



# Guía de Laboratorio Microbiología Industrial

Profesora: Alejandra Arancibia Díaz



## Índice

<b>Calendarización Laboratorios</b>	3
<b>Laboratorio N°1:</b> Cultivo por Lotes <i>E. coli</i>	4
<b>Laboratorio N°2:</b> Determinación y comparación de la curva de consumo de sustrato Utilizando glucosa y sacarosa como fuente de carbono y energía en Un cultivo por lotes de <i>E.coli</i> .	10
<b>Laboratorio N°3:</b> Fermentaciones industriales, Elaboración de yogurt por medio de un Cultivo por Lotes.	18
<b>Laboratorio N°4:</b> Fermentaciones industriales, Producción de vinagre por medio De un cultivo continuo.	26
<b>Laboratorio N°5:</b> Caracterización de un RIL	36
<b>Laboratorio N°6:</b> Obtención de Amilasas Fúngicas	47



## Formato de Entrega de Informe:

- Papel tamaño carta.
- Letra Arial 10.
- Márgenes 2 cm por cada lado.
- Los títulos y subtítulos deben ir en negrita.
- Escritura a espacio simple.
- El número total de hojas no debe sobrepasar las 15, incluyendo portada e índice.

### El informe debe incluir:

1) **Tapa:** (según el formato de Universidad de las Américas)

- Título. (nombre de la guía)
- Integrantes. (Nombre y apellidos)
- Nombre docente: **Alejandra Arancibia D.**
- Fecha de realización del práctico

2) **Índice.**

- Especificar la página en la que se encuentra cada uno de los capítulos del informe.

3) **Introducción:**

- Indicar el marco teórico del estudio realizado.
- Especificar los objetivos generales y específicos del trabajo realizado.

4) **Materiales y Métodos:**

- Presentar las actividades realizadas y los medios empleados en su desarrollo incluyendo fotos, gráficos, esquemas, láminas, etc. Citar la bibliografía consultada en el caso de ser necesario.

5) **Resultados y Discusiones:**

- En esta parte se mostrar en forma de tablas todos los resultados de las mediciones realizadas.
- Posteriormente realizar una breve discusión con fundamento teórico de lo observado en el laboratorio.
- Ej. Si entre dos muestras problemas observó un cambio de color cual es el principio químico que lo hizo cambiar y

mostrar ese tipo de reacción para lo cual debe utilizar bibliografía.

#### 6) Discusiones y recomendaciones:

- Presentar las conclusiones obtenidas y posibles recomendaciones que el alumno pueda aportar.

#### 7) Bibliografía:

Al final de cada informe se deberá detallar la bibliografía consultada en base al siguiente modelo.

- **Libros.**

**APELLIDO E INICIAL DEL NOMBRE DEL AUTOR 1; APELLIDO E INICIAL DEL NOMBRE AUTOR 2; APELLIDO E INICIAL DEL NOMBRE AUTOR 3; ETC.** Año de publicación. Título de la publicación. Editorial. Ciudad y país de publicación. \_\_ Pág. (páginas del texto).

Ej: Matissek, R., Schnepel, F. N. y Steiner, G. 1998. Análisis de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza, España.: pp. 1 y 229-232.

- **Revistas u otra publicación periódica:**

**APELLIDO E INICIAL DEL NOMBRE DEL AUTOR 1; APELLIDO E INICIAL DEL NOMBRE AUTOR 2; APELLIDO E INICIAL DEL NOMBRE AUTOR 3; ETC.** Año de publicación. Título de la publicación. EN REVISTA: Editorial. pp.: \_\_ - \_\_ (páginas citadas).

Ej: Mazziatelli, M., and A. Shubert. 1990. Effect of several VAM endophytes and artificial substrate on vitropropagated *Vitis berlandisi* x *rupestris* 1103. En revista: Agric. Ecosyst. Environ. 29:279-283.

- **Webibliografía:**

**APELLIDO E INICIAL DEL NOMBRE DEL AUTOR.** Disponible en: Página web.

SORIA A., Elia M., REYES E., Carlos, OCCEGUERA A., Zenaida *et al.* **MICORRIZACIÓN DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Sacharum officinarum*).** *Agric. Téc.* [online]. oct. 2001, vol.61, no.4 [citado 02 Septiembre 2007], p.436-443. Disponible en la Web:



[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0365-28072001000400005&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-28072001000400005&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 0365-2807.

**NOTA:**

No se aceptaran como bibliografía o fuente de información.

[www.google.cl](http://www.google.cl)

[www.google.com](http://www.google.com)

[www.rincondelvago.com](http://www.rincondelvago.com)

[www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com)

[www.yahoo.com](http://www.yahoo.com)

[www.altavista.com](http://www.altavista.com)

Ni otro tipo de web de dudosa fuente

# Guía de Laboratorio N° 1

## Cultivo por Lotes de *E. coli*

### ***Objetivo General:***

Seguimiento de un cultivo bacteriano en matraces utilizando la cepa *E. coli* con el fin de estudiar la cinética de crecimiento celular.

### ***Objetivos Específicos:***

- Diseño del medio de cultivo para *E. coli* para una biomasa final de 1 g/L
- Determinación de velocidad específica de crecimiento de *E. coli*.
- Obtención de los perfiles de crecimiento Bacterianos.
- Construcción de la curva de calibrado de biomasa.

### ***Actividades:***

#### **Día N°1:**

#### **Preparación de Medios de cultivo:**

- o Preparación de Medio de cultivo mínimo líquido para 1g/L. para el seguimiento de la curva de crecimiento.
- o Utilice los siguientes reactivos e información de la célula para su diseño y considera a la glucosa como el sustrato limitante.

