,29,30,31,32,36,38,41,43,49,51,53,--
 54,57,58,60,62,64,65,66,70.

(*) NOTA: Si el alumno lo desea, se puede hacer como práctica extra un añejamiento rápido del ron.

CAPITULO IV.

FERMENTACION ACETICA.

- DIFERENTES TIPOS DE FERMENTADORES.
- BIOQUIMICA DE LA FERMENTACION ACETICA.

PRACTICA No. 5

MODIFICACION AL METODO FRANCES O DE ORLEANS.

PRACTICA No. 6

METODO DE ACETIFICACION SUMERGIDA.

FERMENTACION ACETICA:

PRODUCCION:

La fermentación acética es conocida por el hombre desde hace muchos años, como consecuencia del agriamiento del vino. Técnica-mente el vinagre es un alimento producido por fermentación, que contiene no menos de 4 g de ácido acético por 100 ml, tiene características especiales de aroma y sabor producidas durante la fermentación, cuya concentración y composición es muy diversa; es endo en función directa de la materia prima.

Estas características especiales no se encuentran en una -- ntesis química de ácido acético.

El vinagre es un compuesto químico, se usa como condimento, se prepara por dos procesos microbianos separados, primero una -- ermentación alcohólica de las diversas materias primas que con- enen azúcares naturales o fermentables, efectuado por especies de levaduras del género Saccharomyces, en segundo lugar ocurre la fermentación oxidativa del alcohol, obtenida por especies de bacterias del género Acetobacter.

Usos del Vinagre.- Dentro de la industria de alimentos se emplea en gran amplitud, como condimento de platillos de mesa, en productos ya preparados (mayonesa, mostaza, salsas, chiles, aderezos, etc.), impide el crecimiento de mohos en el pan; en la fabricación de conservas, etc. En medicina suele usarse el vinagre como antiséptico.

DIFERENTES TIPOS DE FERMENTADORES:

Se pueden hacer dos grupos con los métodos más usados en la fabricación del vinagre:

- 1.- Métodos lentos, Francés o de Orleáns (como el procedimiento casero).
- 2.- Métodos rápidos, Generador de Virutas y Acetificación sumergida, (siendo estos de mayor aplicación en la industria de vinagre en México).

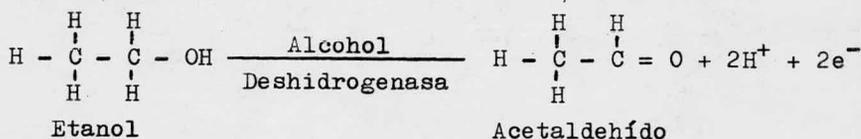
En el método lento no se mueve el mosto durante la acetificación, en el método rápido sí se mantiene el mosto en movimiento.

BIOQUIMICA DE LA FERMENTACION ACETICA.

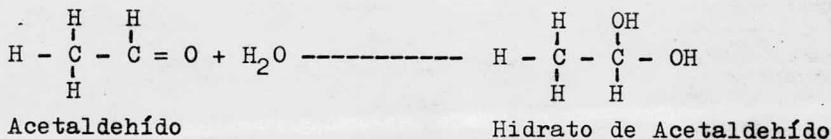
Existen varias teorías sobre la formación de Acido Acético. La oxidación de alcohol a ácido acético es el resultado de reacciones de deshidrogenación, involucradas en el sistema de citocromos.

La conversión de alcohol a ácido acético puede ser representada por las siguientes reacciones:

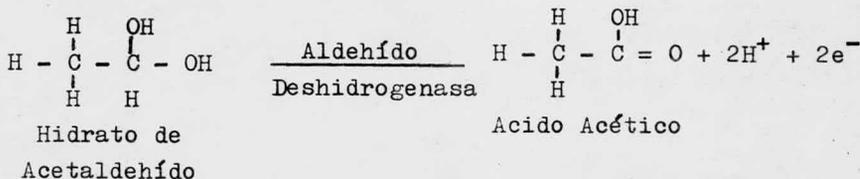
1.- Formación de Acetaldehído:



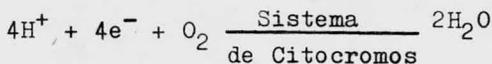
2.- Hidratación del Acetaldehído:



3.- Formación de Acido Acético:



4.- Transferencia de Electrones:



ETIVO:

Conocer los fundamentos y características de las técnicas más leadas para la producción de vinagre, así como los controles - se requieren durante el proceso.

ERIAL:

- Fermentador.
- Un frasco de boca ancha de 3000 ml.
- Un tapón de hule (del tamaño de la boca del frasco).
- Una bomba de aireación.
- Un termómetro de -10° a 260°C
- Un embudo de separación.
- Tubo de vidrio de 5 mm ϕ .
- Una tapa de madera o plástico.
- Manguera de hule 5 mm ϕ .
- Una bujía (piedra para romper la burbuja de aire).
- Cinco matraces Erlen-Meyer de 250 ml
- Un matraz de fondo plano de 1000 ml con tapón de hule.
- Tres pipetas volumétricas de 5 ml
- Una pipeta volumétrica de 10 ml
- Una bureta de 50 ml
- Un embudo de cola larga.
- Un refrigerante con manguera.
- Una trampa de Kjeldahl.
- Un matraz aforado de 100 ml
- Un picnómetro de 25 ml
- Un termómetro de -10° a 260°C
- Un soporte universal.
- Dos pinzas de tres dedos.
- Un mechero con manguera.
- Una tela de asbesto.
- Papel pH.
- Papel filtro.
- Cuerpos de ebullición.
- Un metro de tela muselin.

ACTIVOS:

- Solución de Fehling "A".
- Solución de Fehling "B".
- Solución de NaOH concentrada.
- Solución de NaOH 0.1 N.
- Solución de HCl concentrada.
- Solución de HCl 0.1 N.
- Solución de fenoftaleína.
- Solución de Azul de metileno.

1.- MODIFICACION AL METODO FRANCÉS O DE ORLEANS.

Este método es el más antiguo y el que mejores resultados da en la producción de vinagre de mesa.

Método.- En el fermentador (fig 4.1) se colocan 2 litros de vinagre (este vinagre debe ser casero o en su defecto comercial. Si es comercial, se debe agregar una madre de vinagre), se adiciona un litro de mosto alcohólico ⁺⁺, con las siguientes características:

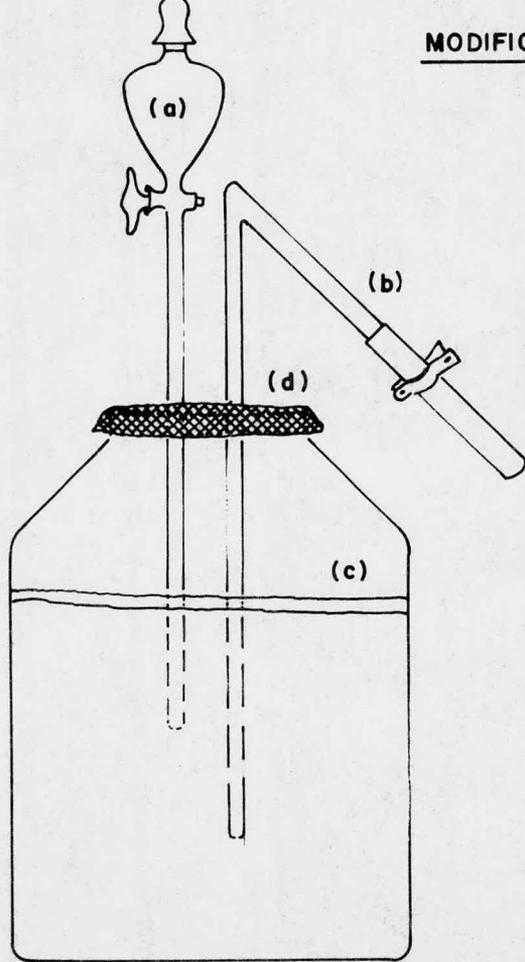
Etanol.....	10 - 11%
Fosfato de Amonio Dibásico.....	1.0 g
Sulfato de Magnesio Heptahidratado.....	0.2 g
Sulfato de Potasio Dibásico.....	0.1 g
Volúmen de Medio.....	1.0 l

NOTA:

⁺⁺ El mosto alcohólico se puede obtener por cualquiera de los métodos vistos durante la práctica de Fermentación Alcohólica.

MODIFICACION AL METODO DE ORLEANS

(Fig. 4.1)



PARTES DEL FERMENTADOR

- a .- Sistema de Alimentacion
- b .- Sistema de toma de muestra .
- c .- Zooglea
- d .- Tela de muselin .

A la siguiente semana se le agrega otro litro de mosto con -ual composición, a la tercera semana se separa un litro de vinae y se reemplazá por la misma cantidad de mosto alcohólico, se-pte sucesivamente esta operación estableciendose así un siste-contínuo.

La boca del fermentador se encuantra cubierta por una tela de selin, esto permite la entrada de aire e impide el acceso de bara e insectos al mosto en fermentación.

Las bacterias acéticas forman una película fina sobre la su-rficie de la solución con el tiempo se hacen gruesa y gelatino-se. Se debe evitar el agitar o mover violentamente el fermentador que provoca que la capa musilaginosa se vaya al fondo, al un-se provoca el consumo de las sustancias nutritivas del medio, -la producción de ácido, para evitar el hundimiento de la zooglea-agregar el mosto alcohólico, se adapta al fermentador un embu-de cola larga que deposita suavemente el líquido en el medio, -abién se adapta un tubo de vidrio unido a una manguera para ex-er el vinagre por medio de un simple sifón.

El vinagre producido es de buena calidad, el proceso es lento costoso.

La temperatura de la fermentación es de 28 a 30° C.

2.- METODO DE ACETIFICACION SUMERGIDA.

La investigación de éste procedimiento se atribuye a Hromatka, y Haeseler, algunos otros investigadores han modificado és el proceso introduciendo cambios en el sistema de aireación. En este proceso las bacterias del vinagre utilizan el oxígeno introducido en forma de pequeñas burbujas de aire y el alcohol del mos para formar ácido acético.

En este método no hay sólidos de empaque dentro del generador de fermentación, como coque o virutas de madera, quedando eliminada la formación de mucílago, no hay contaminación de fierro y cobre como sucede con el empaque de coque.

La fabricación de vinagre por éste sistema requiere de un equipo especial actualmente existen tres métodos apropiados de acetifi-
cación sumergida:

El Acetador.- Desarrollado sobre las bases de la investigación de Hromatka y colaboradores en Austria.

El Cavitador.-Basado en un invento usado para la oxidación biológica de aguas domésticas residuales, descrito por Choes y Steffen, patentado por Borgon y asociados. Modificado por Meyer para la producción de flujo continuo.

El Aspirator.- Desarrollado por Richarson.

Estos tres procesos difieren en el método de introducir y dis-tribuir el aire en el medio de fermentación.

En esta práctica trataremos el sistema Acetator por contar en el equipo en el laboratorio, además tiene una amplia acceptación en la producción de vinagre en México.

CARACTERISTICAS GENERALES DEL EQUIPO DEL LABORATORIO.

Acetificador Frings, el tanque del acetator es de forma cilíndrica, puede estar hecho de acero inoxidable o de madera; en este caso es de plástico con cuatro baffles en su interior, la capacidad del tanque es de diez litros. Durante la fermentación se llena el tanque a tres cuartas partes de su capacidad. Se enfría por medio de un refrigerante en forma de serpentín de tubo por el ---

al pasa el agua fría, la cantidad de agua es controlada automáticamente.

La aireación se efectúa por medio de un aireador colocado en el fondo del tanque, es accionado por un motor eléctrico, el aire aspirado pasa por un filtro de carbón activado y fibra de vidrio, es distribuido en el medio del fermentador en forma de pequeñas burbujas, cuenta con un medidor de aire incorporado a la tubería de aire fresco.

La carga del tanque se encuentra en la parte superior del aparato, las muestras se toman por medio de una llave que se encuentra instalada en el fondo del tanque, también sirve para vaciar el tanque.

Posee un control del termostato a un lado del tanque, que junto con el sistema de refrigeración, sirve para ajustar la temperatura de mosto en fermentación.

METODOLOGIA:

Se puede llevar a cabo dos o más variantes en la fermentación acética, la diferencia consiste en la composición del mosto a utilizar.

1.- El vinagre "A".— Se obtiene a partir de mosto alcohólico de frutas y sales (si es que estas son necesarias).

Descripción del Método.— El mosto alcohólico de frutas es colocado en el acetator Frings a una temperatura de 29 - 30°C con una entrada de aire de 25 litro por hora. *Se debe acidificar el medio, esto tiene dos objetivos, primero inhibir el desarrollo de bacterias perjudiciales y segundo suministrar un medio adecuado para la inoculación.

La cantidad de sales que se agregan se encuentra en función directa de la materia prima que se utilizó en la fermentación alcohólica, aunque la literatura nos recomienda la adición de sales de amonio, magnesio y potasio.

Sulfato de Amonio Dibásico.....	1.0 g/l
Sulfato de Magnesio Heptahidratado.....	0.2 g/l
Sulfato de Potasio Dibásico.....	0.1 g/l

Al adicionar las sales se inocula el medio, con un diez por ciento de bacterias acéticas en relación al volúmen total, el inóculo creció en un medio de Hoyer⁺⁺.

Los controles que se hacen durante la fermentación son:

- Acidez Total.
- Alcohol en pociento.
- Temperatura.
- Cantidad de Oxígeno que entra al medio.

OTA:

⁺⁺ El inóculo será dado por el maestro, la técnica de aislamiento de la cepa se describe al final de la práctica.

2.- El vinagre "B".- Se produce de alcohol obtenido por destilación del mosto alcohólico de frutas.

Descripción del Método.- Es producido a partir del alcohol obtenido por destilación del mosto alcohólico de frutas, es necesario adicionar sales inorgánicas y factores de crecimiento para un buen desarrollo de las bacterias.

Composición del Mosto para obtener el vinagre "B".

Etanol.....	9 - 10%
Sacarosa.....	1.054 g/l
Fosfato de Amonio Dibásico.....	0.569 g/l
Sulfato de Magnesio Heptahidratado.....	0.117 g/l
Citrato de Amonio.....	0.117 g/l
Acido Pantotécnico.....	0.001 g/l
Volúmen de Medio.....	6.0 l

Condiciones Experimentales:

Temperatura.....	29 - 30° C
Aire.....	25 l/hr
Inóculo.....	10 %
Acidez Total.....	2 %

La áidez del medio se ajusta al 2% con vinagre

Los controles que se deben llevar a cabo durante la fermentación son iguales a los del vinagre "A".

3.- SISTEMA DE GENERADOR DE VIRUTAS:

El inicio de este sistema fue a principios del siglo pasado cuando Boerhave descubrió que cuando se dejaba caer el vino a través de un recipiente relleno de bagazo de manzana se producía rápidamente vinagre. En 1823 Schtzenbach, modificó el método de Boerhave empleando otros tipos de materias porosas, los que permiten un contacto más íntimo de los organismos con el aire, lo cual ha servido como base para los métodos modernos de fabricación.

El sistema de Generadores de virutas en alcohol diluido con agua, adicionada con la cantidad necesaria de materias nutritivas además de una cantidad de vinagre acabado, se deja caer en toneles verticales conteniendo material de relleno, al pasar el alcohol del mosto es oxidado y transformado en ácido acético; gracias a la actividad de las bacterias acéticas que se desarrollan en gran cantidad en los materiales de relleno; el mosto fluye por la parte baja de generadores en forma de vinagre acabado. En la parte baja del generador lleva un falso fondo perforado, a través del cual entra aire. Algunos otros generadores de mayor tamaño tienen otro bastidor perforado aproximadamente a la mitad, ayudando a soportar el material de relleno, cerca del techo del generador hay una tapa perforada sobre la que se descarga un rociador respiratorio que distribuye uniforme el líquido sobre la parte alta del material de soporte.

Para obtener la acidez deseada puede pasarse varias veces el líquido por el generador o bien a través de dos o tres generadores conectados en serie, con lo cual se incrementa la acidez hasta llegar a la deseada.

MODIFICACION AL METODO DE GENERADOR DE VIRUTAS.

Descripción del aparato.- Se utiliza el mismo fermentador que se ha usado en prácticas anteriores. El sistema de aireación es el mismo, una bomba de pecera con terminales de 2 bujías para el mejor rompimiento de la burbuja de aire. Se coloca un tubo de seguridad para la salida de gases, un sistema de toma de muestras formado por un tubo de vidrio y una manguera con una llave de (aire).

Un bastidor de madera perforado que sirva para soportar el material de relleno empleado, evitando la presión de éste en el fondo; haciendo que no se entorpezca el sistema de aireación; facilita el movimiento del mosto alcohólico por todo el fermentador, aumentando la superficie de contacto y disminuyendo el tiempo de fermentación.

La cantidad de oxígeno se regula por unas pinzas de morecidas a la salida del aire de la bomba y el filtro de aire, cuyo objetivo es detener cualquier cuerpo extraño que pueda estar presente en el aire del medio ambiente. Se coloca un termómetro que llegue a la mitad del fermentador.