Elemento	Fuente	% en célula
C	$C_6H_{12}O_6$	50
N	$NH_4Cl$	14
S	$K_2SO_4$	1
Mg	$MgCl_2$	0,5
P	$K_2HPO_4$	2

- Debe preparar 2 matraces de 250 mL de volumen con 100 mL de Medio de cultivo diseñado.
- **Nota: No olvidar dejar medio de cultivo líquido estéril (sin sembrar) para ser utilizado como blanco en el espectrofotómetro.**

#### Preparación de Material de Vidrio:

- Monte en un pipetero o en papel café con cinta de esterilización las pipetas de 1 mL y de 10 mL que utilizará para el seguimiento de la curva.
- **Nota: Todo material que Ud. considere necesario que utilizará en el proceso de este laboratorio deberá dejarlo listo durante esta sesión, sobretodo lo que deba dejarse estéril**

### Siembra:

- A los matraces preparados, agregue 5 mL (c/u) del caldo de cultivo entregado y lleve a incubar en Agitador Orbital a 38° C con 200 r.p.m. De uno de los matraces inmediatamente después de inocular tomar 1 mL para medir la D. O. esta medición corresponderá a valor de Tiempo 0. (To).

### *Seguimiento de Crecimiento Celular:*

- De uno de los matraz incubado ( al que le tomo la muestra de tiempo 0), debe medirse la D.O. cada 15 min, teniendo cuidado de: agitar el matraz antes de tomar la muestra para realizar las medidas y de realizar este muestreo en condiciones asépticas (Frente a mechero respetando la campana de esterilidad o bajo campana de flujo laminar).

### *Curvas de Calibrado:*

- 1) **Biomasa:** La concentración celular se obtiene a partir de la curva de calibrado que relaciona la absorbancia con la concentración celular, siendo esta ultima determinada a través de la metodología del peso seco.

La metodología del análisis de peso seco consiste en:

- Diluir un cultivo celular (el 2° matraz inoculado) a distintas concentraciones(diluciones seriadas, es decir, se toman 10 tubos de ensayo y se va diluyendo en forma consecutiva, 1mL de agua destilada y 9 mL de cultivo en el tubo N°1, 2 mL de agua destilada y 8 mL de cultivo en el tubo N°2 y así sucesivamente hasta llegar al tubo N° 10 en donde agregará 9 mL de agua destilada y 1 mL de cultivo) y obtener la lectura de absorbancia a través del espectrofotómetro.
- Centrifugar 5 mL de cada muestra a 5000 r.p.m. durante 15 min.
- Retirar el sobrenadante y lavar los sólidos con agua destilada.
- Centrifugar nuevamente y lavar los sólidos.
- Colocar el pellet obtenido en capachos de papel aluminio y secarlo a 110° C durante 8 a 10° C.
- Enfriar en desecadora y pesar en balanza analítica.

- Volver a dejar en estufa por 2 horas, enfriar y volver a pesar. Repetir el procedimiento hasta obtener peso constante.
- No olvidar de tarar cada capacho y marcarlo.

***Determinación de la concentración Inicial:***

Del caldo entregado, con el cual realizará la siembra realizar peso seco y absorbancia para determinar la biomasa inicial.

## Guía de Laboratorio N° 2

### **Determinación y comparación de la Curva de consumo de sustrato utilizando glucosa y sacarosa como fuente de carbono y energía para *E coli*.**

#### ***Objetivo General:***

Seguimiento y comparación de dos cultivos bacterianos en matraces utilizando la cepa *E. coli* con el fin de estudiar la cinética de consumo de sustrato utilizando dos tipos de fuentes de carbono y energía distintas.

#### ***Objetivos Específicos:***

- Obtención de los perfiles de consumo de glucosa y sacarosa Bacterianos.
- Construcción de curvas de calibrado de sustrato.
- Comparación entre los perfiles de consumo de distintas fuentes de carbono y energía.

#### **Actividades:**

##### **Día N°1:**

##### **Preparación de Medios de cultivo:**

- o Preparación de Medio de cultivo mínimo líquido para 1g/L. para el seguimiento de la curva de crecimiento.
- o Utilice los siguientes reactivos e información de la célula para su diseño y considera a la glucosa como el sustrato limitante.

Elemento	Fuente	% en célula
C	Glucosa	50
	Sacarosa	
N	NH <sub>4</sub> Cl	14
S	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1
Mg	MgCl <sub>2</sub>	0,5
P	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2

- Debe preparar 2 matraces de 250 mL de volumen con 100 mL de Medio de cultivo diseñado, uno con glucosa como fuente de carbono y otro con sacarosa como fuente de carbono.

#### **Preparación de Material de Vidrio:**

- Monte en un pipetero o en papel café con cinta de esterilización las pipetas de 1mL y de 10 mL que utilizará para el seguimiento de la curva.
- **Nota: Todo material que Ud. considere necesario que utilizará en el proceso de este laboratorio deberá dejarlo listo durante esta sesión, sobretodo lo que deba dejarse estéril**

#### ***Curvas de Calibrado:***

La concentraciones de glucosa y sacarosa se relacionan con la absorbancia usando curvas de calibrado de ambas fuentes de carbono, la cual se obtiene aplicando el método del DNS a distintas soluciones de estos carbohidratos obtenidas por dilución de una solución estándar.

- Para el caso de la glucosa preparar 500 mL de una solución estándar de 1 g/L de glucosa.
- Para el caso de la sacarosa prepare 500 mL de una solución estándar de 1 g/L de sacarosa.

De cada una de las soluciones estándar realice una dilución seriada, de la siguiente forma:

- Tome 10 tubos de ensayo y enumérelos del 1 al 10.
- Al tubo N°1 agregue 1mL de solución y 9 mL de agua destilada, al N°2 2mL de solución y 8 mL de agua destilada y así sucesivamente hasta llegar al tubo N° 10.
- Posteriormente replique el método del DNS para cada solución. (recuerde que son curvas patrones que le permitirán evaluar la concentración exacta para una absorbancia dada)
- No olvide que para cada lectura debe generar un Blanco que corresponde a agua destilada como muestra y se le aplica todo el protocolo de la técnica.
- Al igual que en el seguimiento de la curva de consumo de sustrato para el caso del patrón de sacarosa debe generar la HIDRÓLISIS antes de realizar el DNS.

**NOTA:** Los protocolos para el DNS y para la HIDRÓLISIS se encuentran descritos en el punto en donde se explica cómo realizar el seguimiento de la curva de consumo de sustrato.(más abajo)

Día N°2:

***Inoculación:***

- Agregue a orilla de mechero a cada uno de los matraces (uno con glucosa y otro con sacarosa) 10 mL de un cultivo de *E. coli*.