El material de relleno debe cumplir con varios requisitos indispensables, como son tener la mayor superficie posible ocupando el mismo tiempo el menor espacio, y ser poroso o sea que pueda absorber una cierta cantidad de líquido; debe tener resistencia al agua; al alcohol y conservar su forma por largo tiempo. Con el transcurso del tiempo no debe compactarse, formar glómérulos o bolitas impermeables, los materiales que cumplen estos requisitos son virutas de madera de haya roja, el carbón de madera en pedacitos del tamaño de avellanas, el corcho, trozos de madera, olote, trozos de ramaje, cepas y escobajos de uvas; también puede emplearse la madera de roble que es adecuada por su durabilidad.

Una buena viruta tiene una superficie aspera algo ondulada y rugosa sobre la que se fijan fácilmente las bacterias. El apretamiento de las virutas no debe ser excesivamente flojo ni demasiado apretado, el aire debe circular fácilmente por los pliegues de la viruta. Antes de introducir las virutas al fermentador se deben de tamizar para apartar el polvo, pedazos de madera, piedrecitas metálicas, como clavos, alambre, etc. Este paso es importante que si entra en el generador una pieza de metal, provoca un color negro en el vinagre.

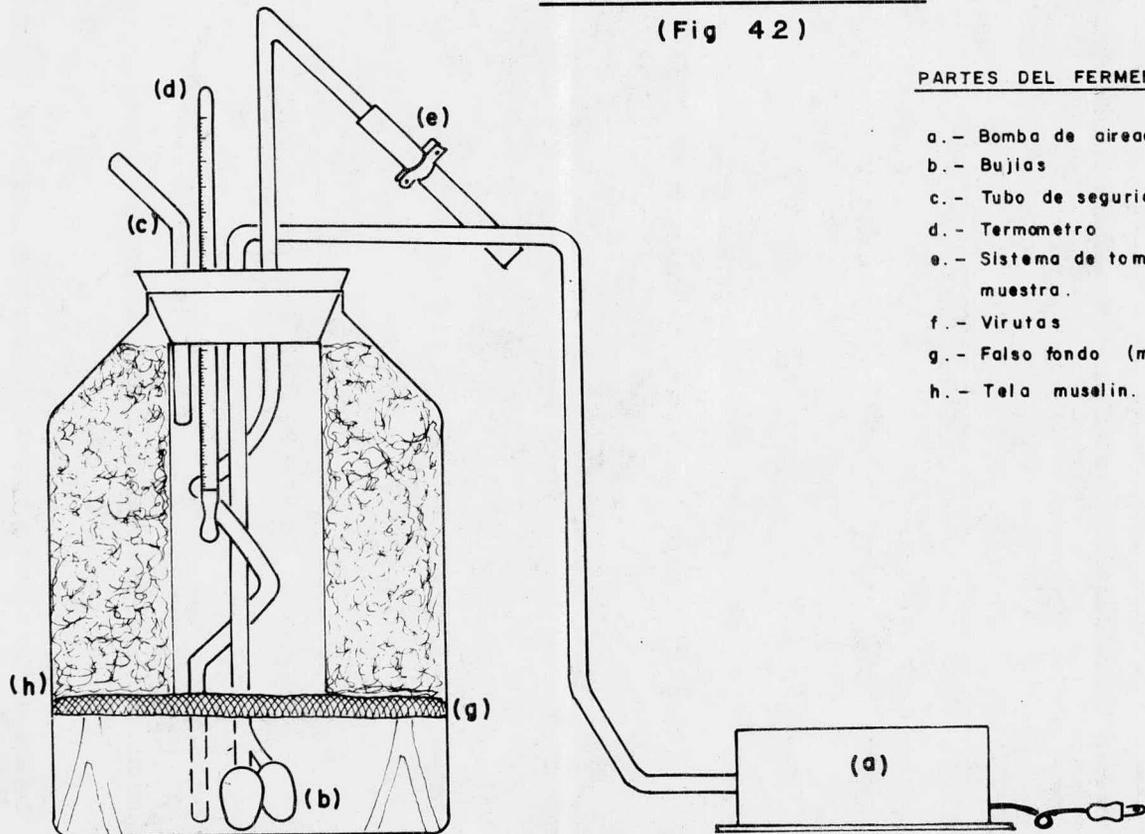
Construcción del Aparato. (fig. 4.2)

MATERIAL:

- Cantidad suficiente de viruta de madera (roble o haya roja)
- Un frasco de 3000 ml
- Tubo de vidrio de 5 mm ϕ .

GENERADOR A VIRUTAS

(Fig 42)



PARTES DEL FERMENTADOR

- a.- Bomba de aireación
- b.- Bujías
- c.- Tubo de seguridad
- d.- Termometro
- e.- Sistema de toma de muestra.
- f.- Virutas
- g.- Falso fondo (madera)
- h.- Tela muselin.

- Una bomba de aireación.
- Dos Bujías.
- Una "Y" para el sistema de aireación.
- Una llave de more.
- Una tarima de madera con perforaciones.
- Manguera de plástico de 5 mm \varnothing .
- Tela de muselín (manta de cielo).

METODO:

Se tamiza la viruta y se esteriliza junto con la tela, se coloca la tela de modo que cubra toda la plataforma de madera; se hace para evitar que caiga viruta en la cámara colectora y obstruya el tubo de toma de muestra y vaciado. Se coloca la plataforma en el fondo del frasco de vidrio y se adapta al sistema de aireación. Se meten las virutas al frasco y son distribuidas uniformemente, debe de quedar un espacio libre para que el falso fondo que se al descubierto, esto será en el centro del frasco en la dirección donde está el tubo de toma de muestra por donde entra la manera de aire.

MECANISMO DE TRABAJO:

Acetificación.- Una vez que el material de relleno está en su sitio se procede a sembrar las bacterias acéticas en el generador, esto se logra agregando a éste una mezcla de vinagre de buena calidad y las bacterias acéticas crecidas en el medio de Hoyer. Esta mezcla debe de tener una acidez mayor al 5% y una concentración de alcohol residual del 1%. Este alcohol es necesario para que las bacterias puedan vivir en el vinagre durante esta operación. La calidad del vinagre utilizado en la acetificación, es determinante para el buen funcionamiento del generador, el volúmen total de la mezcla es de 3 litros.

MENTACION:

Después de la acetificación, el generador debe de gotear durante 12 horas, posteriormente se vacía la cámara colectora y se introduce la primera mezcla normal de trabajo.

La composición de la mezcla es la siguiente:

Alcohol.....	8 %
Acidez.....	1 %
Sacarosa.....	1.054 g/l
Fosfato de Amonio Dibásico.....	0.569 g/l
Sulfato de Magnesio Heptahidratado.....	0.117 g/l
Citrato de Amonio.....	0.117 g/l
Acido Pantoténico.....	0.001 g/l
Volúmen total del medio.....	3000 ml

Las bacterias acéticas necesitan una temperatura de más de 20°C para estimular su actividad, la temperatura óptima es 28°C .

CONTROLES DURANTE LA FERMENTACION:

- Acidez Total.
- % de Alcohol.
- Temperatura.

CLARIFICACION:

Independientemente del método utilizado en la fermentación acética, el producto final debe clarificarse. Durante la clarificación no se debe modificar las características desarrolladas en el vinagre, es decir el aroma desarrollado no debe ser disminuido, los componentes secundarios producidos biológicamente no deben ser dañados y las sustancias extractivas normales y colorantes no deben ser eliminados completamente.

Es importante distinguir la composición de las sustancias enturbiantes del medio fermentado.

En el vinagre producido a partir de alcohol de frutas, las sustancias enturbiantes generalmente se componen de las bacterias del vinagre, en cambio los vinagres ricos en extracto como el vinagre de frutas, cuyas sustancias enturbiantes dependen de la composición del fruto y principalmente de la edad de éste, lo que más encontramos son sustancias de desintegración celulósica; pectinas, búminas bacterias y otras sustancias extractivas insolubles flocculentas.

Todos los vinagres pueden obtener por un almacenamiento largo, el estado característico, en el que las sustancias que el líquido no puede soportar debido a sus propiedades físicas y químicas, se han sedimentado en el fondo. Sin embargo las condiciones económicas ya no permiten almacenamientos largos.

El método más simple de filtración, es usar una malla de tejido fino y suficientemente vellosa para eliminar las películas grandes y hacer escurrir líquidos de materiales gelatinosos.

Los filtros de mayor uso en la industria se basan en la adición de mezclas de amianto y celulosa en fibras finas, que estanhúmedas se juntan y ofrecen una buena filtración. Se debe de bajar con mezclas de diversos materiales filtrantes, estas mezclas deberán componerse de sustancias de filtración fina y débil la filtración demasiado fuerte puede tener como consecuencia una disminución en las características que constituyen la calidad del vinagre.

La formación de capas filtrantes en la filtración es por el momento el método más conveniente para la clarificación de grandes cantidades de líquido a un precio moderado. Este tipo de filtración ofrece un producto brillante y parcialmente estéril y el costo de la masa filtrante es muy baja.

Si el alumno no puede conseguir éste tipo de filtros, puede utilizar los de la práctica de Fermentación Alcohólica o usar un filtro Millipore, una centrifugación o para un mejor resultado -- bas.

PRUEBAS COMPARATIVAS Y DE CONTROL DE CALIDAD.

El vinagre obtenido en el laboratorio se compara con un vinagre comercial, realizando los siguientes análisis.

a.- Análisis Físicos:

- Apariencia.
- Color.
- Olor.
- Sabor.
- Densidad.
- pH.

b.- Análisis Químicos

- Acidez Total.
- Reductores Totales.
- % de Alcohol.
- Adición de ácidos minerales. (adulteración de vinagre).

AISLAMIENTO DE LA CEPA A UTILIZAR EN LA FERMENTACION ACETICA.

La cepa de Acetabacter fue aislado de la siguiente manera: Utilizando cáscaras de piña fermentada (150 g) y 200 ml de un medio alcohólico con la siguiente composición:

Etanol.....	8.0 %
Sulfato de potásio Dibásico.....	1.0 g/l
Sulfato de magnesio Heptahidratado.....	0.2 g/l
Fosfato de amonio Dibásico.....	0.1 g/l

Se distribuye éste medio en tres matraces Erlen-Meyer de 250 y se airea en una mesa de agitación a 200 rpm y una temperatura de 28°C durante 72 horas.

Se preparo un medio de Manitol-Agar para el desarrollo del Acetabacter.

La composición del medio es la siguiente:

Manitol.....	25 g
Agar.....	15 g
Extracto de Levadura.....	5 g
Peptona.....	1000 ml

Una vez obtenido el medio, se preparan cajas de Petri, y cuando se ensaya con medio inclinado, se siembra en estría con una cantidad del mosto alcohólico. Se incuba a diferentes temperaturas, para favorecer el crecimiento de las diversas especies de Acetabacter:

Acetabacter aceti, tiene una temperatura óptima de 26°C llega a producir el 5% de ácido acético.

Acetabacter acetigenum, tiene una temperatura óptima de 33°C proporciona aroma al vinagre haciéndolo más agradable.

Acetabacter Xylinum, tiene una temperatura óptima de 30°C se caracteriza por el color amarillo ocre y una mucosidad elevada, este microorganismo tiene poca conversión de alcohol a ácido acético y proporciona un sabor amargo al vinagre.

Acetobacter aceti, A. peroxidans, A. lovaniense y A. acetigenum, presentan crecimiento en el medio de Hoyer y la especie de Acetobacter xylinum, A. ranciers, A. mesoxidans y A. acendes, no crecen en el medio de Hoyer, lo cual es una ventaja pues tres de

estos últimos, pueden causar problemas en la fermentación;

La composición del medio de Hoyers es la siguiente:

Etanol.....	30.00 g
Sulfato de Amonio Dibásico.....	1.00 g
Fosfato de Potasio Dibásico.....	0.90 g
Fosfato de Potasio Monobásico.....	0.10 g
Sulfato de Magnesio Heptahidratado.....	0.25 g
Cloruro Férrico Hexahidratado.....	0.02 g
Agua destilada.....	1.00 l

Se esterilizan las sales en cuatro quintas partes del volúmen final y el alcohol en el volúmen restante, Se coloca éste medio en matraces Erlen-Meyer de 250 ml con un volúmen de 75 ml cada uno, y se inóculan con el microorganismo sembrado en el medio nitrol-Agar, se colocan en la mesa de agitación a 200 rpm y a una temperatura de 30°C.

ESTIONARIO:

- 1.- Mencione algunas materias primas a partir de las cuales se puede obtener vinagre.
- 2.- ¿ Qué microorganismos se usan en la obtención de vinagre y por que?.
- 3.- Mencione las diferencias que existen entre el método de acetificación sumergida y el generador de virutas.
- 4.- ¿ Qué es un soporte, y que función tiene ?.
- 5.- Comercialmente a que concentración se vende el vinagre - y cuales son los ácidos inorgánicos que generalmente se usan para adulterar el vinagre.
- 6.- Mecanismo de la fermentación Acética.
- 7.- ¿ Se usa Metabisulfito de Potásio en la fermentación Acética por que ?.
- 8.- Gráfica y Tabla de por ciento de Acidez vs. Tiempo.
- 9.- Gráfica y Tabla de por ciento de Etanol vs. Tiempo.

RENDIMIENTO PARA LA FERMENTACION ACETICA:

Para el generador de acetificación sumergida el rendimiento se calcula, considerando solamente las concentraciones inicial y final del alcohol, esto se puede hacer por no haber pérdidas o éstas son mínimas de etanol, debido a la presencia de un "colchón" de espuma en la superficie del líquido en fermentación, que sieve para condensar el alcohol que se está evaporando, devolviéndolo a la mezcla de reacción. (50).

$$\text{RENDIMIENTO} = \frac{C_1 - C_F \times 100}{C_1}$$

C₁.- Concentración Inicial de alcohol.

C_F.- Concentración final de alcohol.

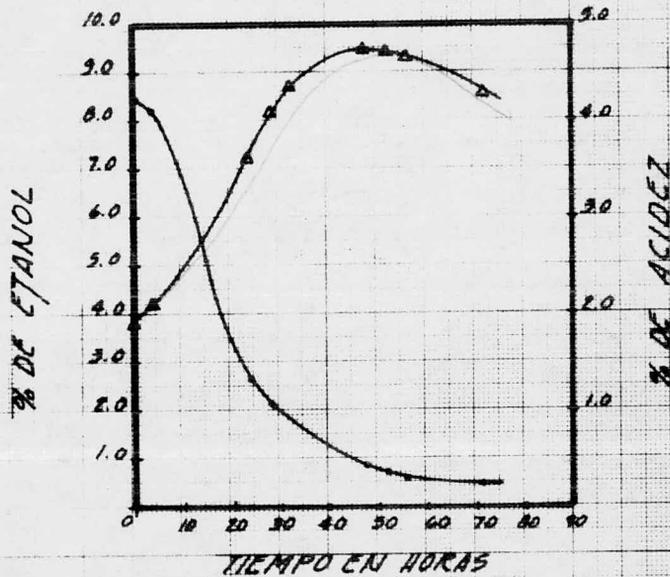
NOTA:

⁺⁺Se debe reportar en cuadros los resultados tanto Físicos como Químicos, anexando observaciones, aclaraciones y comentarios.

BIBLIOGRAFIA:

2, 4, 6, 7, 8, 9, 15, 18, 26, 28, 34, 36, 50, 51, 59, 62, 64, 68, 69, 71.

FERMENTACION ACETICA
 MOSTO ALCOHOLICO DE FRUTAS
 (DATIL DE PALMA CHINA)



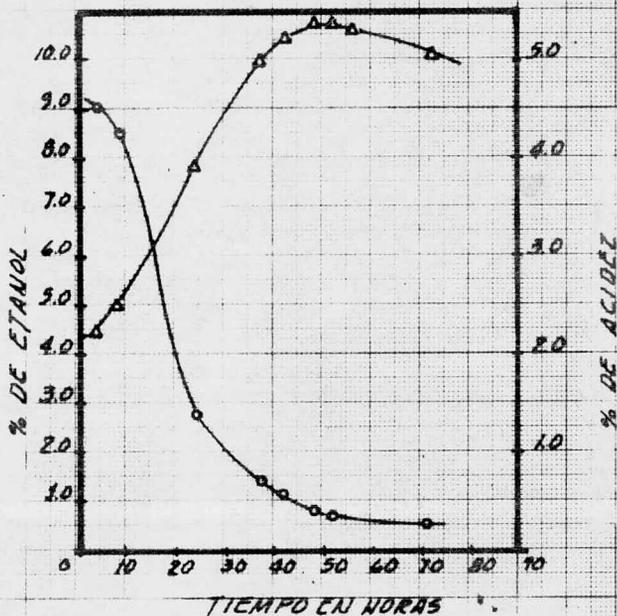
TIEMPO	% ETANOL	% ACIDEZ
0	8.45	1.91
4	8.28	2.05
24	2.63	3.57
28	2.04	4.15
32	1.81	4.33
48	0.82	4.74
52	0.67	4.73
56	0.53	4.72
72	0.49	4.75

% DE ETANOL ●

% DE ACIDEZ ▲

METODO DE ACETIFICACION SUMERGIDA.

FERMENTACION ACETICA MOSTO DE ALCOHOL DESTILADO



TIEMPO	% ETANOL	% ACIDEZ
0	9.25	2.12
4	9.08	2.22
8	8.52	2.50
24	2.79	3.96
38	1.49	5.04
42	1.18	5.21
48	0.86	5.38
52	0.70	5.30
56	0.58	5.29
72	0.50	5.08

% ETANOL ○

% ACIDEZ △

METODO DE ACETIFICACION SUMERGIDA

EXPERIMENTO: Originalmente este método era para la obtención de vinagre a partir del vino, pero debido al alto costo que representaría hacer una práctica con vino, se les da la opción de -- trabajar con el mosto alcohólico reportado en esta práctica.

Método.- En el fermentador se colocan dos litros de vinagre, -- (éste vinagre deberá de preferencia ser casero o en su defecto-comercial, si es comercial el vinagre, se debe agregar a éste, -- medio litro de vinagre casero o una madre de vinagre) se le adi -- ciona un litro de mosto alcohólico (*), con la siguiente concen -- tración de alcohol y sales:

Etanol	10-11 %
Fosfato de amonio dibásico	1.0 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.2 g
Sulfato de potasio dibásico	0.1 g
Volúmen de medio.....	1.0 l

A la semana siguiente se le agrega otro litro de mosto con igual composición que en el anterior, a la tercera semana se separa un litro de vinagre, reemplazándolo por la misma cantidad de mosto alcohólico, se repite sucesivamente ésta operación, establecien -- dose así un sistema continuo. La boca del fermentador se encuen -- tra cubierta por una triple capa de tela con poro fino, esto -- permite la entrada de aire e impide además el acceso de basura -- e insectos al mosto de fermentación.

Las bacterias acéticas forman una película fina sobre la super -- ficie de la solución, que con el tiempo se hace gruesa y gela -- tinoso. Se debe evitar el agitar o mover violentamente el ma -- traz, ya que ésto provocaría que la capa musilaginosa cayera al fondo, al undirse ésta, provoca el consumo de las sustancias -- nutritivas del medio, sin producción de ácido acético, para evi -- tar el undimiento de la zooglea al momento de agregar el mosto -- alcohólico, se le adapta al fermentador un embudo de cola larga que sirve para depositar suavemente el líquido en el medio, tam -- bién se le adapta un tubo de vidrio en forma de "L" unido a una manguera para la extracción del vinagre, por medio de un simple sifón.

Controles Durante la Fermentación.- Estos son: Temperatura e -- Higiene, entre cada semana o ciclo, se toman datos de Acidez -- Total (una por día).

Se filtra el vinagre y si es necesario se clarifica. El envasado se debe de hacer en botellas de medio o tres cuartos de litro, — limpias; se llena la botella hasta el cuello teniendo cuidado de que el espacio entre la superficie del líquido y el tapón sea — muy pequeño, para evitar lo más posible el contacto entre el oxígeno y el vinagre.

Pruebas Comparativas y de Control de Calidad.— A una botella con vinagre comercial semejante al obtenido en el laboratorio, y a éste último se les practican los siguientes análisis:

- a.- Análisis Físicos.— Apariencia, Color, Olor, Sabor, Densidad y pH.
- b.- Análisis Químicos.— Acidez Total, Reductores Totales, Porcentaje de Alcohol y Adición de Ácidos Minerales (adulteración de vinagres). Se debe reportar en cuadros los resultados, — anexando observaciones, aclaraciones o comentarios.

- CUESTIONARIO:

- 1.- Mencione algunas materias primas a partir de las cuales se puede obtener vinagre.
- 2.- ¿Que microorganismos se usan en la obtención de vinagre y — por que?
- 3.- ¿Comercialmente a que concentración se vende el vinagre y — cuales son los ácidos inorgánicos que generalmente se usan para adulterar el vinagre?
- 4.- Mecanismo de la Fermentación Acética.

- METODOS DE EVALUACION: El alumno será evaluado en función de:

- El rendimiento de la fermentación.
- Los resultados de las pruebas comparativas y de control de — calidad, cotejados con el siguiente cuadro:

ESPECIFICACIONES	CANTIDAD
Acidez Total (en ac. acético)	mayor a 5 %
Reductores Totales	menos del 2 %
Porcentaje de Etanol.....	menos del 1 %

- Los resultados de los análisis físicos.
- Las respuestas al cuestionario.

*) NOTA: El mosto alcohólico se obtiene por cualquiera de los — métodos conocidos, ya por el alum o para éste propósito, vistos durante la práctica de fermentación alcohólica).

BIBLIOGRAFIA.

2, 4, 6, 7, 8, 9, 15, 18, 26, 28, 34, 36, 50, 51, 59, 62, 64, 68, 69, 71.

PRACTICA No. 6

FERMENTACION ACETICA II.

METODO DE ACETIFICACION SUMERGIDA

.- OBJETIVO: La producción de vinagre por un método rápido, los -- controles durante la fermentación y el análisis físico químico-- del producto obtenido.

.- MATERIAL:

- Un Acetificador Frings (Acetator)
- Cinco matraces Erlenmeyer de 250 ml
- Tres Pipetas Volumétricas de 5 ml
- Una bureta de 50 ml
- Un embudo de cola larga
- Un refrigerante con mangueras
- Una trampa Kjeldahl
- Un matraz aferado de 100 ml
- Un picnómetro de 25 ml
- Un termómetro de - 10 a 260°C
- Un soporte universal
- Dos pinzas de tres dedos
- Un mechero con manguera
- Una tela de asbesto
- Papel pH
- Papel filtro
- Cuerpos de ebullición

.- REACTIVOS:

- Solución de Fehling "A"
- Solución de Fehling "B"
- Solución de NaOH concentrado
- Solución de NaOH 0.1 N
- Solución de HCl concentrada
- Solución de HCl 0.1 N
- Solución de Fenolftaleína
- Solución de azul de metileno

EXPERIMENTO:

Características Generales del Acetator.- En el acetificador --- Frings, el tanque es de forma cilíndrica, puede estar hecho de acero inoxidable o de madera, en este caso es de plástico con cuatro baffles en su interior, la capacidad del tanque es de diez litros. Durante la fermentación se llena el tanque a tres cuartas partes de su capacidad. El enfriamiento se hace por medio de un refrigerante en forma de serpentín de tubo, por el cual pasa agua, la cantidad de ésta es controlada automáticamente. La aireación se efectúa por medio de un aireador colocado en el fondo del tanque, éste aireador es accionado por un motor eléctrico, el aire aspirado por éste pasa por un filtro formado de carbón activado y fibra de vidrio, a continuación el aire es distribuido en la mezcla de fermentación en forma de pequeñas burbujas, existe un medidor de aire incorporado a la tubería de aire fresco. La carga del tanque se encuentra en la parte superior del aparato, las muestras para análisis se toman por medio de una llave que se encuentra instalada en el fondo del aparato y que también sirve para el vaciamiento total del tanque. Posee un termómetro de control a un lado del tanque, que junto con el sistema de refrigeración, sirven para ajustar la temperatura -- del mosto en fermentación.

Método.- Para la producción de vinagre el mosto alcohólico -- utilizar puede provenir de dos fuentes que son:

- 1.- Fermentación Alcohólica de mostos de: jugos de frutas, materias con alto contenido de sacarosa, materias que contienen almidón y/o materias celulósicas.
- 2.- Destilación de los mostos alcohólicos descritos en el inciso anterior.

El mosto alcohólico es colocado en el Acetator Frings a una temperatura de 29-30°C y con una entrada de aire de 25 litros por hora. Se debe acidificar el medio (al 2% con vinagre) y esto tiene dos objetivos, primero, inhibe el desarrollo de ciertos tipos de bacterias perjudiciales y segundo suministra un medio adecuado para la inoculación. La cantidad de sales a agregar se encuentran en función directa de la materia prima que se utilizó en la

fermentación alcohólica, aunque la literatura nos recomienda (para mostos incluidos en el inciso uno) la adición de sales de amonio, magnesio y potasio.

Sulfato de amonio dibásico.....	1.0 g/l
Sulfato de magnesio heptahidratado.....	0.2 g/l
Sulfato de potasio dibásico.....	0.1 g/l

Para mostos incluidos en el inciso dos la composición del mosto — debe ser:

Etanol.....	de 9 a 10 %
Sacarosa.....	1.054 g/l
Fosfato de amonio dibásico	0.569 g/l
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.117 g/l
Citrato de amonio	0.117 g/l
Acido pantoténico	0.001 g/l
Volúmen del medio	6.0 l

Una vez que el medio se encuentra con todas sus sales, se procede a inocular, se agrega un diez por ciento con respecto al volúmen total, de bacterias acéticas crecidas en el medio de Hoyer (*).

Los controles que se deben llevar a cabo durante la fermentación son: Acidez Total, Porcentaje de Etanol, Temperatura y Cantidad de oxígeno que entra en el medio. Estos controles se deben de efectuar tres veces al día, durante el transcurso de la fermentación.

Terminada la fermentación se filtra el vinagre y si es necesario se clarifica. El envasado se hace en botellas de medio o tres cuartos de litro, limpias: se llena la botella hasta el cuello teniendo cuidado de que el espacio entre la superficie del líquido y el tapón sea pequeño, para evitar lo más posible el contacto entre el oxígeno y el vinagre.

Pruebas Comparativas y de Control de Calidad.— A una botella con vinagre comercial semejante al obtenido en el laboratorio, y a éste último, se les practican los siguientes análisis:

a.- Análisis Físicos: Apariencia, Color, Olor, Sabor, Densidad y pH.

b.- Análisis Químicos: Acidez Total, Reductores Totales, Porcentaje de Etanol y Adición de ácidos minerales (adulteración de vinagres)

Se debe reportar en cuadros los resultados tanto físicos como químicos, anexando aclaraciones o comentarios, además de observaciones sobre las diferencias más notables, entre el vinagre comercial y el vinagre del laboratorio, explicando la posible causa de ésta diferencia, así como recomendaciones para que en una repetición -- del trabajo práctico, ésta diferencia disminuya o desaparezca.

CUESTIONARIO:

- 1.- Mencione las diferencias que existen entre el método de acetificación sumergida y el generador a virutas.
- 2.- ¿Que es un soporte y que función tiene?
- 3.- ¿Se usa Metabisulfito de Potasio en la fermentación acética -- por que?

METODOS DE EVALUACION: El alumno será evaluado en función de:

- El rendimiento de la fermentación (aceptable desde un 70%)
- Los resultados de las pruebas comparativas y de control de calidad, cotejados con el siguiente cuadro:

ESPECIFICACIONES	CANTIDAD
Acidez total (en ac. acético).....	mayor al 5 %
Reductores totales	menos del 2 %
Porcentaje de etanol a 15°C	menos del 1 %

- Los resultados de los análisis físicos.
- Las respuestas al cuestionario.
- Todos los datos obtenidos en los controles de la fermentación, reportados en gráficas y tablas.

(*) **NOTA:** El inóculo será dado por el maestro, lo mismo que la --- técnica de aislamiento de la cepa a utilizar.

BIBLIOGRAFIA.

2,4,6,7,8,9,15,18,26,28,34,36,50,51,59,62,64,68,69,71.

CAPITULO V.

FERMENTACION LACTICA.

- BIOQUIMICA DE LA FERMENTACION LACTICA.
- OBTENCION DE PRODUCTOS VEGETALES FERMENTADOS.
- OBTENCION DE PRODUCTOS LACTEOS FERMENTADOS.

PRACTICA No. 7

FERMENTACION LACTICA I

- ELABORACION DE COL ACIDA.

PRACTICA No. 8

FERMENTACION LACTICA II.

- ELABORACION DE YOGURT.

FERMENTACION LACTICA.

INTRODUCCION.

Una de las industrias más amplias y abundantes de productos-fermentados es la industria de vegetales fermentados y productos-lácteos fermentados.

En su inicio fue de manufactura casera; pero debido a la gran aceptación que dichos productos tenían, se constituye pronto en una industria, lo que incrementa el desarrollo de nuevas técnicas - de producción y conservación de los productos.

PRODUCTOS FERMENTADOS

PRODUCTOS VEGETALES FERMENTADOS					
PRODUCTOS FABRICADOS	MATERIA PRIMA	MATERIA SECUNDARIA	COMPUESTOS METABOLIZADOS	COMPUESTOS FORMADOS	MICROORGANISMO QUE ACTUAN
a.- Col Acida.	Col Repollo	Sal Glucosa Eneldo Alcaparras	Azúcares	Acidos - Láctico,- Acético,- Manitol,- Etanol, - CO ₂ , --- Esteres.	Leuconostoc mesenteroides Lactobacillus cucumerus, L. plantarum, L. pentoaceticus L. brevis, L. brassicae, -- Streptococcus lactis.
b.- Aceitunas.	Aceitunas. -- (verdes)	Sal Glucosa	Azúcares	Acidos - Láctico,- Acético,- etc.	Lactobacillus pentosus, L.- pentoaceticus L. brevis.
c.- Encurtidos	Pepinos	Sal	Azúcares	Acidos -	Cocos gran -

coliflor	Pimienta		Láctico,-	positivos, -
Cebolla	Cilantro		Acético,-	Lactobacillus
Zanahorias, etc.,	Eneldo,- Hojas de Lauroel,- glucosa.		Manito,-	Cortos y largos.
			Etanol,-	
			CO ₂ , -	
			Esteres.	

PRODUCTOS LACTEOS FERMENTADOS

1.- Yogurth	Leche	-----	Lactosa	Acidos ,- Láctico,- Acético,- etc.,	L. bulgaricus y otros lactobacilos, - Streptococcus.
2.- Kefir	Leche	-----	Lactosa	Acidos ,- Láctico,- Acético,- etc.,	L. Casei - Saccharomyces Kefir.
3.- Kumis	Leche	-----	Lactosa	Acidos ,- Láctico,- Acético,- etc.,	L. Casei, S.- lactis, levaduras.
4.- Queso	Leche	-----	Lactosa	Cetonas Acidos- Grasos.	Penicillum Roqueforti

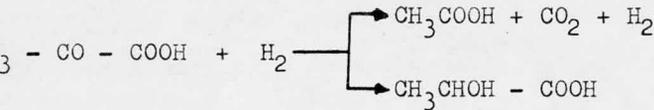
Algunas características principales desarrolladas en los diferentes productos fermentados son:

- La producción de sabores y caracteres físicos nuevos deseables, es decir un alimento diferente.

- Ayudar a la conservación del alimento.

Para realizar la conservación de este tipo de alimentos es esencial la producción de ácido láctico principalmente, dado que éste tiene una función muy importante en la obtención de los diferentes productos fermentados, como: Col Ácida, Aceituna, Encurtidos, Leches Fermentadas, Quesos, etc.,.

Acido Acético



Acido Pirúvico

Acido Láctico.

OBTENCION DE PRODUCTOS VEGETALES FERMENTADOS.

Los vegetales más usados en la industria de vegetales fermentados son:

Pepinillos, Col Ácida, Aceitunas, Alcachofas, Nabos, Cebolli-
s, etc., Cuyo proceso de elaboración varía solo en lagunos deta-
es.

ELABORACION DE COL ACIDA.

La col ácida se conoce comercialmente con los nombres de:
UCRUTA O SAUERKRAUT.

Las características que debe tener la col ácida son:

Debe ser un producto obtenido por fermentación láctica de las
jas de la col. De acuerdo con la definición establecida por la -
deral Food and Act de los Estados Unidos, se define como "col á-
da al producto, sano y limpio de sabor característico, obtenido
r fermentación total, primordialmente láctica; La col especial--
nte preparada y picada, en presencia de no menos de 2 %, ni más-
l 3 % de sal. Contiene, después de la fermentación, no menos de-
5 % de ácido expresado en ácido láctico. La col ácida envasada,-
la que se ha agregado salmuera nueva, no deberá contener menos -
l 1 % de ácido, expresado como ácido láctico".

OBJETIVO:

Adquirir los conocimientos necesarios para poder elaborar un-
producto vegetal fermentado, así como las condiciones que para ---
lo se requiera.

MATERIAL:

- Fermentador:

- Un frasco de 3000 ml de boca ancha.
- Una tapa de madera o plástico.
- Una manguera de plástico de 5 mm de ϕ .
- Un embudo de separación.

- Unas pinzas de more.
- Tela de muselin.
- Pesar.
- Cuatro matraces Erlen-Meyer de 250 ml
- Dos pipetas volumétricas de 5 ml
- Una pipeta volumétrica de 10 ml
- Una bureta de 50 ml
- Un embudo de cola larga.
- Un soporte universal.
- Una pinza de tres dedos.
- Un mechero con manguera.
- Una tela de asbesto.
- Un termómetro de -10° a 260°C
- Un matraz aforado de 100 ml
- Papel filtro.
- Papel pH.
- Cuerpos de ebullición.
- Un salometro o baling.