**NOTA: Cada uno de los tubos de ensayo con cultivo contiene 10 mL.**

***Seguimiento de la Curva de Consumo de Sustrato:***

- Después haber inoculado, de cada matraz tome 1 mL (previa agitación) con una pipeta estéril y dispénselo en un tubo de ensayo (OJO cada matraz por separado, es decir se toma 1 mL del matraz que contiene glucosa como fuente de carbono y se agrega a 1 tubo de ensayo se repite lo mismo para el matraz que contiene sacarosa como fuente de carbono y energía y se agrega en OTRO tubo de ensayo.

**NOTA: No olvidar realizar este procedimiento a orilla del mechero.**

- Cubra ambos tubos con un trozo de parafilms, este corresponderá al tiempo 0 ( $T_0$ ) para cada cultivo.
- Lleve el matraz al agitador magnético (shaker) y comience la fermentación con 38°C y 200 r.p.m.
- Después de 15 min vuelva a tomar 1 ml de cada matraz y dispénselo en un tubo de ensayo (al igual que en el punto 2).
- Repita este proceso 8 veces respetando un tiempo de 15 min entre cada muestreo.

***Determinación del consumo de sustrato (método del DNS):***

1. En los tubos de ensayo que contienen 1 mL de muestra c/u tomados del matraz que tenía como fuente de carbono glucosa, tomadas a lo largo de la fermentación, agregue 1 mL de Reactivo DNS. Considere un tubo de blanco, que contiene 1 mL de agua destilada a modo de muestra.

2. Tape los tubos con parafilms y coloque en un baño de agua a ebullición durante 15 minutos.
3. Enfriar posteriormente en un baño de hielo por 5 minutos.
4. Agregar a cada tubo 10 mL de agua destilada.
5. Deje reposar por 15 min.
6. Luego de cada tubo realice una lectura a espectrofotómetro utilizando las celdas correspondientes a 540 nm, contra el blanco que preparó con agua destilada.
7. Registre la absorbancia dada para cada uno de los tubos.
8. Para el caso de las muestras tomadas del matraz que contenía sacarosa como fuente de carbono debe realizarse una previa hidrólisis de este disacárido ya que el reactivo DNS tiene como principio reaccionar con los azúcares reductores.
9. Para la hidrólisis de la sacarosa realice el siguiente protocolo.
10. A cada uno de los tubos que contienen las muestras que se tomaron a lo largo del tiempo del matraz que contenía como fuente de carbono a la sacarosa agregue 5 gotas de HCl 1 N.
11. Posteriormente cada tubo caliéntelo a mechero por 5 minutos y deje enfriar.
12. Después de frío neutralice cada tubo con 1mL de NaOH 0,5 N.
13. Después de haber hidrolizado la sacarosa, aplique la metodología del DNS ( repita para este set de tubos los pasos del 1-7)

## Guía de Laboratorio N° 3

### Fermentaciones Industriales, Elaboración de Yogurt por medio de Cultivo por Lotes

#### *Objetivo General:*

Seguimiento y comparación de dos fermentaciones homolácticas utilizando Lactosa y Sacarosa como fuentes de carbono y energía un inóculo iniciador con la finalidad de la obtención de Yogurt.

#### *Objetivos Específicos:*

- Obtención de los perfiles de consumo de glucosa y sacarosa Bacterianos.
- Obtención de las curvas de acidez a lo largo del tiempo.
- Comparación de fermentación experimental con un yogurt procesado industrialmente.
- Seguimiento de la cinética de producción de metabolitos primarios Acido Láctico.

#### **Actividades:**

##### **Día N°1:**

#### **Preparación de Cultivo Iniciador**

- o En 1 matraz de 500 mL de volumen previamente esterilizados agregue 200 mL de Leche Entera comercial, realice este proceso en forma aséptica, es decir, bajo cámara de flujo laminar o a orilla de mechero en la campana de esterilidad.
- o Agregue 12,5 g de sacarosa ( también bajo campana de flujo laminar), cierre el matraz herméticamente y aplique UHT ( hierva por 5 segundos)

- o Deje enfriar y posteriormente bajo campana de flujo laminar o mechero agregue el inóculo (Chamyto natural 70mL- 80g) el cual posee *Lactobacillus johnsonii* y *Lactobacillus helveticus* (6 a 9 millones).
- o Incube en agitador orbital a 40°C y 200 r.p.m. durante 4 días.
- o Retirar el matraz del agitador orbital y realizar una siembra homogénea en placa con agar MRS (por triplicado), es decir, en una placa a orilla de mechero o bajo campana de flujo laminar con una pipeta estéril de 1 mL, tomar 0,1mL y verterla sobre la placa, luego con el asa de Drigalsky (de rastrillo), esparcir homogéneamente por toda la placa.
- o Incubar las placas a 40°C en estufa, por 48 horas luego realizar el conteo de colonias de su inóculo.
- o El matraz restante refrigerar para realizar la elaboración de yogurt.
- o En el caso del yogurt el cultivo iniciador debe contener un mínimo de  $10^7$  CFU/gr.

**NOTA:** Como el cultivo iniciador debe estar 4 días en el agitador orbital no olvide que debe ir al Laboratorio y refrigerarlo es muy importante detener la fermentación para que se pueda continuar con los siguientes pasos además no olvide realizar la siembra señalada.

#### **Preparación de Material de Vidrio:**

- o Monte en un pipetero o en papel café con cinta de esterilización las pipetas de 1mL y de 10 mL que utilizará para el seguimiento de la curva.
- o **Nota:** Todo material que Ud. considere necesario que utilizará en el proceso de este laboratorio deberá dejarlo listo durante esta sesión, sobretodo lo que deba dejarse estéril

#### **Valoración de las materias Primas:**

La leche es uno de los componentes de mayor importancia en el medio de cultivo es por eso que a ésta deben realizársele diversas pruebas de Laboratorio que nos aseguren una buena fermentación.

A la leche que utilizará para sus fermentaciones debe realizarle las siguientes pruebas de laboratorio.

### 1. Acidez Titulable

La leche fresca tiene una acidez titulable equivalente a 13 a 20 [mL] de NaOH 0,1 [N/100 mL] (0,12 - 0,18 % ácido láctico) debido a su contenido de anhídrido carbónico, proteínas y algunos iones como fosfato, citrato, etc.