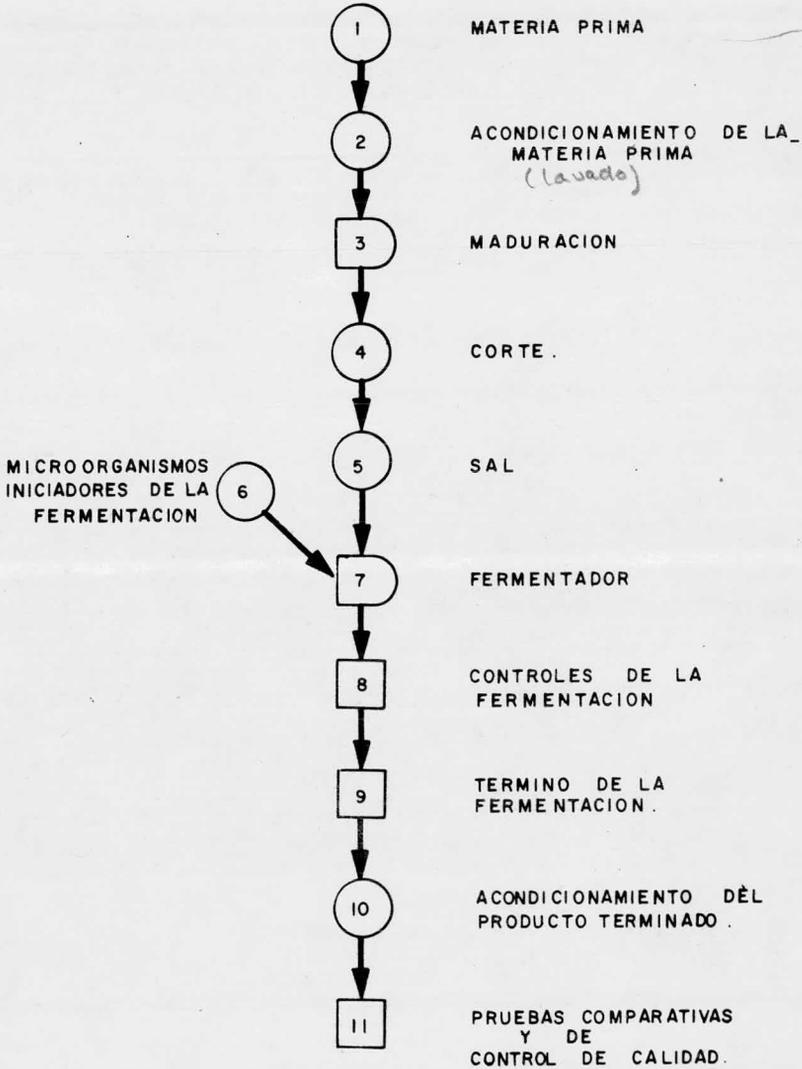
VEGETALES:

- Col.
- Pepinillos.
- Cebollas.
- Aceitunas,
- Repollo.
- etc..

ACTIVOS:

- Solución de Fehling "A".
- Solución de Fehling "B".
- Solución de NaOH concentrada.
- Solución de NaOH 0.1 N.
- Solución de HCl concentrada.
- Solución de HCl 0.1 N.
- Solución de fenoftaleína.
- Solución de azul de metileno.
- Solución de AgNO_3 0.1 N.
- **Cloruro** de sodio granulado.
- Solución de cromato de potasio.
- Metabisulfito de potasio.

DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO PARA LA OBTENSIÓN DE
" VEGETALES FERMENTADOS "



DESCRIPCION DE LAS OPERACIONES.MATERIA PRIMA:

La col ácida puede producirse a partir de distintas variedades de coles; pero son preferibles las variedades que forman cogollos-pretados.

COMPOSICION DE LAS COLES.

PARTES	MADURAS	FRESCAS
Agua	86 - 94.3 %	91 - 93 %
Azúcares	2.9 - 6.4 %	2 - 4.2 %
Proteínas	0.2 - 2.4 %	0.1 - 1.5 %
Grasa	0.1 - 0.7 %	0.1 - 0.3 %
Fibra	0.5 - 1.6 %	0.5 - 1.0 %
Cenizas	0.4 - 2.4 %	0.4 - 2.0 %

ACONDICIONAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA:

Selección.- Se usan coles maduras, de lo contrario puede dar productos defectuosos en color y textura.

Lavado.- Las coles se lavan en fuerte chorro de agua fría ó -- mejor aún, caliente teniendo por objeto eliminar la tierra y los -- microorganismos indeseables que pudiera tener a la hora de la re-- olección de las coles, en la superfisie de las hojas.

MADURACION:

Antes de proceder al picado se dejan las coles sanas en un lugar bien ventilado por lo menos durante 24 horas para que se mar-- niten y conseguir con ello una maduración uniforme.

CORTE:

Una vez separadas las hojas exteriores y partes malas se pro-- vede a sacar el corazón de la col y posteriormente se lava en fuer-- e chorro de agua. La col es cortada primeramente a la mitad o en-- cuartos y postiormente se corta en tirillas de unos 8 mm la col de-- e cortarse sin deshacer los pedasos, por que esto podría se cau-- a de que se estropease el producto.

Una vez cortada y pesada la col se coloca en el fermentador.

- SAL:

La sal ejerce varias funciones durante el transcurso de la fermentación. Actúa como deshidratante, provocando la salida del agua celular; favorece la fermentación láctica, que evita la putrefacción; contribuye al sabor y determina en parte la consistencia del producto final. La sal seca y fina se agrega en proporción de 2.25 a 2.5 % en relación al peso de la col, ya que si la cantidad de sal es menor del 2%, la col toma una textura viscosa y si por el contrario, es mayor del 3 %, adquiere un color rosa, el gusto es demasiado salada y la acidez es baja, inhibe en parte el desarrollo de las bacterias fermentativas.

Por eso es necesario la elección de una concentración adecuada, por lo tanto se adopta el valor de 2.25 a 2.5 %.

Se acostumbra agregar, algunos condimentos tales como: pimienta, comino, clavo, oregano etc..

- MICROORGANISMOS INICIADORES DE LA FERMENTACION:

Las bacterias lácticas de la fermentación de la col se dividen, en tres grupos:

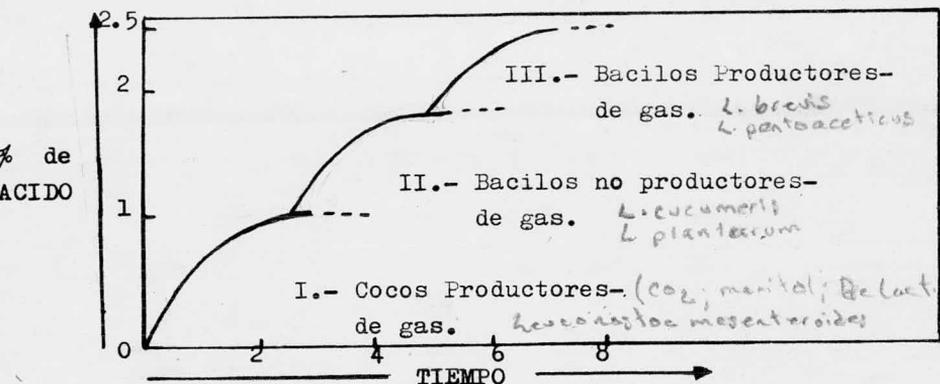
1.- Cocos productores de gas: Durante la primera parte de la fermentación predomina el *Leuconostoc mesenteroides*, siendo favorable a su desarrollo la concentración del 2.25 a 2.5 % de sal a la temperatura de 20° C éste corno ataca los azúcares incompletamente, produciendo ácido láctico, acético, etanol, manitol, CO₂, transformando ligeramente las proteínas y la estructura celular durante su desarrollo se producen ésteres por reacción de ácidos y alcoholes que dan aroma a la col ácida. Estas bacterias se destruyen cuando se alcanza la acidez de 0.7 a 1 %.

2.- Bacilos no productores de gas: Dentro de éste grupo de bacilos se encuentran *Lactobacillus cucumeris*, *L. plantarum*, que actúan sobre el azúcar sin transformar y el manitol para dar ácido láctico en grandes cantidades. A su vez estos bacilos son destruidos lentamente por su poca resistencia al ácido producido.

3.- Bacilos productores de gas: La fermentación se completa por éste grupo, al cual pertenecen *L. pentoaceticus*, *L. brevis*, que producen ácido láctico, etanol, manitol y CO₂ a partir de los azúcares remanentes. Este grupo es bastante resistente a los

idos, sopotando una acidez de 2.4 %

PRODUCTOS DE ACIDO EN LA FERMENTACION DE COL ACIDA.



- FERMENTADOR:

La Col se va agregando en el fermentador y se va adicionando la sal, distribuyendo de una manera uniforme, y se comprime fuertemente. El fermentador se llena por lo general hasta el borde, Encima todo se coloca una tela de muselin, con el objeto de mantener siempre la superficie húmeda, ayudando a que no se contamine el producto, encima se coloca una tapa (madera o plástico), sobre la tapa se coloca un peso tal que provoque la salida del jugo celular. La col, es recomendable colocar una tela de muselina en la boca del fermentador, para evitar la entrada de insectos, que pudieran afectar el producto.

El jugo extraído de la col por acción de la sal y de la compresión sube pronto y a las ocho horas ya existe suficiente cantidad para cubrir la col (fig. 5.1)

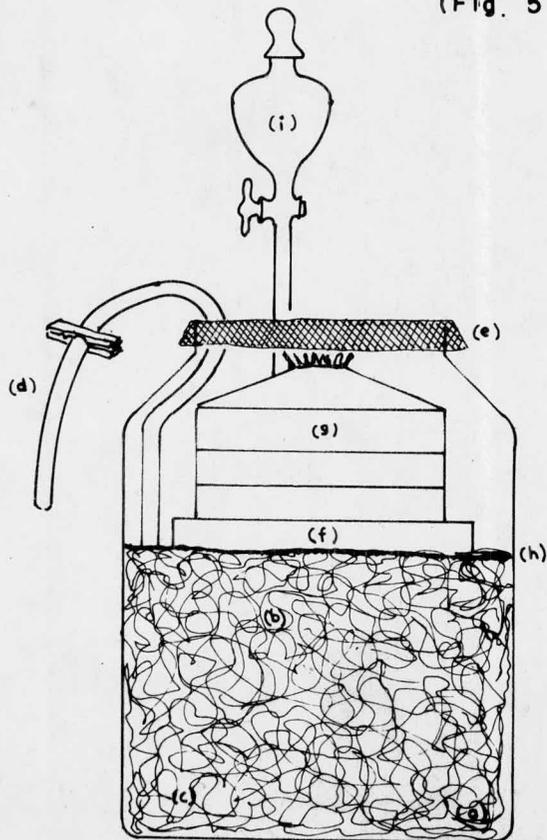
El sistema de control del pH, concentración de sal es de gran importancia para la obtención de un buen producto.

La toma de muestra es de gran ayuda para determinar cuando detenerse la fermentación, además disminuye la posibilidad de una contaminación a la hora de tomar una muestra.

- CONTROLES DE LA FERMENTACION:

Estos controles son físicos y químicos, dentro de los primeros se encuentran: Temperatura 20°C, Presión adecuada para obtener una mayor -

7 FERMENTADOR
(Fig. 5.1)



PARTES DEL FERMENTADOR

- a. - Frasco de 3000 ml.
- b. - Col cortada y acondicionada.
- c. - Sal
- d. - Toma de muestra
- e. - Tela de muselina
- f. - Tapa de : madera o plastico
- g. - Contra peso.
- h. - Tela de muselina.
- i. - Sistem de control de
PH, Sal

racción del jugo celular de la col.

Controles Químicos: pH 3.4 - 3.6, Reductores Totales, Acidez - a, Volátil, Total, Concentración de la Salmuera.

Estos controles se deben hacer cada tercer día, durante el --- curso de la fermentación, que es de 3 a 4 semanas.

TERMINO DE LA FERMENTACION:

El final de la fermentación será determinada cuando se alcance valor de 1.7 a 2.4 % de ácido láctico.

- ACONDICIONAMIENTO DEL PRODUCTO TERMINADO:

El producto fermentado se lava, con una salmuera cuya concentración es de 2.25 a 2.5 %; en la actualidad se procede a envasar producto, asegurando así la conservación del producto, que por rápida descomposición solo sería posible consumir en los meses os del año. Se desarrollan nuevas técnicas para conservar más -- mpo el producto. Se procede de la siguiente manera:

- En frío : Se saca la col ácida del fermentador, ya lavada, -- llenan los envases, se esteriliza calentando hasta 65°C por 40- -- utos pues la penetración del calor es muy lenta.

- En caliente : Se saca la col ácida del fermentador, ya lava -- y se calienta hasta que alcance 45° C se llenan los envases y -- agrega salmuera 2.25 a 2.5 % caliente a 75°C cerrando los enva -- sin preesterilizar.

- Esterilización : Se saca la col ácida del fermentador, ya -- ada, se llenan los envases, se cierran y se calienta a 100°C -- ante 35 minutos, inmediatamente se enfrían para preservar el co -- , evitando el ablandamiento del producto y la formación de incha -- .

Los productos vegetales fermentados requieren poca esteriliza -- n, porque su contenido de ácido fácilita la conservación.

Alteraciones : Las alteraciones en la col ácida son debidas -- eralmente a las siguientes causas:

- Cantidad insuficiente de sal.
- Eliminación de parte del jugo.
- Producto mal elaborado.

Deterioros de la col ácida :

- a).- Col ácida rosada : causada por algunas levaduras que se desarrollan en la superficie del producto cuando el nivel del jugo no cubre la col, cuando se ha agregado mucha sal o ésta está mal distribuida.
- b).- Espuma blanca : producida por un desarrollo superficial de levaduras. Se evitan cuidando que el producto no esté expuesto al aire.
- c).- Col Acida blanca : Debida a la concentración baja sal, altas temperaturas, exposición al aire y falta de higiene en la elaboración.
- d).- Col Acida viscosa : Debida al desarrollo excesivo de ciertos tipos de bacterias, como consecuencia de temperaturas altas y poca cantidad de sal.
- e).- Col Acida podrida : Se encuentra solamente en la superficie, cuando ha habido demasiada exposición al aire.
- f).- Color oscuro : es un defecto común causado por varios factores, como son : falta de higiene, baja contenido de sal, altas temperaturas de fermentación, mucho contacto con el aire.
- g).- Col Acida con sabor diferente debidos a la difusión de productos desarrollados durante las alteraciones.

11.- PRUEBAS COMPARATIVAS Y DE CONTROL DE CALIDAD:

Se compara el producto obtenido, con uno comercial, de acuerdo a los siguientes análisis.

a.- Análisis Físicos.

- aspecto
- color
- olor
- sabor
- acidez
- textura

b.- Análisis Químico

- reductores directos
- acidez volátil
- acidez fija
- acidez total

- concentración de la salmuera
- pH

ESTIONARIO :

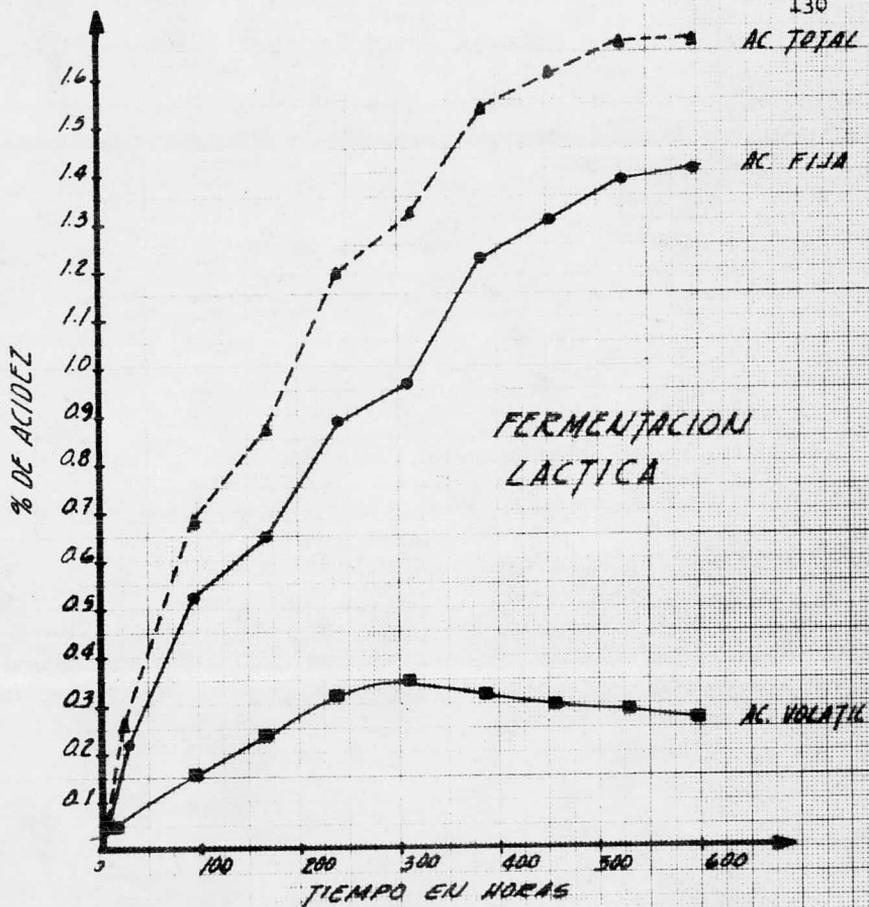
- 1.- Definición de encurtido.
- 2.- ¿ Qué es un grado salino ?
- 3.- ¿ Qué es un salómetro ?
- 4.- ¿ Qué microorganismos actúan durante la fermentación ?
- 5.- Principales alteraciones en vegetales fermentados y - formas de evitar.
- 6.- ¿ Qué sucede si la concentración de sal es del 3 % ?
- 7.- Es recomendable el uso de iniciadores en productos - vegetales fermentados.

A :

++ Se debe reportar en cuadros los resultados tanto físicos - químicos, anexando observaciones, aclaraciones y comentarios.

BIBLIOGRAFIA :

1, 12, 15, 22, 25, 27, 29, 30, 34, 35, 39, 44, 45, 46, 49, 55, 56, 63, 68.



TIEMPO (HRS)	ACIDEZ			AZUCARES (%)
	TOTAL (%)	FIJA (%)	VOLATIL (%)	
24	0.264	0.213	0.051	0.413
36	0.696	0.533	0.163	TRAZAS
168	0.889	0.654	0.235	—
240	1.208	0.871	0.317	—
312	1.320	0.972	0.348	—
384	1.546	1.225	0.321	—
456	1.617	1.314	0.305	—
528	1.680	1.391	0.289	—
600	1.683	1.413	0.268	—

OBTENCION DE PRODUCTOS LACTEOS FERMENTADOS

Entre las leches fermentadas se encuentran:

La leche agria cultivada, leche búlgara, yogurt, leche acidófila, Kefir, Kumis, skyr, taette, y algunos otros muy similares.

Las leches fermentadas son productos lácteos que se conservan en parte, por el ácido originado por las bacterias, además dan ciertas características organolépticas al producto.

En las leches fermentadas las bacterias lácticas realizan la fermentación principal, cuyo producto más importantes es el ácido láctico.

Esta propiedad de acidificación de la leche, ha hecho posible que a través de la historia del hombre, se hayan desarrollado leches fermentadas en varias formas.

ELABORACION DE YOGURT.

Una de las presentaciones más antiguas y comunes de leches fermentadas es el yogurt en donde se favorece el crecimiento de los microorganismos; *Streptococcus termophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*; dando como resultado un producto de alta acidez.

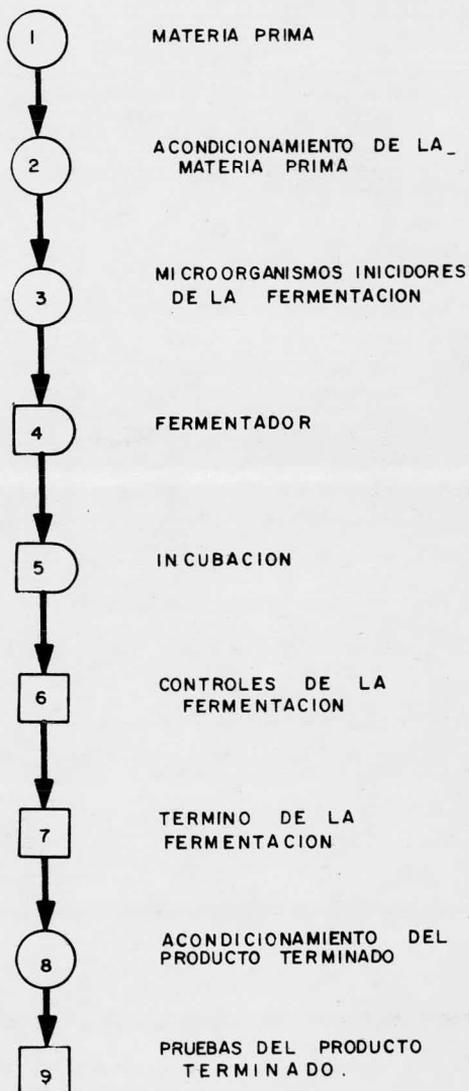
OBJETIVO:

Adquirir las bases y conocimientos necesarios para poder elaborar un producto lácteo fermentado, así como los controles que se requieren durante el proceso.

MATERIAL:

- Fermentador :
 - Un frasco de 3000 ml
 - Un termómetro de - 10° a 260° C
 - Tela de muselin.
- Cuatro matraces Erlen- Meyer de 250 ml
- Un matraz aforado de 100 ml
- Un embudo de cola larga.
- Una bureta de 50 ml
- Dos pipetas volumétricas de 5 ml
- Dos pipetas volumétricas de 10 ml

DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO PARA LA OBTENCION DE
" PRODUCTOS LACTEOS FERMENTADOS "



- Un soporte universal.
- Una pinza de tres dedos.
- Baño maria.
- Una tela de asbesto.
- Un termómetro de $- 10^{\circ}$ a 260°C .
- Papel filtro.
- Papel pH.
- Cuerpos de ebullición.

EPO :

Estufa con control de temperatura.
Batidora eléctrica.

MATERIA PRIMA :

Dos litros de leche.
Microorganismos: *Lactobacillus bulgaricus*,
Streptococcus termophilus.

REACTIVOS :

- Solución de Fehling "A".
- Solución de Fehling "B".
- Solución de NaOH concentrada.
- Solución de NaOH 0.1 N.
- Solución de HCl concentrada.
- Solución de HCl 0.1 N.
- Solución de fenoftaleína.
- Solución de azul de metileno al 0.2 %
- Metabisulfito de potasio.
- Oxalato de potasio.
- Subacetato de plomo.

DESCRIPCION DE CADA OPERACIONMATERIA PRIMA:

El yogurt puede elaborarse a partir de las diferentes variedades de leche que existen en el mercado, leche de vaca (principalmente), de burra, de cabra, etc..

Se puede usar la leche de vaca en sus diferentes presentaciones: ejemplo ; leche bronca, leche descremada, leche en polvo, etc.

COMPOSICION DE LA LECHE DE VACA Y DEL
YOGURT (g/ 100 g producto)

DETERMINACION	LECHE DE VACA		YOGURT
	BRONCA	HERVIDA	
Humedad	87.75	86.55	86.45
Grasa	3.3	3.4	3.41
Proteína	3.01	3.04	3.04
Cenizas	0.79	0.81	0.83
Sólidos Totales	12.25	13.45	13.55
Sólidos no Grasos	8.95	10.05	10.14
Lactosa	5.01	4.97	4.08
pH	6.7	6.65	4.2
Acidez (% de Acido - Láctico)	0.15	0.16	0.91

Como era de esperarse la composición del yogurt es semejante a la de la leche, observándose la principal diferencia en su contenido de lactosa, debido a la fermentación.

2.- ACONDICIONAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA:

Selección.- Debe usarse leche de vaca que no contenga antibióticos, ya que si los contiene inhibe el crecimiento de los microorganismos y la fermentación láctica no se efectúa.

Acondicionamiento.- La leche se calienta a 120°C durante 15 minutos o bien a temperaturas más bajas durante un tiempo mayor. En seguida se enfría (pasteurizada) a 36° C y se vacía en el fermentador.

Debe tenerse cuidado de no alterar el sabor, y la composición de la leche con un exceso de calor.

El proceso termico presenta algunas ventajas, como son :
a).- Destrucción de microorganismos indeseables, evitando así la competencia de estos con la cepa seleccionada, obtenien

ose un producto más uniforme en cuanto a su calidad.

b).- Se destruyen también inhibidores naturales de la leche bronca que afectan el crecimiento de la cepa seleccionada.

.- MICROORGANISMOS INICIADORES DE LA FERMENTACION:

La cepa usada para la elaboración de yogurt consta de dos microorganismos lácticos principalmente que son: *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus termophilus* en relación de 1:1.

El *Streptococcus termophilus* se desarrolla mejor entre los 7° a 40° C, es menos acidificante y más productor de aroma y consistencia.

El *Lactobacillus bulgaricus* es un bacilo láctico homofermentativo que se desarrolla bien entre los 45° a 50° C, acidifica fuertemente el medio.

La cepa se resiembré en leche estéril y libre de antibióticos, con el fin de mantenerla en óptimas condiciones de actividad.

.- FERMENTADOR: (Fig 5.2)

La leche acondicionada se vacía en el fermentador, y se adiciona 2% del inóculo, se agita el fermentador para que se distribuya homogéneamente el inóculo.

El fermentador se introduce en un baño maria que debe mantenerse a la temperatura de 42° C durante el tiempo que dura la fermentación.

Si se cuenta con una estufa que tenga control de temperatura se puede usar en vez del baño maria, fijando la temperatura a 42° C.

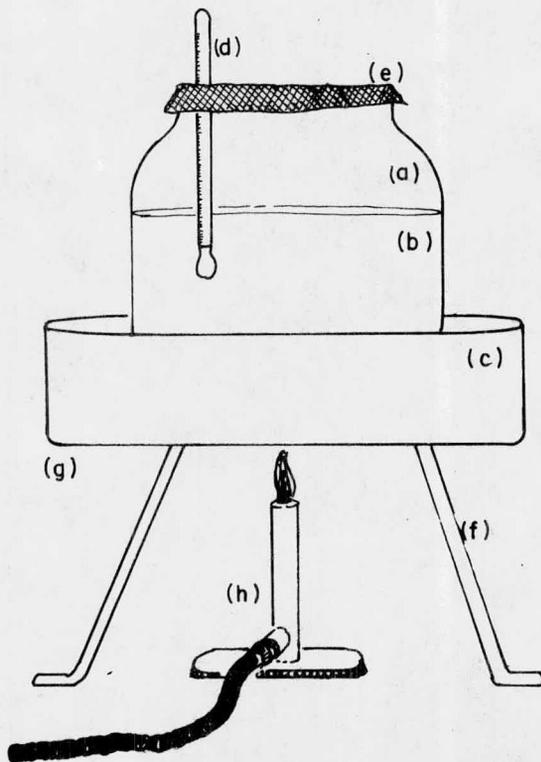
Al momento de tomar la muestra se debe tener cuidado de no mover mucho el fermentador, ya que puede romper la cuajada del yogurt, dando un producto final con muchos sueros y de una consistencia poco rígida.

Es recomendable colocar una tela de muselin en la boca del fermentador, para evitar la entrada de insectos, que pudieran contaminar el producto.

.- INCUBACION:

La incubación puede realizarse por medio de un baño maria-

4. - FERMENTADOR
(Fig 5.2)



NOMBRES

- a .- Fermentador
(frasco de 3000 ml.)
- b .- Leche acondicionada con
2% de inculo.
- c .- Baño María
- d .- Termometro
- e .- Tela de muselina
- f .- Tripie metalico
- g .- Tela do asbesto
- h .- Mechero co nanguera.

o en una estufa con control de temperatura, es muy importante el control de la temperatura en la fermentación láctica, ya que si la temperatura es muy alta se desarrolla mayor acidez en el producto o en el caso contrario se obtiene un producto muy incipido. Por lo que se tiene que seleccionar una temperatura adecuada para la obtención de un producto de acidez y consistencia, característica de los productos lácteos fermentados.

6.- CONTROLES DE LA FERMENTACION:

Estos controles son físicos y químicos.

El control físico que se realiza es por medio de la temperatura que debe ser incrementada según aumenta el tiempo de la fermentación y va de 37° a 47°C , esto se hace para obtener un buen desarrollo de los microorganismos responsables de la fermentación láctica.

Los controles químicos que se determina son:

pH 4.2, Reductores Directos, Reductores Totales, Acidez (determinada en ácido láctico).

Estos controles se deben de hacer cada hora durante el transcurso de la fermentación, que es de 6 a 8 Hrs.

7.- TERMINO DE LA FERMENTACION:

El final de la fermentación será determinado cuando el valor de la acidez (dado en ácido láctico) este entre 0.91 a 1.2 %.

La concentración de láctosa es otro factor que nos determina cuando termina la fermentación, ya que la concentración de azúcares es muy poca, al final de la fermentación.

8.- ACONDICIONAMIENTO DEL PRODUCTO TERMINADO:

El producto fermentado se enfría a 10°C para detener la fermentación, luego se bate para obtener un producto homogéneo.

Este producto puede mezclarse con frutas naturales o mermelada, o también puede consumirse natural.

Algunas de las ventajas que presentan los productos lácteos fermentados son:

- a).- Presenta mayor digestibilidad que la leche fresca.
- b).- Ayuda a restablecer la flora intestinal.

c).- Proporciona un medio desfavorable para posteriores contaminaciones, en virtud de lo cual es posible elaborar alimentos a base de leche fermentada, con una mayor vida - de anaquel que aquéllos productos a base de leche fresca.

9.- PRUEBAS DEL PRODUCTO TERMINADO:

Se compara el producto obtenido con uno comercial de acuerdo a los siguientes análisis.

a).- Análisis Físicos

- Aspecto.
- Color.
- Sabor.
- Acidez.
- Textura.

b).- Análisis Químicos

- Reductores Directos.
- Reductores Totales.
- Acidez (determinada en ácido láctico).
- pH.

CUESTIONARIO:

- 1.- Principales microorganismos que intervienen en la elaboración de yogurt.
- 2.- Mencione 5 productos lácteos fermentados y sus características.
- 3.- A que temperatura se desarrollan el *Lactobacillus bulgaricus*, y el *Streptococcus termophilus*.
- 4.- ¿ Qué características desarrollan en el yogurt el *L. bulgaricus* y el *S. termophilus*.?
- 5.- ¿ Qué sucede si la temperatura de incubación es de 60° C ?.
- 6.- Principales alteraciones que presenta el yogurt y forma de evitar.
- 7.- Mencione algunas ventajas de los productos lácteos fermentados.

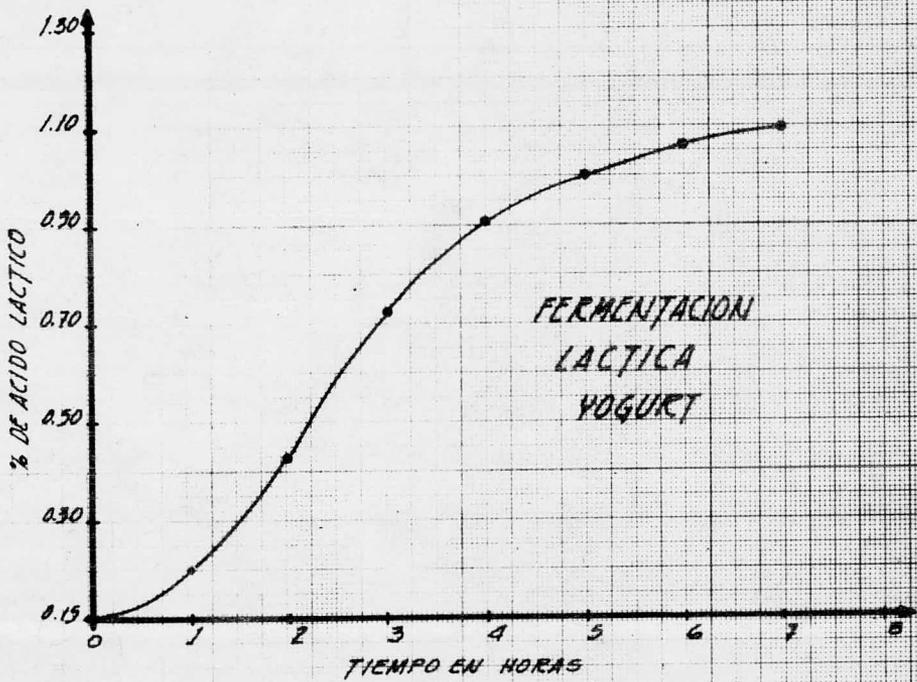
- 8.- Explique el mecanismo de la fermentación.
- 9.- Gráfica y tabla de Acidez vs. Tiempo.
- 10.- Gráfica y tabla de Reductores Totales vs. Tiempo.
Reductores Directos vs. Tiempo.

NOTA:

⁺⁺Se debe de reportar en cuadros los resultados tanto físicos como químicos anexando, observaciones, aclaraciones, y comentarios.

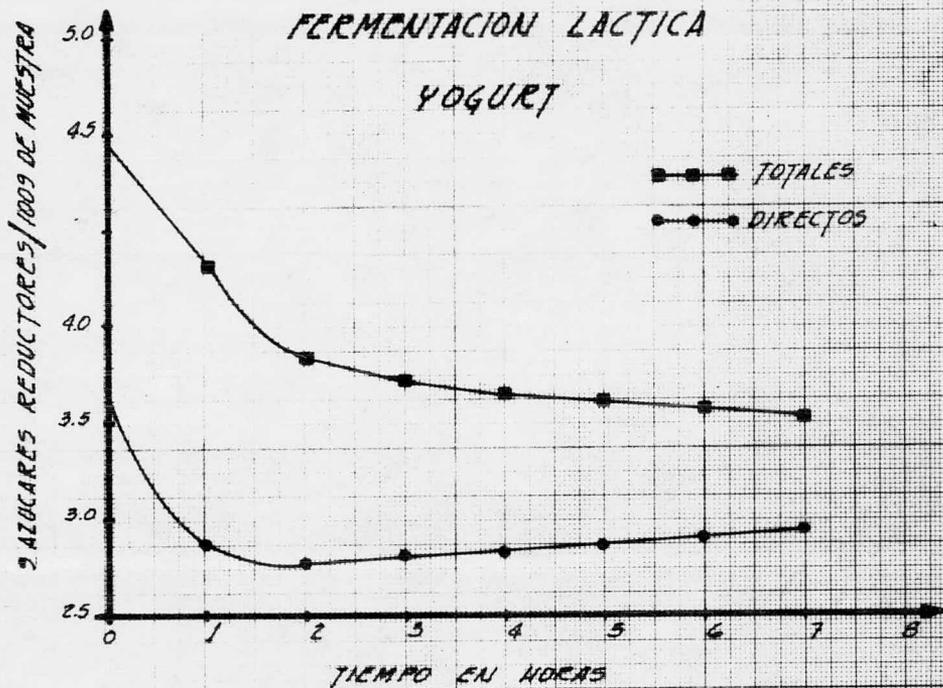
BIBLIOGRAFIA:

1, 11, 12, 15, 16, 17, 25, 29, 30, 33, 34, 39, 44, 45, 46, 49, 51, 56, 62, 68.