Realice una titulación de la Leche utilizando fenolftaleína como indicador para evaluar de acuerdo a lo descrito anteriormente.

### 2. pH

El pH normal de la leche fresca es de 6,5 - 6,7. Valores superiores generalmente se observan en leches mastíticas, mientras que valores inferiores indican presencia de calostro o descomposición bacteriana.

Realice una evaluación del pH de la leche a utilizar recuerde calibrar el pH metro antes de su uso.

### 3. Tiempo de reducción del azul de metileno

El potencial de óxido-reducción (Eh) de la leche fresca aireada es de +0,35 a +0,40 voltios (350 a 450 milivoltios), el cual se debe principalmente al contenido de oxígeno disuelto en el producto. Si por cualquier causa ese oxígeno es separado, el Eh disminuye. Esto ocurre cuando los microorganismos crecen en la leche y consumen el oxígeno. Si el número de microorganismos es muy elevado, el consumo de oxígeno será mayor y por consiguiente el Eh caerá rápidamente; si por el contrario, el número de microorganismos es pequeño, el Eh disminuirá lentamente. Utiliza como indicador de óxido-reducción el azul de metileno.

El tiempo en horas que tarda en pasar el azul de metileno de su forma oxidada (azul) a la reducida (incolora) bajo condiciones controladas es proporcional a la calidad sanitaria de la leche:

Buena a excelente: Más de 8 horas.

Regular a buena:            Entre 6 y 8 horas.

Aceptable:                    De 2 a 6 horas.

Mala:                            Menos de 2 hora.s

Debe tenerse presente que la anterior clasificación no siempre es apropiado ya que existen otros factores que pueden afectar al tiempo de reducción, entre ellos, el tipo de microorganismo, el número de leucocitos, el periodo de exposición a la luz, la cantidad de oxígeno disuelto y la tendencia de la leche a elevar los microorganismos hacia la superficie a medida que se va separando la crema en el tubo de prueba. Por otra parte, a medida que aumenta el número de leucocitos en la leche y su exposición a la luz natural o artificial, el tiempo de reducción tiende a reducirse, mientras que la agitación (al aumentar la cantidad de oxígeno disuelto) y la tendencia de la crema a ascender (arrastrando los microorganismos) son factores que tienden a retardar el tiempo de reducción.

En dos tubos de ensayo agregue 9mL de leche fresca y 1 mL de azul de metileno, analice sus resultados de acuerdo a lo descrito anteriormente.

### **Prueba de Lactofermentación**

Cuando una muestra de leche se incuba a la temperatura de 36 °C sufre un proceso de fermentación ocasionado por la flora presente en dicha muestra. Las características organolépticas del producto obtenido permiten hasta cierto punto establecer la calidad de leche original y clasificarla dentro de ciertas categorías como son:

*Líquida:* se mantienen en estado líquido, homogénea después de 24 horas. Corresponde a leche pobre en microorganismos, especialmente en gérmenes lactofermentadores. Se considera de óptima calidad.

*Gelatinosa:* presenta un aspecto de coágulo gelatinoso; corresponde a leche rica en gérmenes lactofermentadores con predominio de los *Lactococcus sp.* que producen la coagulación. El coágulo puede ser homogéneo y sin gas, o bien puede contener apenas pequeñas burbujas de gas. Se considera de calidad aceptable.

*Gaseosa con suero separado:* corresponde a una leche que ha sido coagulada pero luego se ha producido gas por gérmenes probablemente del grupo coliformes. Se considera pobre en calidad.

*Grumosa con gas:* corresponde a leche de mala calidad, en la cual ha ocurrido un proceso de coagulación por gérmenes lactofermentadores, con actividad considerable de gérmenes gasógenos del grupo coliformes y además enzimas, tipo cuajo.

*Con cuajada tipo queso:* se caracteriza por la formación de una cuajada bien definida, con separación completa del suero. Es ocasionada por la presencia de gran número de gérmenes que producen gran cantidad de enzimas tipo cuajo.

En tres tubos de ensayo agregue 10 mL de leche fresca a c/u cubra con una torula de gasa con algodón e incube bajo las condiciones descritas anteriormente

## **Día N°2:**

### ***Inoculación:***

- o A dos matraces de 500 mL previamente esterilizados, agregue a orilla de mechero o bajo campana de flujo laminar 250 mL de leche entera.
- o A uno de los matraces agregue 15 g de sacarosa y al otro 18 g de glucosa, cierre bien y agite para disolver y aplique UHT ( que cada matraz hierva por 5 segundos)
- o Deje enfriar y posteriormente agregue a cada uno de los matraces 50 mL del inóculo iniciador. ( el que refrigeró)

### ***Seguimiento de la curva de crecimiento y de producción de metabolitos primarios:***

- o Después haber inoculado, de cada matraz tome 5 mL (previa agitación) con una pipeta estéril y dispénselo en un tubo de ensayo (OJO cada matraz por separado, es decir, se toma 5 mL del matraz que contiene glucosa como fuente de carbono y se agrega a 1 tubo de ensayo se repite lo mismo para el matraz que contiene

sacarosa como fuente de carbono y energía y se agrega en OTRO tubo de ensayo.

**NOTA: No olvidar realizar este procedimiento a orilla del mechero.**

- o Cubra ambos tubos con un trozo de parafilm, este corresponderá al tiempo 0 ( $T_0$ ) para cada cultivo.
- o Lleve el matraz al agitador magnético (shaker) y comience la fermentación con 45°C y 200 r.p.m.
- o Después de 15 min vuelva a tomar 5 ml de cada matraz y dispénselo en un tubo de ensayo (al igual que en el punto 2).
- o Repita este proceso 8 veces respetando un tiempo de 15 min entre cada muestreo.

***Determinación de la curva de Acidez:***

1. En los tubos de ensayo que contienen 5 mL de muestra c/u tomados de los matraces, tomadas a lo largo de la fermentación, mida el pH.
2. Los resultados deberá expresarlos en pH v/s tiempo.

***Determinación de la cinética de producción de Ácido Láctico:***

1. Después de haber realizado la medición del pH, realice una titulación de cada una de las muestras con NaOH 0,1 N, utilizando fenolftaleína como indicador.
2. Exprese sus resultados en gr de Acido Láctico producidos en el tiempo.

## Guía de Laboratorio N° 4

### Fermentaciones Industriales, Elaboración de Aceto Balsámico por medio de Cultivo Continuo.

#### Objetivo General:

Seguimiento y producción de Aceto balsámico utilizando cepas de *Acetobacter aceti* en la modalidad de cultivo continuo.

#### Objetivos Específicos:

- Obtención de las curvas de acidez a lo largo del tiempo.
- Formación de biopelícula en soporte orgánico.
- Confección de fermentador de lecho escurrido.
- Comparación de fermentación experimental con un Aceto balsámico procesado industrialmente.
- Seguimiento de la cinética de producción de metabolitos secundarios Acido Acético.

#### Actividades:

Día N°1: 15 de Mayo 2008

#### Preparación de Medio de Cultivo:

- o Preparación de Medio de cultivo líquido para el inóculo iniciador del cultivo continuo.
- o Utilice los siguientes reactivos para la preparación del medio, cada grupo debe preparar 2 matraces con 225 mL de medio y luego llevar a esterilización.

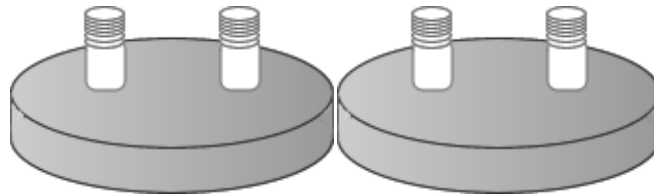
Nutrientes	Concentración (g/L)
Peptona	3
Extracto de Levadura	5
Manitol	25

### Preparación de Cultivo Iniciador

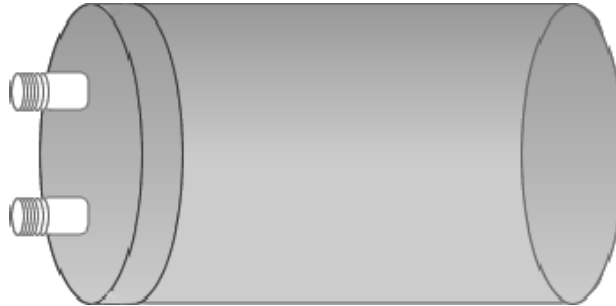
- o En el medio de cultivo previamente preparado, agregar a orilla de mechero o bajo campana de flujo laminar 25 mL de un cultivo puro de *Acetobacter aceti*, a cada matraz.
- o Cubrir los matraces de la luz con papel aluza e incubar a 30°C por 24 horas en agitador orbital a 200 r.p.m.
- o Posteriormente refrigere, para utilizarlo en el biorreactor.

### Armado y montaje biorreactor para cultivo Continuo:

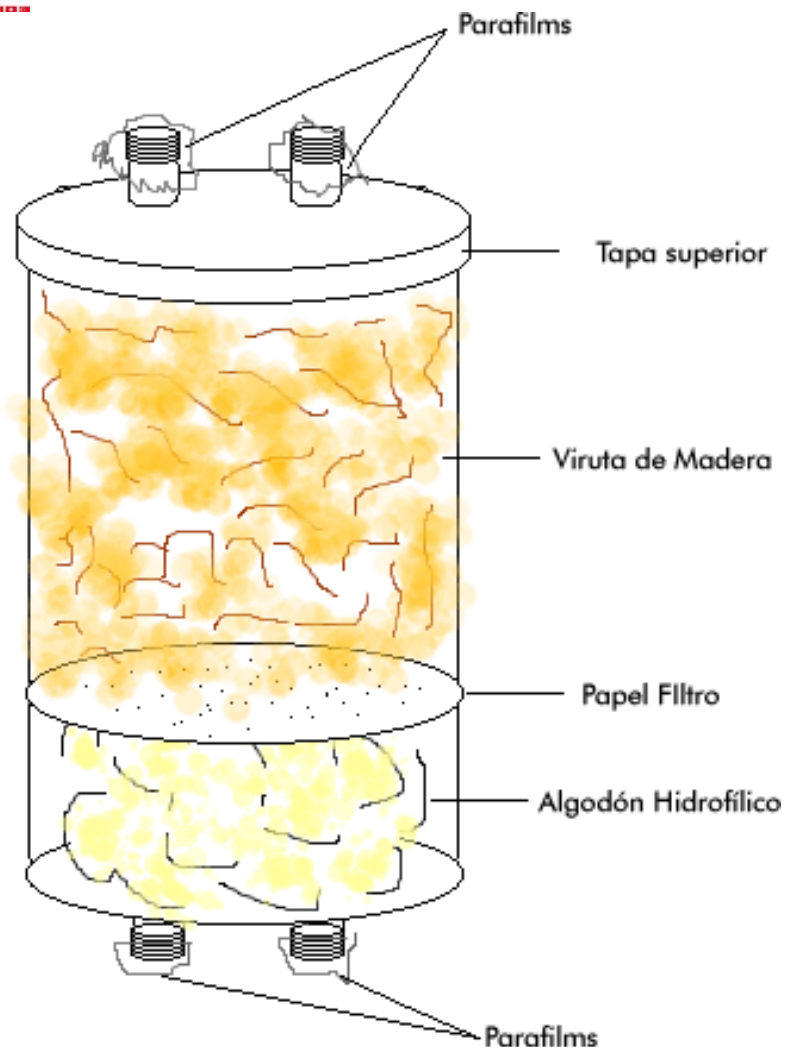
- o En las tapas de pvc sanitario, genere dos orificios equidistantes, en las que pueda colocarse posteriormente el terminal o niple.
- o Pegue con pegamento de pvc y/o silicona las tapas con los niples como se señala en el esquema.



- o Pegue con pegamento de pvc y/o silicona una de las tapas montadas al cilindro de pvc de 20 cm.