TIEMPO (HRS)	% DE ACIDO LACTICO
1	0.193
2	0.425
3	0.728
4	0.905
5	1.002
6	1.067
7	1.101

FERMENTACION LACTICA YOGURT



TIEMPO (HRS)	AZUCARES REDUCTORES	
	DIRECTOS	TOTALES
1	2.278	4.255
2	2.272	3.758
3	2.274	3.714
4	2.276	3.617
5	2.279	3.609
6	2.281	3.582
7	2.292	3.521

PRACTICA No. 7
FERMENTACION LACTICA I.
ELABORACION DE COL AGRIA.

I.- OBJETIVO: Adquirir los conocimientos necesarios para poder elaborar un producto vegetal fermentado, así como los controles - que se requieren durante el proceso.

I.- MATERIAL:

- Fermentador:

- Un frasco de 3000 ml de boca ancha.
- Una tapa de madera o plástico.
- Una manguera de plástico de 5 mm \varnothing
- Un embudo de separación.
- Unas pinzas de more.
- Tela de muselina (1 m)
- Pesas.

- Un matraz aforado de 100 ml.
- Cuatro matraces Erlenmeyer de 250 ml.
- Dos pipetas volumétricas de 5 ml.
- Una pipeta volumétrica de 10 ml.
- Una bureta de 50 ml.
- Un embudo de cola larga.
- Un soporte universal.
- Unas pinzas de tres dedos.
- Un mechero con manguera.
- Una tela de asbesto.
- Un termómetro de - 10 a 260°C.
- Papel filtro.
- * Papel pH.
- Cuerpos de ebullición.
- Un salometro.

VEGETAL.

- Col (1 kg).

I.- REACTIVOS

- Solución de Fehling "A"
- Solución de Fehling "B"
- Solución de NaOH concentrada
- Solución de NaOH 0.1 N
- Solución de HCl concentrada
- Solución de HCl 0.1 N
- Solución de AgNO₃ 0.1 N
- Solución de fenoftaleína
- Solución de azul de metileno
- Solución de cromato de potasio
- Metabisulfito de potasio
- Oxalato de potasio
- Subacetato de plomo

EXPERIMENTO:Elaboración de Col ácida.

Se fabrica el Fermentador (*) se lava la col (con el objeto de eliminar la tierra y microorganismos que pudiera haber en las hojas). Se deja madurar, en un lugar bien ventilado por un lapso de 24 hrs. Se eliminan las hojas exteriores y partes malas, se saca el corazón y se lava con agua. La col se corta primero a la mitad o en cuartos y luego en tirillas de unos 8 mm. Se debe cortar sin deshacer los pedasos, porque se podría estropear el producto.

Una vez cortada y pesada la col se coloca en el fermentador, -- junto con 2.25 a 2.5 % de sal en relación al peso de la col. -- Se puede agregar algún condimento como: pimienta, comino, clavo etc. La distribución de la col en el fermentador es, primero -- una capa de col y adición de sal, otra capa de col y adición de sal y así sucesivamente, esto es para que existan una distribución homogénea de la sal. Luego se coloca un pedazo de tela de muselina (con el objeto de mantener la superficie húmeda y así se ayude a que no se contamine el producto), encima se coloca -- una tapa (de madera ó plástico), sobre la que se colocan pesas -- (con el fin de facilitar a la extracción del jugo celular de la col), el jugo debe llegar hasta el borde superior.

Es recomendable tapar la boca del fermentador con una tela de misé lina para evitar la entrada de insectos, que pudiera infectar el producto.

Controles Durante la Fermentación.

Físicos: Temperatura (20°C) y Presión adecuada para obtener una mayor extracción de jugo celular de la col.

Químicos: pH (3.4 a 3.6), Reductores Totales, Acidez Fija, Volátil Total, Concentración de Salmuera.

Estos controles se hacen cada tercer día, durante el transcurso de la fermentación que es de 3 a 4 semanas.

El final de la fermentación es determinado cuando se alcanza el va lor de 1.7 a 2.4 % de ácido láctico. El producto fermentado se lava con una salmuera de concentración de 2.25 a 2.5 %.

CUESTIONARIO

- 1.- Definición de encurtido
- 2.- ¿Qué es un grado salino?
- 3.- ¿Qué es un salómetro?
- 4.- ¿Qué microorganismos actúan en la fermentación?
- 5.- Principales alteraciones en la col ácida y formas de evitar
- 6.- ¿Qué sucede si la concentración de sal es menor del 2 % ó superior al 3 %?
- 7.- ¿Es recomendable el uso de iniciadores en productos vegetales-fermentados?
- 8.- Explique el mecanismo bioquímico de la fermentación
- 9.- Gráfica de acidez total Vs. tiempo.
 ácidez fija Vs. tiempo.
 ácidez volátil Vs. tiempo.
- 10.- Tabla comparativa del producto obtenido con uno comercial, de acuerdo a los análisis físicos y químicos.

VI.- METODOS DE EVALUACION:

El alumno será evaluado en función de los siguientes parámetros:

- Características del producto (ácidez 1.7 a 2.4 % de ácido--láctico)
- Todos los datos obtenidos en los controles de la fermentación, reportados en gráficas y tablas
- Resultados de los análisis físicos y químicos del producto--elaborado y el comercial
- Observaciones, aclaraciones y comentarios

(*) **NOTA:** La fabricación del fermentador es dada por el maestro - en una clase previa a la sección del laboratorio.

BIBLIOGRAFIA:

1, 12, 15, 22, 25, 27, 29, 30, 34, 35, 39, 44, 45, 46, 49, 51, 55, 56, 63, 68.

PRACTICA No. 8
FERMENTACION LACTICA II.
ELABORACION DE YOGUR.

I.- OBJETIVO: Adquirir las bases y conocimientos necesarios para poder elaborar un producto lácteo fermentado.

I.- MATERIAL:

- Fermentador:
 - Un frasco de 3000 ml.
 - Un termómetro de - 10 a 260°C.
 - Tela de muselina (1 m).
- Cuatro matraces Erlenmeyer de 250 ml.
- Un matraz aforado de 100 ml.
- Un embudo de cola larga.
- Una bureta de 50 ml.
- Dos pipetas volúmetricas de 5 ml.
- Dos pipetas volumétricas de 10 ml.
- Un soporte universal.
- Una pinza de tres dedos.
- Dos mecheros con manguera.
- Dos telas de asbesto.
- Un termómetro de - 10 a 260°C.
- Papel filtro.
- Papel pH.
- Cuerpos de ebullición.
- Un recipiente para baño maría.

EQUIPO:

- Una estufa con control de temperatura (42°C)
- Una batidora eléctrica.

MATERIA PRIMA:

- Dos litros de leche.
- Cepa de microorganismos:
 - Lactobacillus bulgaricus.
 - Streptococcus termophilos.

III.- REACTIVOS:

- Solución de Fehling "A"
- Solución de Fehling "B"
- Solución de NaOH concentrada.
- Solución de NaOH 0.1 N.
- Solución de HCl concentrada.
- Solución de HCl 0.1 N.
- Solución de fenolftaleína.
- Solución de azul de metileno al 0.2 %.
- Solución acuosa saturada de acetato de plomo.
- Solución acuosa saturada de sulfato de sodio.
- Acido acético glacial Q.P.
- Metabisulfito de sodio.
- Oxalato de potasio.

IV.- EXPERIMENTO:

Elaboración de Yogurt.

Se fabrica el fermentador (*), la leche se calienta a 120°C, durante 15 minutos o a una temperatura menor durante más tiempo. En seguida se enfría a 36°C y se vacía en el fermentador. Se adiciona el inóculo en una proporción del 2 % con respecto al volumen total de leche. El inóculo es proporcionado por el maestro del laboratorio; se agita el fermentador para que se distribuya homogéneamente el inóculo.

El fermentador se introduce en un baño maría, que se mantiene a temperatura de 42°C, durante el tiempo en que se lleva a cabo la fermentación. Si se cuenta con una estufa se puede usar en vez del baño maría, a la misma temperatura.

Se debe tener cuidado de no mover el fermentador a la hora de tomar las muestras ya que se puede romper la cuajada del yogurt, dando un producto con mucho suero y de una consistencia poco rígida.

Controles de la Fermentación.- Estos son físicos y químicos, dentro de los primeros está la Temperatura la cual es importante por que si es alta se desarrolla mayor acidez en el producto o por el contrario si es baja se obtiene un yogurt

insípido. Se recomienda que se incremente la temperatura poco a poco, conforme transcurre la fermentación hasta llegar a 42°C. Los controles químicos que se determinan son: pH (4.2), Reductores Directos, Reductores Totales, Acidez Total (de 0.91 a 1.2 % expresada en ácido láctico).

Estos controles deben realizarse cada hora durante el transcurso de la fermentación, que es de 6 a 8 horas. El final de la fermentación será determinado cuando el valor de la acidez sea de 0.91 a 1.2 % de ácido láctico.

El producto resultante se enfría a 10°C para detener la degradación de carbohidratos, se le debe dar al producto presentación comercial por lo tanto se somete a un proceso de batido para homogenizar y mejorar la consistencia y si se quiere se le puede agregar color y sabor artificiales proporcionados por frutas frescas de la temporada, se presenta en un envase característico y con su etiqueta correspondiente.

- CUESTIONARIO:

- 1.- Principales microorganismos que intervienen en la producción del yogurt.
- 2.- Mencione 5 productos lácteos fermentados y sus características.
- 3.- ¿ A que temperatura se desarrollan el *Lactobacillus bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus*?
- 4.- ¿ Qué características desarrollan en el yogurt el *L. bulgaricus* y el *S. thermophilus*?
- 5.- ¿ Qué sucede si la temperatura de incubación es de 60°C?
- 6.- Principales alteraciones que presenta el yogurt y forma de evitarlos.
- 7.- Mencione algunas ventajas de los productos lácteos fermentados.
- 8.- Explique el mecanismo de la fermentación láctica.
- 9.- Gráfica y tabla de acidez Vs. tiempo.
- 10.- Gráfica y tabla de reductores totales Vs. tiempo.
- 11.- Gráfica y tabla de reductores directos Vs. tiempo.

METODOS DE EVALUACION:

El alumno sera evaluado en función de los siguientes parametros:

- Rendimiento de la fermentación (de 0.91 a 1.2 % de ácido --- láctico)
- Todos los datos obtenidos en los controles de la fermentación reportados en gráficas y tablas.
- Resultados de los análisis físicos y químicos del producto - elaborado y el comercial.
- Observaciones, aclaraciones y comentarios.

) **NOTA:** La fabricación del fermentador es dada por el maestro- en una clase previa a la sesión del laboratorio.

BIBLIOGRAFIA:

11, 12, 15, 16, 17, 25, 29, 30, 33, 34, 39, 44, 45, 46, 49, 51, 56, 62, 68.

CAPITULO VI.

FERMENTACION CITRICA.

- BIOQUIMICA DE LA FERMENTACION CITRICA.
- DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO.

PRACTICA No. 9

FERMENTACION CITRICA.

FERMENTACION CITRICA.INTRODUCCION:

En un principio el Acido Cítrico se extraía del zumo de los frutos cítricos, en forma de sólidos cristalizados.

Dentro de las principales fuentes de ácido cítrico natural se encuentran los limones, limas, piñas, etc..

El Acido Cítrico producido por la fermentación, es un producto del metabolismo intermedio de la desasimilación oxidativa, productora de energía, de los azúcares.

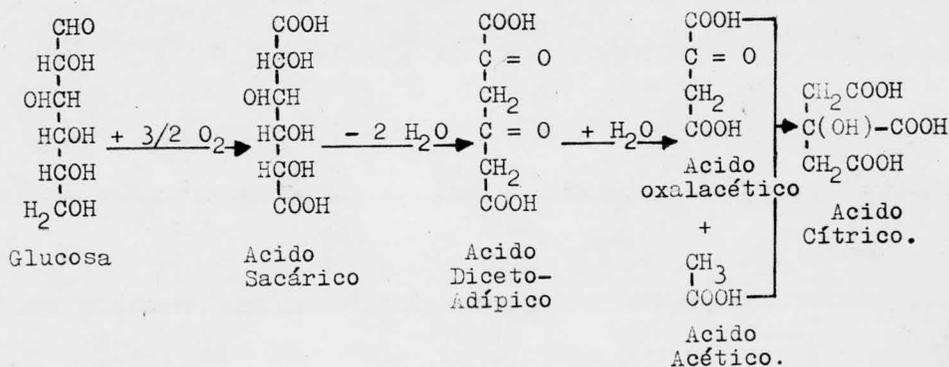
Los microorganismos productores de ácido cítrico, si cuentan con las condiciones adecuadas metabolizan fácilmente su producto.

Entre los microorganismos más usados se encuentran:

Citromyces glober, *C. citricus*, *Aspergillus niger*, *A. carbonarius*, *Penicillium arenarium*, *P. glaucum*, etc.. En la actualidad el microorganismo más empleado en la producción de ácido cítrico es el *Aspergillus niger*, éste Moho en condiciones adecuadas, convierte los sustratos fermentables (azúcares con 2 a 12 átomos de carbono) en buena proporción de ácido cítrico.

BIOQUIMICA DE LA FERMENTACION CITRICA.

La hexosa es oxidada y transformada en ácido gluconico y ácido sacárico; éste, por deshidratación es convertido en ácido α - γ -dicetoadípico, se hidroliza y se forma ácido acético y oxalacético conviniéndose estos dos para formar el ácido cítrico.



OBJETIVO:

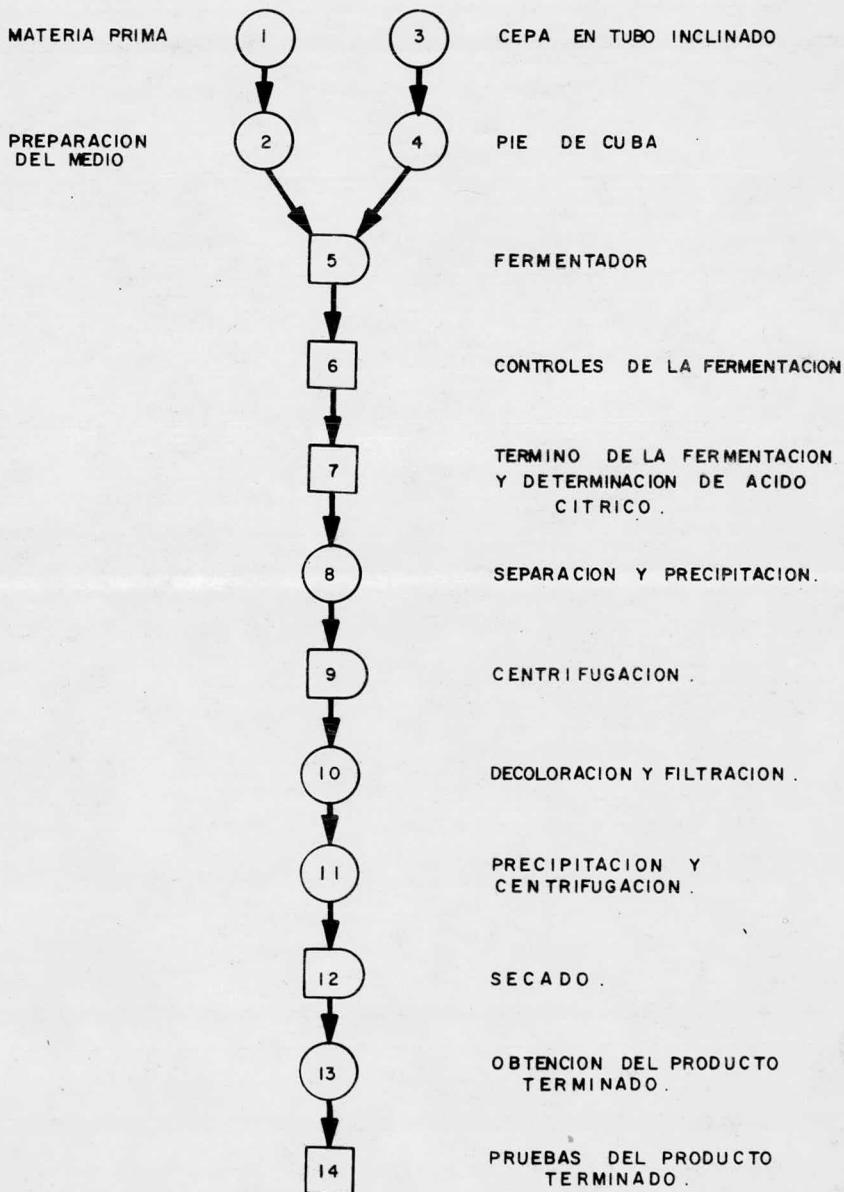
La obtención de ácido cítrico a nivel de laboratorio así como los controles que se requieren, durante el proceso.