- o Limpie por el interior del tubo recién armado con alcohol al 70%, déjelo por 30 min dispuesto en forma vertical con la abertura hacia arriba en la campana de flujo laminar.
- o Paralelamente deje, la tapa superior, una mota de algodón hidrofílico (del porte de una mano), 1 papel filtro y 100 g de Viruta de madera previamente rociada con alcohol al 70%, bajo la campana de flujo laminar por 30 min.
- o Transcurrido el tiempo de esterilización, bajo la campana de esterilización, rellene su reactor en el siguiente orden, primero coloque el algodón (asegúrese de que llegue hasta el fondo), luego el papel filtro (si tiene que cortarlo al diámetro del cilindro realícelo antes de la esterilización) y finalmente la viruta de madera (no la compacte debe quedar holgada).
- o Finalmente cierre herméticamente su reactor.
- o Asegúrese de colocar un trozo de para films en las 4 entradas (dos en cada tapa) que posee el reactor.
- o Debe quedar un reactor en el siguiente orden.



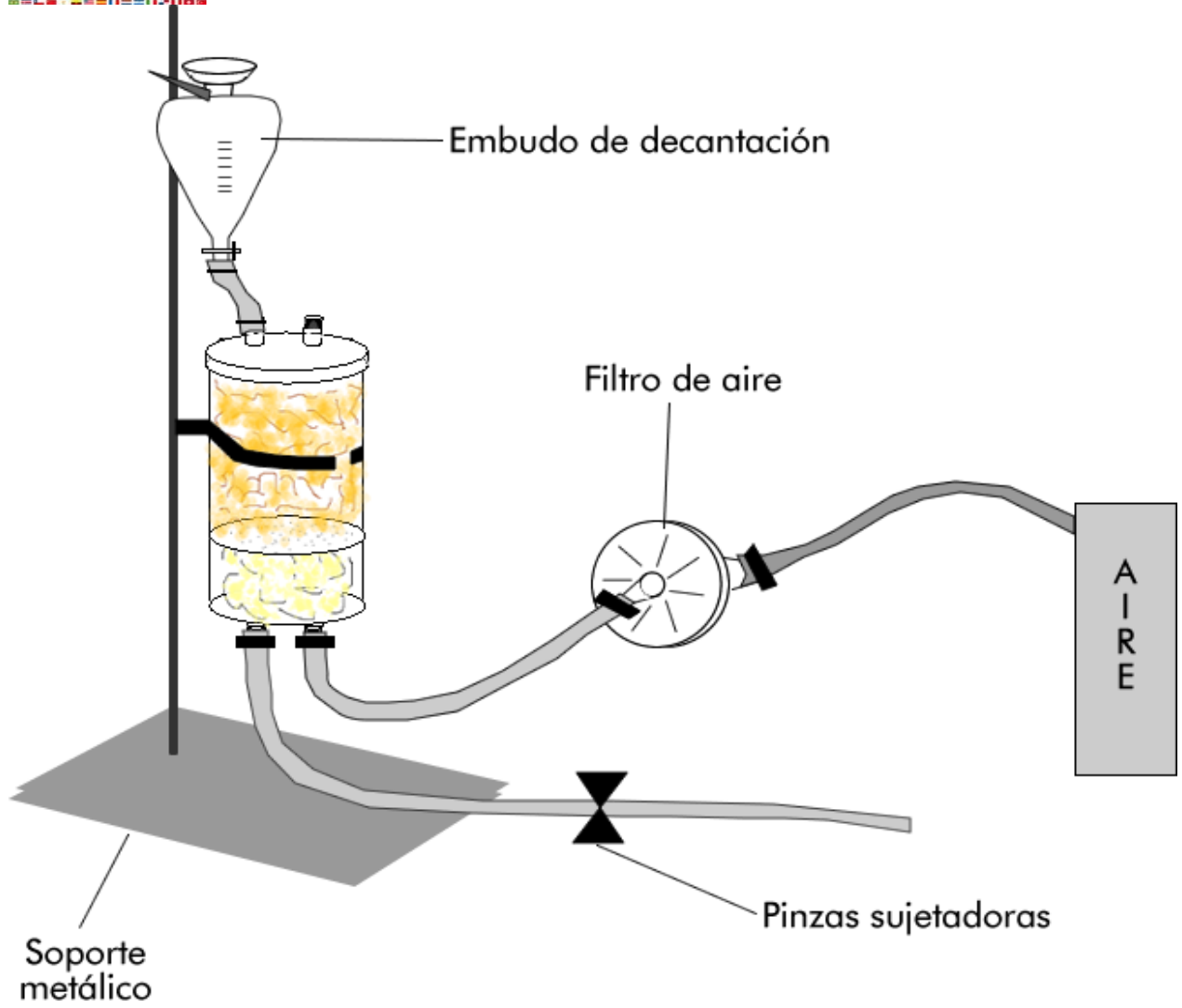
- o Marque con una flecha al costado del reactor la dirección del empaque interno, es decir, la parte de arriba es donde se encuentra la viruta y la de abajo donde está el algodón.
- o Guarde dentro de una bolsa ziploc, para el práctico siguiente.



Día N°2: 22 de Mayo 2008

### 1. Puesta en Marcha de fermentación:

- o En un soporte (donde se colocan las buretas), coloque su biorreactor recuerde que debe quedar las virutas de madera hacia arriba.
- o En la parte de abajo, tiene dos salidas en cada una de ellas coloque un trozo de manguera, previamente cebada en alcohol al 70%. Recuerde sacar el para films antes de colocarlas, realice este procedimiento cerca de un mechero para controlar la esterilidad.
- o El tamaño de las mangueras debe ser suficiente para que por un lado ingrese el aire al cultivo y por el otro lado pueda obtener su producto.
- o A una de las mangueras conecte, un filtro de aire y posteriormente al aireador de acuario o a la cañería de aire. Esta será la forma en que se mantendrá aireado su cultivo en el proceso.
- o A la otra manguera coloque una pinza asegurando de que no salga su cultivo.
- o Por la parte superior a una de las entradas conecte una manguera de 10 cm previamente cebada con alcohol, asegure con una abrazadera. Al reactor.
- o Sobre el reactor coloque un embudo de decantación previamente cebado con alcohol al 70%, por su parte inferior una a la manguera de entrada del cultivo.
- o Su reactor debe quedar de la siguiente forma:



- En el embudo de decantación agregue los dos matraces con el cultivo de *Acetobacter aceti* preparado la semana anterior, abra suavemente la llave de este y deje que ingrese a su fermentador, cuando realice este procedimiento intente acercar un mechero para evitar posible contaminación.
- Prenda el aireador o abra SUAVEMENTE el aire, esto permitirá que el cultivo se mantenga aireado.
- Paralelamente, prepare el medio alimentador del cultivo continuo de la siguiente forma; Bajo campana de flujo laminar o a orilla de mechero, en un matraz de 1L que contenga 250 mL de agua destilada estéril, agregue 750 mL de vino no azufrado (proporción de 1:4), ajuste pH a 7,0 con NaOH 0,1 N. Realice este ajuste solo si es necesario, utilice material esterilizado.
- Agregue la solución al embudo de decantación, tenga la precaución de tener la llave del embudo CERRADA, después que agrego todo el medio al embudo de decantación, comience a generar la alimentación a una velocidad de 0,01 mL/min (corresponde a una gota por min).
- Después de transcurrido 30 min se abrirá la salida, lo cual lo realizará de la siguiente forma; coloque un embudo de vidrio en un matraz de 500 mL, en el embudo coloque un papel filtro y sobre este introduzca la manguera de salida, intente regular con la pinza que posee, que también salga un flujo similar al de entrada, es decir, debe salir una gota por min.

## 2. Inicio del cultivo continuo y medición de la curva de acidez:

- A los 15 min de haberse iniciado la apertura de la salida (el cultivo continuo), tome una muestra y comience a realizar una curva de acidez.
- Tome al menos ocho puntos, para obtener su curva de pH v/s Tiempo en el cultivo.
- Compare con un Aceto balsámico comercial en términos de acidez.
- El grado de acidez del vinagre se podrá determinar, de modo aproximado, a partir del pH, relacionando éste con la constante de ionización del ácido ( $k_a = 1,8 \cdot 10^{-5}$ ), fácilmente programable en una hoja de cálculo.



## Formato Informe de Laboratorio:

### Formato de Entrega de Informe:

- Papel tamaño carta.
- Letra Arial 10.
- Márgenes 2 cm por cada lado.
- Los títulos y subtítulos deben ir en negrita.
- Escritura a espacio simple.
- El número total de hojas no debe sobrepasar las 15, incluyendo portada e índice.

### El informe debe incluir:

- 1) **Tapa:** (según el formato de Universidad de las Américas)
  - Título. (nombre de la guía)
  - Integrantes. (Nombre y apellidos)
  - Nombre docente: **Alejandra Arancibia D.**
  - Fecha de realización del práctico
- 2) **Índice.**
  - Especificar la página en la que se encuentra cada uno de los capítulos del informe.
- 3) **Introducción:**
  - Indicar el marco teórico del estudio realizado.
  - Especificar los objetivos generales y específicos del trabajo realizado.
- 4) **Materiales y Métodos:**
  - Presentar las actividades realizadas y los medios empleados en su desarrollo incluyendo fotos, gráficos, esquemas, láminas, etc. Citar la bibliografía consultada en el caso de ser necesario.
- 5) **Resultados y Discusiones:**
  - En esta parte se mostrar en forma de tablas todos los resultados de las mediciones realizadas.
  - Posteriormente realizar una breve discusión con fundamento teórico de lo observado en el laboratorio.
  - Ej. Si entre dos muestras problemas observó un cambio de color cual es el principio químico que lo hizo cambiar y mostrar ese tipo de reacción para lo cual debe utilizar bibliografía.
- 6) **Discusiones y recomendaciones:**



- Presentar las conclusiones obtenidas y posibles recomendaciones que el alumno pueda aportar.

## 7) Bibliografía:

Al final de cada informe se deberá detallar la bibliografía consultada en base al siguiente modelo.

- **Libros.**

**APELLIDO E INICIAL DEL NOMBRE DEL AUTOR 1; APELLIDO E INICIAL DEL NOMBRE AUTOR 2; APELLIDO E INICIAL DEL NOMBRE AUTOR 3; ETC.** Año de publicación. Título de la publicación. Editorial. Ciudad y país de publicación. \_\_ Pág. (páginas del texto).

Ej: Matissek, R., Schnepel, F. N. y Steiner, G. 1998. Análisis de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza, España.: pp. 1 y 229-232.

- **Revistas u otra publicación periódica:**

**APELLIDO E INICIAL DEL NOMBRE DEL AUTOR 1; APELLIDO E INICIAL DEL NOMBRE AUTOR 2; APELLIDO E INICIAL DEL NOMBRE AUTOR 3; ETC.** Año de publicación. Título de la publicación. EN REVISTA: Editorial. pp.: \_\_ - \_\_ (páginas citadas).

Ej: Mazziatelli, M., and A. Shubert. 1990. Effect of several VAM endophytes and artificial substrate on vitropropagated *Vitis berlandisi* x *rupestris* 1103. En revista: Agric. Ecosyst. Environ. 29:279-283.

- **Webibliografía:**

**APELLIDO E INICIAL DEL NOMBRE DEL AUTOR.** Disponible en: Página web.

SORIA A., Elia M., REYES E., Carlos, OCCEGUERA A., Zenaida *et al.* MICORRIZACIÓN DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE CAÑA DE AZÚCAR (*Sacharum officinarum*). *Agric. Téc.* [online]. oct. 2001, vol.61, no.4 [citado 02 Septiembre 2007], p.436-443. Disponible en la Web:

[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0365-28072001000400005&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-28072001000400005&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 0365-2807.

### NOTA:

No se aceptaran como bibliografía o fuente de información.



[www.google.cl](http://www.google.cl)  
[www.google.com](http://www.google.com)  
[www.rincondelvago.com](http://www.rincondelvago.com)  
[www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com)  
[www.yahoo.com](http://www.yahoo.com)  
[www.altavista.com](http://www.altavista.com)

Ni otro tipo de web de dudosa fuente

**Fecha de entrega: 29/Mayo/2008**

## Guía de Laboratorio N° 5

### Caracterización de un RIL

#### *Objetivo General:*

Caracterizar físicoquímica y biológicamente residuos líquidos industriales y domiciliarios.

#### *Objetivos Específicos:*

- Caracterizar y determinar la demanda bioquímica de oxígeno en un RIL industrial y uno domiciliario.
- Caracterizar y determinar la demanda química de oxígeno en un RIL industrial y uno domiciliario.
- Estimar los sólidos totales y volátiles en las muestras de RIL.