MATERIAL:

- Fermentador:
 - Un frasco de 3000 ml
 - Un soporte para inclinar el frasco.
 - Un tapón de hule (del tamaño de la boca del frasco).
 - Tubo de vidrio de 5 mm ϕ .
 - Manguera de plástico de 5 mm ϕ .
 - Unas pinzas de More.
- Un matraz Erlen-Meyer de 3000 ml
- Cinco matraces Erlen-Meyer de 250 ml
- Un matraz aforado de 100 ml
- Un matraz kitasato de 500 ml
- Dos pipetas volumétricas de 5 ml
- Dos pipetas volumétricas de 10 ml
- Una pipeta graduada de 5 ml
- Una probeta de 1000 ml
- Una bureta de 50 ml
- Un embudo de cola larga.
- Un vaso de 600 ml
- Un buchner.
- Un desecador.
- Un soporte universal.
- Un mechero con manguera.
- Una tela de asbesto.
- Un triple.
- Unas pinzas de tres dedos.
- Papel pH.
- Papel filtro.
- Tela de muselin.
- Cuerpos de ebullición
- Un aerometro brix (0° - 25°)

DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO PARA LA OBTENCION DE
"ACIDO CITRICO"

153



EQUIPO:

Centrifuga.

Cuarto de Incubación

REACTIVOS:

- Solución de Fehling "A".
- Solución de Fehling "B".
- Solución de NaOH concentrada.
- Solución de NaOH 0.01 N.
- Solución de HCl concentrada.
- Solución de HCl diluido.
- Solución de CaCl_2 al 10%.
- Solución de fenoftaleína.
- Solución de NH_4OH concentrada.
- Solución de H_2SO_4 diluida.
- Solución de azul de metileno
- Solución CaCl_2
- Solución CaCO_3
- Acetato de sodio.
- Metabisulfito de potasio.
- Oxalato de potasio.
- Subacetato de plomo.
- Carbon animal.

DESCRIPCION DE LAS OPERACIONES1.- MATERIA PRIMA:

Muchas sustancias orgánicas, entre ellas los compuestos de 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 12 átomos de carbono (azúcares principalmente), pueden ser fermentados con producción de ácido cítrico: por lo general, los mayores rendimientos se han obtenido a partir de sacarosa y fructosa. En determinadas circunstancias la glucosa da elevados rendimientos, comparables a los de la sacarosa: en general, para producir grandes rendimientos de ácido cítrico se requiere una concentración elevada de azúcar, se pueden usar soluciones en concentraciones de 14 a 20 %.

Se ha encontrado que cuando se emplea más del 15% de azúcar -

ueda sin transformar en ácido cítrico una cantidad mayor de azúcar que la normal (menso del 3%). La hidrólisis parcial de la glucosa durante la esterilización da lugar también a rendimientos mejores.

.- PREPARACION DEL MEDIO:

Además de carbono, hidrógeno y oxígeno suministrado por los hidratos de carbono, son necesarios también en el medio nitrógeno, potasio, fósforo, azufre y magnesio. Se halló que el medio más favorable para la producción de ácido cítrico, tiene la siguiente composición:

Composición del medio:

Guarapo (azúcar de caña).....	1,500 ml
Nitrato de amonio (NH_4NO_3).....	0.2 %
Fosfato de potasio ($\text{K H}_2\text{PO}_4$).....	0.1 %
Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$).....	0.025 %

Se ajusta el pH con ácido clorhídrico (HCl) N/5 a 3.4 - 3.5 .

Se disuelven las sales y los azúcares con agua destilada hasta un litro, se ajusta el pH de 1.6 a 2.2 con ácido clorhídrico normal y se esteriliza durante 10 minutos a 121°C y 1.4 Kg/cm^2 .

La restricción en el abastecimiento de nitrógeno tiende a aumentar la producción de ácido cítrico.

La presencia o ausencia de ciertos elementos pueden tener un marcado efecto sobre los resultados.

.- CEPA EN TUBO INCLINADO.

El maestro del laboratorio proporcionará al alumno un tubo con medio inclinado que contiene la cepa de *Aspergillus niger*.

.- PIE DE CUBA.

Se toman 100 ml del medio esterilizado en un matraz y se resuspende la cepa de *A. niger*, con dos o tres asadas es suficiente para la incorporación del microorganismo en el medio líquido.

Las condiciones en que se desarrolla el microorganismo son:

pH (1.6 a 2.2), temperatura 26° a 28°C , la concentración de-

azúcares de 15° a 18° Bx.

Cuando la superficie del matraz esta cubierta con una capa de micelio, se vierte todo el contenido del matraz en el fermentador.

.- FERMENTADOR: (Fig. 6.1)

El fermentador está diseñado de modo que tenga la mayor area superficial posible, Ya que la conversión de azúcares es efectuada por las enzimas intracelulares, por lo tanto, tiene lugar dentro de la célula que constituyen la pelicula del hongo; el azúcar pasa al interior de la célula por ósmosis, por lo tanto este proceso de difusión enzimático determina el tiempo de fermentación.

En un recipiente profundo y de gran capacidad, la formación de ácido será lenta, puesto que la superficie de la capa de hongos será pequeña en comparación con el volúmen.

Inversamente con empleo de recipientes planos se consigue una gran superficie de micelio y la conversión de azúcar en ácido cítrico se efectúa con gran rapidez; de acuerdo con esto habrá de emplearse la relación área de superficie-volúmen a la que corresponde un menor tiempo de fermentación.

La agitación del medio, aún muy ligera hace disminuir la velocidad de producción de ácido cítrico.

El aire en grandes cantidades tien un efecto pejudicial sobre el rendimiento de la fermentación, sin embargo el paso de pequeñas cantidades de aire sobre la capa de mohos no es perjudicial. Por otra parte la escacez de aire es también desfavorable para la producción de ácido cítrico.

La temperatura óptima es de 26° a 28°C., la cantidad de ácido cítrico producido aumenta a la temperatura de 28°C y a 30° C ó más disminuye la producción de ácido cítrico, aunque aumenta la acidez total por formación de ácido oxálico.

- CONTROLES DE FERMENTACION:

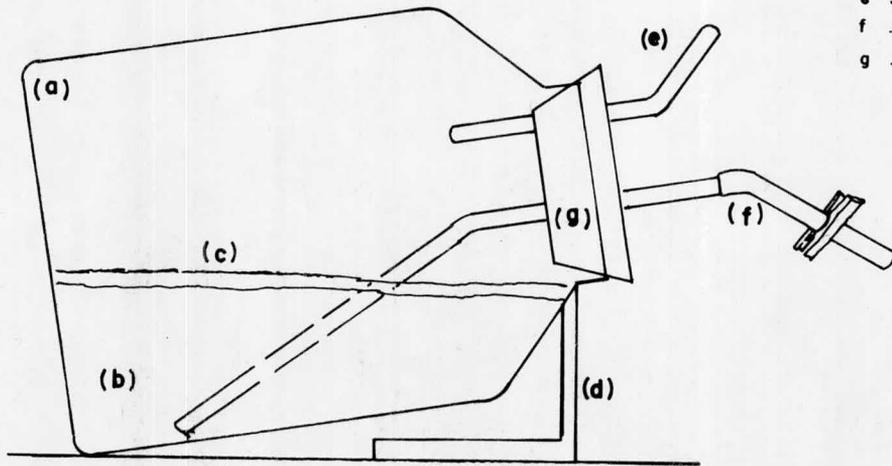
Estos son físicos y químicos, dentro de los primeros estan la temperatura, la relación entre el Área Superficial y el Volúmen.

Los controles químicos son pH, Acidez (en ácido cítrico), -
Inductores Directos y Reductores Totales.

5.- FERMENTADOR
(Fig 6.1)

PARTES DEL FERMENTADOR

- a .- Frasco de 3000 ml.
- b .- Mosto
- c .- Microorganismo
- d .- Soporte
- e .- Tubo de seguridad
- f .- Toma de muestra.
- g .- Tapon de hule.



.- TEMINO DE LA FERMENTACION Y DETERMINACION DE ACIDO CITRICO:

El final de la fermentación es determinado por el valor de la acidez, cuando alcanza 1.4 a 2 % de ácido cítrico, y la cantidad de azúcar en el medio es pequeña. Se toma una muestra de 10 ml se lleva a ebullición, se trata con cloruro de calcio al 10% y no debe precipitar ya que esto indica presencia de ácido oxálico. Se agrega hidróxido, de amonio y se reduce el volumen a un tercio (ebullición), se precipita el citrato de calcio; se lava con agua caliente y después con alcohol al 60%, se seca a 130° a 135°C obteniéndose el citrato de calcio sin agua de cristalización.

1g de citrato de calcio = 0.843 g de Ac. cítrico con agua.

1g de citrato de calcio = 0.77 g de Ac. cítrico ^{sin} con agua.

Se debe agregar al ácido cítrico; en el caso de que presente precipitación por presencia de ácido oxálico, cloruro de calcio en ebullición, y dejando reposar de 3 a 4 horas. Se filtra y se disuelve el precipitado con la cantidad mínima de ácido clorhídrico diluido, con esto se redisuelve el ácido oxálico y se procede a precipitar con acetato de sodio, finalmente se disuelve el precipitado en ácido sulfúrico diluido en caliente, esto se hace para disolver y favorecer la reacción después se titula la solución con KMnO_4 0.1 N en caliente.

1 ml de KMnO_4 = 6.3 mg de Ac. oxálico con agua

1 ml de KMnO_4 = 4.5 mg de Ac. oxálico sin agua.

.- SEPARACION Y PRECIPITACION:

Se procede a la separación, en donde se somete al micelio a una ligera presión para extraer el ácido cítrico que contenga (Tela de muselín).

El resto se pasa a un recipiente grande, y se va agregando poco a poco carbonato de calcio (para formar la sal), bajo agitación constante; se agrega un ligero exceso y se hierve durante 5 minutos esto se hace para eliminar CO_2 y se tenga una mayor solubilidad.

.- CENTRIFUGA:

Se recupera el precipitado por centrifuga y se lava con agua caliente y se centrifuga.

10.- DECOLORACION Y FILTRACION:

Se disuelve el precipitado en ácido clorhídrico diluido y se decolora con carbón animal, se filtra y se precipita.

11.- PRECIPITACION Y CENTRIFUGACION:

Se precipita con NaOH concentrado bajo agitación constante y se recupera el precipitado por centrifugación o filtración y se lava con agua caliente.

12.- SECADO:

Se deja secar a temperatura ambiente en un desecador con CaCl_2 como deshidratante.

13.- OBTENCION DEL PRODUCTO TERMINADO:

El cítrato de calcio obtenido se trata con una cantidad equivalente de H_2SO_4 (1:5) se filtra se lava con agua y se evapora al vacío; se separan el CaSO_4 ; el ácido cítrico se cristaliza en hielo

Usos del ácido cítrico: Aproximadamente el 65 % del ácido cítrico se usa para fines medicinales (cítratos, etc.), el 15% en alimentos (extractos aromatizantes, bebidas espumosas, etc.), el 9% - en confitería y pequeñas cantidades como ingredientes de tintas, en plateados, en teñidos y estampados de percal, en grabados, etc..

14.- PRUEBAS DEL PRODUCTO TERMINADO:

Se califica el producto de acuerdo a los siguientes análisis.

a).- Análisis físicos.

- aspecto.
- color.
- acidez.
- forma de los cristales.

b).- Análisis químicos.

- reductores directos.
- reductores totales.
- acidez (en ácido cítrico).
- pH.

CUESTIONARIO:

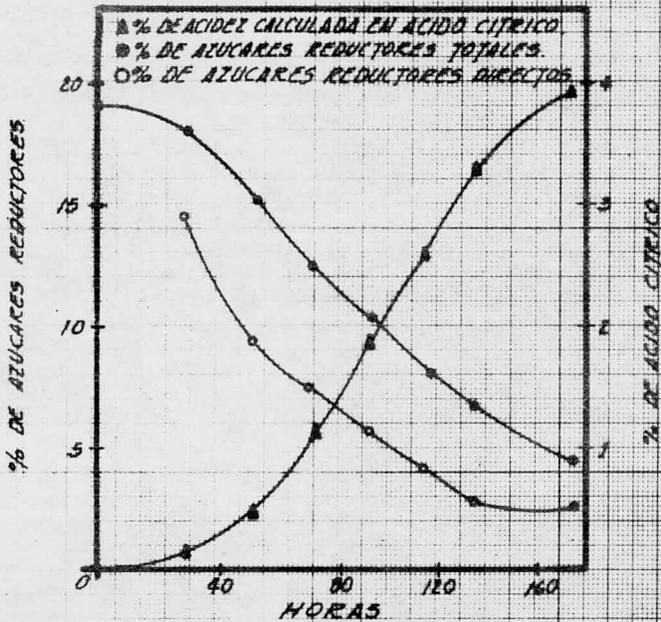
- 1.- Explique el mecanismo de la fermentación.
- 2.- Usos del ácido cítrico .
- 3.- Describa dos métodos empleados en la industria para la -
obtención de ácido cítrico,
- 4.- Mencione dos microorganismos que efectúen la fermentación
cítrica y sus condiciones (diferente de A. niger).
- 5.- Generalidades de Aspergillus niger.
- 6.- Como influyen las sales en el metabolismo del Aspergillus
niger.
- 7.- Gráfica y tabla de acidez Vs. tiempo.
- 8.- Gráfica y tabla de reductores totales Vs. tiempo.
reductores directos Vs. tiempo.

NOTA:

⁺⁺ Se debe de reportar en cuadros los resultados tanto físicos -
como químicos, anexando observaciones, aclaraciones y comen-
tarios.

BIBLIOGRAFIA:

1, 9, 15, 20, 29, 30, 35, 36, 38, 39, 51, 64, 69.



FERMENTACION CITRICA

TICMPO (HRS)	AZUCAR REDUCTORES TOTALES (%)	DIRECTOS (%)	% DE ACIDO CITRICO
0	19.1210	—	—
30	18.0354	14.5403	0.0193
50	15.2133	9.3741	0.0437
70	12.4128	7.5388	1.2141
90	10.5037	5.8529	1.7389
113	8.0812	4.3710	2.5416
130	6.9558	2.9634	3.2488
178	4.5134	2.5173	3.8952

PRACTICA No. 9
FERMENTACION CITRICA
OBTENCION DE ACIDO CITRICO

- OBJETIVO: La obtención de ácido cítrico a nivel de laboratorio - así como los controles que se requieren en el proceso.

- MATERIAL:

- Fermentador:

- Un frasco de 3000 ml
 - Un soporte para inclinar el frasco
 - Una tapa del frasco
 - Tubo de vidrio de 5mm \varnothing
 - Manguera de plástico de 5 mm \varnothing
 - Unas pinzas de More
- Un matraz Erlenmeyer de 3000 ml
- Cinco matraces Erlenmeyer de 250 ml
- Un matraz aforado de 100 ml.
- Un matraz kitasato de 500 ml
- Dos pipetas volumétricas de 5 ml
- Dos pipetas volumétricas de 10 ml
- Una pipeta graduada de 5 ml
- Una probeta de 1000 ml
- Una bureta de 50 ml
- Un embudo de cola larga
- Un vaso de 600 ml
- Un buchner
- Un desecador
- Un soporte universal
- Un mechero con manguera
- Una tela de asbesto
- Un tripie
- Unas pinzas de tres dedos
- Papel pH
- Papel filtro
- Tela de muselina (1 m)
- Cuerpos de ebullición
- Un aerómetro brix (0° - 25°)

EQUIPO: Centrifuga, Cuarto de Incubación.

- REACTIVOS:

- Solución de Fehling "A"
- Solución de Fehling "B"
- Solución de NaOH concentrada
- Solución de NaOH 0.01 N
- Solución de HCl concentrada
- Solución de HCl diluido
- Solución de CaCl_2 al 10%
- Solución de fenolftaleína
- Solución de NH_4OH concentrado
- Solución de H_2SO_4 diluida
- Solución de azul de metileno
- Solución de CaCl_2
- Solución de CaCO_3
- Acetato de sodio
- Metabisulfito de potasio
- Oxalato de potasio
- Subacetato de plomo
- Carbon animal

- EXPERIMENTO:

Se monta el fermentador (*), se esteriliza junto con sus implementos, con una solución de metabisulfito de potasio (150 mg/l). En un matraz con 1500 ml de mosto (jugo de caña, sacarosa, melasa etc., a una concentración de 14 a 20%) se adiciona NH_4NO_3 al 0.2% KH_2PO_4 al 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 0.025%. Se esteriliza el medio a una temperatura de 121°C y una presión de 1.4 Kg/cm^2 durante 10-min., después se enfría el medio al chorro de agua, hasta una temperatura de $26^\circ - 28^\circ\text{C}$. Se vacía el medio al fermentador, teniendo cuidado de hacerlo en una zona estéril, una vez en el fermentador se mide y se ajusta el pH, el cual debe estar en un rango de 3.0 a 4.0. Se hace un pie de cuba para que el microorganismo se adapte al nuevo medio de crecimiento, esto se hace colocando en un matraz de 250 ml, 100 ml del medio diseñado y se inocula con una suspensión de esporas de *Aspergillus niger*, proporcionada por el maestro del laboratorio.

Se incuba a 26 - 30°C y una vez que se observa desarrollo Micelar en el matraz, se vacía su contenido en el fermentador, empezando a contar el tiempo de fermentación una vez que el desarrollo micelar llega a extenderse en todo la superficie del medio.

Controles de la Fermentación.- Estos son físicos y químicos, dentro de los primeros estan la Temperatura, la relación entre el -- área superficial y el volúmen.

Los controles químicos son: pH, Acidez (en ácido cítrico), Reductores Directos y Reductores Totales. Estos controles se llevan a cabo cada día, durante el transcurso de la fermentación. El final de la fermentación será detectado cuando el valor de la acidez -- permanezca constante y la cantidad de carbohidratos en el medio -- sea pequeño. Cuando esto sucede se procede a extraer el ácido --- cítrico del medio. La capa del hongo se exprime con una tela de muselina; el medio fermentado se filtra en un vaso grande y se va agregando poco a poco CaCO_3 , bajo agitación constante y calentamiento, se agrega un ligero exeso de CaCO_3 y se hierve 5 min., se recupera el precipitado por centrifugación, se lava con agua caliente y se centrifuga. El precipitado se disuelve en HCl diluido y se decolora con carbon animal, se filtra y se precipita con --- NH_4OH concentrado, bajo agitación constante y en ebullición. Se recupera el precipitado por centrifugación, se lava con agua caliente y se centrifuga; se deja secar a temperatura ambiente en un desecador con CaCl_2 como deshidratante.

El cítrato de calcio obtenido se trata con una cantidad equivalente de H_2SO_4 diluido (1.5) se filtra se lava con agua y se evapora al vacío; se separa primero en CaSO_4 que se retira; el ácido cítrico se cristaliza en hielo.

Determinación de Acido Cítrico.- En el último día de la fermentación se toma una muestra de 10 ml del medio fermentado, se lleva a ebullición y se trata con una solución CaCl_2 al 10%; no debe haber precipitado (precipitado indica ácido oxálico), se agrega --- NH_4OH concentrado y se reduce el volúmen a un tercio por ebullición; se precipita el citrato de calcio, se filtra se lava con -- agua caliente y después con alcohol al 60%. Se seca hasta peso -- constante. Se obtiene citrato de calcio sin agua de cristaliza --

ción. 1 g de citrato de calcio = 0.843 g de ácido cítrico (con agua)

1 g de citrato de calcio = 0.77 g de ácido cítrico (sin agua)

En caso de que haya ácido oxálico se precipita este (antes de la determinación del ácido cítrico) con CaCl_2 y en ebullición se deja reposar 3 a 4 horas, se filtra se disuelve el precipitado con la cantidad necesaria de HCl diluido y se vuelve a precipitar con acetato de sodio (papel congo). Finalmente se disuelve el precipitado en H_2SO_4 diluido caliente y se titula solución con KMnO_4 0.1 N. Un mililitro de KMnO_4 equivale a 6.3 mg de ácido oxálico (con agua) y 4.5 mg de ácido oxálico (sin agua).

- CUESTIONARIO:

- 1.- Explique el mecanismo y la fermentación.
- 2.- Usos del ácido cítrico.
- 3.- Describa dos métodos empleados en la industria para la obtención de ácido cítrico.
- 4.- Mencione dos microorganismos que efectúen la fermentación cítrica y sus condiciones (diferente de *A. niger*).
- 5.- Generalidades de *Aspergillus niger*.
- 6.- ¿Como influyen las sales en el metabolismo del *Aspergillus niger*?
- 7.- Gráfica y tabla de acidez Vs. tiempo.
- 8.- Gráfica y tabla de reductores totales Vs. tiempo.
- 9.- Gráfica y tabla de reductores directos Vs. tiempo.

- METODOS DE EVALUACION:

El alumno sera evaluado en función de los siguientes parámetros:

- Rendimiento de la fermentación (optimo de 3-4 g de ácido cítrico)
- Todos los datos obtenidos en los controles de la fermentación-reportados en gráficas y tablas.

(*) NOTA: La fabricación del fermentador es dada por el maestro en una clase previa a la sesión de laboratorio.

BIBLIOGRAFIA:

1, 9, 15, 20, 29, 30, 35, 36, 38, 39, 51, 64, 69.

CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES:

El laboratorio de Fermentaciones Industriales, posee varias características interesantas entre las cuales destaca por su importancia la de aplicar los conocimientos adquiridos en materias como Análisis de Alimentos, Enzimología Aplicada a los Alimentos, Control de Calidad, Bioquímica, Orgánica, Procesos de Alimentos etc.. Estos conocimientos son utilizados y aplicados en la obtención de los productos fermentados. Esto hace que el alumno se de cuenta de sus errores o faltas durante su aprendizaje, permitiéndole llenar estas deficiencias al tener que investigarlas y corregirlas para poder cursar este laboratorio.

Se ha podido observar el interés que tienen los alumnos - por los procesos fermentativos y los problemas a que se tienen que enfrentar en este laboratorio, como son : la falta de equipo adecuado, la falta de información, pero sobre todo la falta de tiempo, este último factor es importante, ya que es el que limita nuestro curso.

En el presente trabajo se trata de organizar las prácticas ahorrando tiempo al maestro y al alumno, se proporciona información general sobre todas las prácticas, dando la fuente y ubicación de esta información, se dan también los lineamientos para la evaluación del alumno, se trata de motivar, al alumno - haciendo que éste conozca mejor los procesos de obtención de los diferentes productos y comparando los resultados obtenidos en el laboratorio con productos comerciales.

Esto ayuda a que el alumno adquiriera mayores conocimientos de lo que son las fermentaciones industriales.

BIBLIOGRAFIA.

B I B L I O G R A F I A :

+ + + + + + + + + + + + +

- 1.- Aiba S., Humphery A. y Millis N.
Biochemical Engineering.
Academic Press.
New York, U.S.A. (1965).
- 2.- Allgeier y Hildebrandt
Newer Developments in Vinegar Manufacture
U.S. Army Chemical Corps.
New York, U.S.A. (1956).
- 3.- Alvarez C. M. J. y Calle V. P.
La preparación y utilización del Material Audiovisual para
la demostración de prácticas de laboratorio de Procesos de
Alimentos. Tesis Prof.
Facultad de Química U.N.A.M.
D.F. México (1973).
- 4.- AMERINE M. A., Berg H.W. y Cruess W. V.
The Technology of Wine Marking
The Avi Publishing Co.
Westport Conn, U.S.A. (1972).
- 5.- Amerine M. A. y Joslyn M. A.
Table Wines
Ed. University of California Press.
U.S.A. (1970).
- 6.- Amerine M. A. y Ohgh C.S.
Wine and Must Analysis
Wiley Interscience Publication
New York, U.S.A. (1974).
- 7.- Association of Official Agricultural Chemists (A.O.A.C.)
Oficial Methods of Analysis
Whashintong, D.C., U.S.A.. (1970)
- 8.- Barker H.A.
Bacterial Fermentations
Ed. J. Wiley
New York, U.S.A. (1956).

- 9.- B. B. L. Manual
Manual de Procedimientos de Laboratorio y de Productos.
D.F. México (1968).
- 10.- Bondial E.
Elaboración de Vinos, Vinificación Moderna.
Ed. Sintés.
Barcelona, España (1959).
- 11.- Boscan L.
Control de Calidad en la Leche.
Trabajo Práctico No. 1
Universidad de Maracaibo
Maracaibo, Venezuela (1971).
- 12.- Cañizo S. M. E.
Elaboración, Evaluación de un Producto Seco a base de --
Leche Fermentada y Maíz. Su adaptación a nivel rural.
Tesis Prof.
Facultad de Química U.N.A.M.
D. F. México (1977).
- 13.- Carbonell R. M.
Aguardientes, Licores y Aperitivos.
Ed. Síntesis.
Barcelona, España (1965).
- 14.- Carbonell R. M.
Tratado de Vinicultura
Ed. A.E.D.O.S.
Barcelona, España (1970).
- 15.- Carpenier P.L.
Microbiología.
Ed. Interamericana
D.F. México (1967).
- 16.- Charles A.
La ciencia de la Leche.
Ed. Continental.
Barcelona, España (1971).

- 17.- Chávez A.
La Tecnología de los Alimentos y la Salud Pública.
Salud Pública de México, 8 [4] 549 (1966)
- 18.- Cruess W. V.
The Principles And Practice of Wine Marking
Avi Publishing Co.
New York, U.S.A. (1947).
- 19.- Desrosier N.W.
Conservación de Alimentos
Ed. Continental.
D.F. México. (1976).
- 20.- Difco Manual of Dehydrate Culture and Read.
Reagent of Microbiology and Clinical Laboratories Proesure
Detroit, U.S.A. (1974)
- 21.- Erkki O.
Effect of Aeration Intensity on the Biochemical Composition
of Baker's yeast.
Biotechnology and Bioengineering 16, 1213-1225 (1974).
- 22.- Escamilla H. M.L., Reyes D. A. y Varela G. V.E.
Proyecto para la Industrialización de la Tuna. Tesis Prof.
Facultad de Química U.N.A.M.
D.F. México (1977).
- 23.- Farrell J.P.
Making Cordials and Liguers at Home.
Haper And Raw Pub.
New York, U.S.A. (1974).
- 24.- Flores M. R.
Elaboración de Sidar y Control de Proceso, Tesis Prof.
Facultad de Química U.N.A.M.
D.F. México (1976).
- 25.- Frazier W.C.
Microbiología de Alimentos
Ed. Acribia.
Zaragoza, España (1976).

- 26.- Garrido S. N.
Elaboración de Vinagres
Ed. Sintés
Barcelona, España (1957).
- 27.- González C. F., Nosti Vega M., Durán Q. M.C., Garrido F.A.
El Proceso de Fermentación en las Aceitunas Negras maduras en la Salmuera.
Instituto de la Grasa y sus Derivados Sevilla 26, 297-309
(1975).
- 28.- González P.A. Muñoz G. J., Rodríguez R. N. Sayavedra S. L.A.
Aspectos del Aprovechamiento Integral de la Carnaza del --
Datil de la palma China. Tesis Prof.
Facultad de Química U.N.A.M.
D.F. México (1977).
- 29.- Haehn H.
Bioquímica de las Fermentaciones
Ed. Aguilar.
Madrid, España (1956).
- 30.- Hansen, I.A.
Microbiología de las Fermentaciones Industriales.
Ed. Acribia.
Zaragoza, España (1959).
- 31.- Honig P.
Principios de Tecnología Azucarera
Tomos I, II, III.
Ed. Continental.
D.F. México (1974).
- 32.- Houg D.E. y Briggs D.E.
Malting and Brewing Science
Chapman and Hall Ltd.
New York, U.S.A. (1971).
- 33.- Humpheys C. y Plunkett M.
Yoghurt:
Areview of Its Manufacture
Dairy Sc. Abst, 31 [11] 607 (1969).

- 34.- Jacobs M. B.
The Chemical Analysis of Foods And Food Products.
Publishing Co. Inc.
New York, U.S.A. (1973).
- 35.- Jorgensen A.
Microbiología de las Fermentaciones Industriales.
Ed. Acribia
Zaragoza, España (1959).
- 36.- Kirk—Othemer
Enciclopedia de Tecnología Química
Vol. VII
Ed. Uteha
Madrid, España (1970).
- 37.- Kretzschmar H.
Levaduras y Alcoholes
Ed. Reverte, S. A.
Barcelona, España (1961)
- 38.- Laksh M. H, Chsudhary K, Ethiraj S. y Tauro P.
A Solid State Fermentation Method for Citric Acid
Production Using Sugar cane Bagasse
Biotechnology and Bioengineering. 17, 291-293 (1975).
- 39.- Lehninger L.
Biochemistry
Worth Publishers Inc.
New York, U.S.A. (1974).
- 40.- Lemoine M. B.
Evaluación Química y Biologica de Levadura. Tesis Prof.
Facultad de Química U.N.A.M.
D.F. México (1977).
- 41.- Magistocchi G.
Tratado de Enología
Ed. El Ateneo
Buenos Aires, Argentina (1955).

- 42.- Muñoz G. D.
Concentración de Biomasa Unicéular. Tesis Prof.
Facultad de Química U.N.A.M.
D.F. México (1976).
- 43.- Noguera P.J.
Enotecnia Industrial
Ed. Dilagro
Barcelona, España (1974).
- 44.- O.P.S.
Normas para el exámen de los Productos Lácteos.
Organización Panamericana de la Salud; Organiza
ción Mundial de la Salud.
Washington D.C. (1963).
- 45.- Pearson D.
The Chemical Analysis of Foods.
Ed. Churchill-Livingstone
New York, U.S.A. (1976).
- 46.- Pederson S.
Microbiology of Food Fermentations
The Avi Publishing Co.
Westport Conn, U.S.A. (1971).
- 47.- Peña C.
Studies on the Continuous Culture of Microorganism
Ph. D. Thesis
University of Wisconsin
Wisconsin, U.S.A. (1971).
- 48.- Peringer P. Blachese H, Corrierg y Lane A. G.
A Generalized Mathematical Model For the growth-
Kinetics of *Saccharomyces Cerevisiae* whith Experi
mental Determination of Parameters.
Biotechnology and Bioengineering, 16, 431-454 (1974).
- 49.- Peterson M.
Fermentation
Encyclopedia of Food Technology
The Avi Publishing Co.
Wesport Conn., U.S.A. (1974).

- 50.- Piedracruz C. J.J.
Estudio Comparativo de los dos Principales Métodos
de Producción de Vinagre en México. Tesis Prof.
Facultad de Química U.N.A.M.
D.F. México (1976).
- 51.- Prescott S. C. y Dunn C.C.
Microbiología Industrial
Ed. Aguilar
Madrid, España (1962).
- 52.- Redd y Peppler.
Yeast Technology
The Avi Publishing Co.
Wesport Conn. (1973).
- 53.- Ribéreau J. y Gayon
Transformaciones y Tratamientos de los Vinos.
Ed. Salvat
Barcelona, España. (1954).
- 54.- Ribéreau - Gayon J. y Peynaud E.
Análisis de Vinos
Ed. Aguilar
Madrid, España (1962).
- 55.- Rodríguez B. A.
Información sobre la Preparación de Aceitunas Estilo
Sevillano en grandes Fermentadores.
Instituto de las Grasas y sus Derivados.
Fac. 3
Sevilla: 26, 161-166 (1975).
- 56.- Rodríguez B. A.
Información
Vol. XXVI
Instituto de las Grasas y sus Derivados.
Sevilla, España (1975).
- 57.- Roland J. F. y Alm W. L.
Wine Fermentations Using Membrane Processed Hidrolyzed Whey
Biotechnology and Bioengineering, 17, 1443-1453 (1975).

- 58.- Sannino F. A.
Tratado de Enología
Ed. G. Gili
Roma, Italia (1948).
- 59.- Slyke V.
Vinegar Cider, a Study of the chemistry of Home made
cider Vinegar.
New York Agr. Exp-Geneva
Bulletin No. 258
New York, U.S.A. (1904).
- 60.- Solomons G. L.
Materials and Methods in Fermentation
Academic Press
London, Inglaterra (1969).
- 61.- Steel R.
Biochemical Engineering
Ed. Manchester College of Science and Technology
New York, U.S.A. (1958).
- 62.- Thorpe, T.E.
Enciclopedia de Química Industrial
Volúmen I, II, III, VI
The University Society Inc.
New York, U.S.A. (1960).
- 63.- Treadwell H.
Analytical Chemistry
Volúmen II
Hohn Wiley and Sons Inc.
London, Inglaterra (1924).
- 64.- Under- Kofler L.A. y Hickey R.
Industrial Fermentations
Volúmen I y II
Chemical Publishing Co.
New York, U.S.A. (1954).

- 65.- Vogt E.
Fabricación de Vinos.
Ed. Acribia
Zaragoza, España (1972).
- 66.- Webb F. C.
Ingeniería Bioquímica
Ed. Acribia
Zaragoza, España (1966).
- 67.- White J.
Yeast Technology
John Wiley and Sons
New York, U.S.A. (1954).
- 68.- Winton A. L. y Winton K.B.
The Structure and Composition of Foods.
Volumen II
Ed. John Wiley and Sons Inc.
New York, U.S.A. (1975).
- 69.- Wingard Jr. y Lemuel B.
Enzime Engineering
Interscience Publishers
New York, U.S.A. (1972).
- 70.- Whitmarsh J. M.
Brithis Fermentation Industries
Ed. Pitman.
London, Inglaterra (1958).
- 71.- Wyant Z. N.
Vinegar
Michigan Agricultural
Especial Bulletin No. 98
East Lansing Mich. U.S.A. (1929).