#### *Actividades:*

##### **1. Demanda bioquímica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>):**

Se mide el consumo de oxígeno disuelto en una muestra que tiene materia orgánica y células capaces de degradarla aeróbicamente. La determinación del oxígeno disuelto se realiza antes y después de incubar la muestra, en oscuridad, por 5 días a 20°C.

Si la muestra tiene alto contenido de materia orgánica la actividad bacteriana puede agotar el contenido de oxígeno de la muestra y la medición no tiene validez. Para evitar esto se procede a diluir la muestra con "Agua de dilución", la que representa un medio de cultivo para el adecuado desarrollo de los microorganismos. Por lo tanto esta agua proporciona los nutrientes necesarios para la actividad celular. Como se requiere apreciar un cambio notable en la concentración de oxígeno disuelto es recomendable saturar con aire la muestra y así tener la mayor medida posible de oxígeno al inicio del ensayo.

En la mayoría de los casos se requiere de un inóculo. Este puede obtenerse de los lodos aeróbicos y en este caso es necesario realizar un blanco de inóculo para descontar el aporte al consumo de oxígeno de la degradación de la materia orgánica que puede provenir de dicho inóculo.

Además debe considerarse ajuste del pH de las muestras si estas son ácidas o alcalinas. Para el análisis del DBO<sub>5</sub> el pH debe estar entre 6,5 y 7,5.

Si la muestra proviene de un proceso que ha sido sometido a un tratamiento de cloración, aun cuando no se detecte cloro residual, es conveniente utilizar agua de dilución con inóculo. Eliminar el cloro residual agregando sulfito de sodio para descomponer el cloro presente.

La verificación del método se realiza incubando una muestra estándar de DBO<sub>5</sub> conocida. Este estándar es una solución de glucosa-ácido glutámico de concentración conocida.

### **Preparación e incubación de las muestras:**

#### a) Ajuste del pH:

Si el pH del agua está fuera del rango de medición de DBO (6,5-7,5) se debe proceder a ajustar con soluciones ácido-base según corresponda.

- Solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N: 28 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 95-97% en 1 L de agua destilada.
- Solución de NaOH 1N: 40 g de NaOH en 1 L de agua destilada.

**NOTA: Dependiendo de que si su muestra este ácida o básica debe utilizar estas soluciones. Procurar que la muestra no se diluya más del 0,5%**

#### **DILUCIONES:**

En general dependiendo del origen de las muestras el contenido de DBO<sub>5</sub> varía considerablemente, se puede emplear el siguiente criterio para realizar las diluciones según el origen de la muestra.

- 0-1 % Residuos industriales con harta carga de materia orgánica.
- 0-5 % aguas servidas, cruda y sedimentada.
- 5-25 % Efluentes tratados biológicamente.
- 25-100% Agua natural o residuo industrial de bajo contenido orgánico.

Además debe considerarse que las diluciones que originan resultados confiables son aquellas en el oxígeno residual de la incubación es al menos 1 mg/L y el consumo de oxígeno es al menos 2 mg/L. por lo tanto para realizar las diluciones deben considerarse estos antecedentes.

b) Agua de Dilución:

**Solución 1:** Disolver en 500 mL de agua destilada, 8,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 21,75 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 33,4 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,7 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y luego completar a 1 L. El pH resultante debiera ser 7,2.

**Solución 2:** Disolver 22,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en 1L de agua destilada.

**Solución 3:** Disolver 27,5 g de  $\text{CaCl}_2$  en 1 L de agua destilada.

**Solución 4:** Disolver 0,25 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en 1 L de agua destilada.

### **Preparación:**

Se toma 1 mL de cada una de las soluciones y se completa con agua hasta 1L. Se satura de Oxígeno mediante agitación o burbujeo con aire filtrado, libre de sustancias orgánica.

### **Verificación:**

La verificación del método debe realizarse incubando una muestra de glucosa-glutámico 1:1 al 2% la DBO de este estándar debe ser  $198 \pm 30,5$  mg L.

### **Procedimiento para las diluciones:**

- A una botella de DBO de volumen conocido (300 mL) y que ya contiene agua de dilución, se agrega con una pipeta de punta ancha el volumen de la muestra.
- Se agrega un volumen conocido de inóculo y se llenan las botellas con agua de dilución. Usar el criterio antes señalado para lograr un nivel de dilución apropiado. Debe preparar dos diluciones.
- El llenado debe ser tal que la ubicación del tapón desplace todo el aire sin dejar burbujas. Se cubre el tapón con parafilms. Este procedimiento representa un sello de agua que evita la evaporación y la entrada de oxígeno atmosférico.
- En el caso de requerirse diluciones mayores a 100 se realizan diluciones seriadas, sucesivas, primero en 1 matraz y luego en la botella con el agua de dilución.
- Se preparan dos botellas de cada dilución.
- Se determina el oxígeno disuelto inicial de una de las botellas, la otra se incuba por 5 días a  $20^\circ\text{C}$ .
- Este procedimiento debe realizarse también para una muestra del inóculo (blanco del inóculo) que permite conocer la DBO del inóculo y para la solución de verificación.

- Además se realiza un blanco solo con agua de dilución cuya DBO no puede ser mayor a 0,2 mg/L.
- Por tanto cada grupo debe preparar dos botellas ( tiempo 0 y 5 días) para los siguientes casos:
  - 2 botellas con diluciones diferentes de muestra problema.
  - 1 botella para el blanco con agua de dilución.
  - 1 botella para el blanco del inóculo.
  - 1 botella para la muestra estándar. ( solución glucosa-glutámico)

c) Determinación del oxígeno disuelto:

a. Método de Winkler:

**Materiales:**

- Botellas de DBO.
- Estufa de incubación.
- Bureta graduada.

**Reactivos:**

- Solución de  $\text{MnSO}_4$  0,2 M: Disolver 240 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en agua destilada, filtrar y llevar a 500 mL.
- Solución de yoduro alcalino: Disolver 50 g de NaOH en 50 mL de agua destilada. Disolver 15 g de KI en 45 mL de agua destilada, mezclar y completar a 100 mL.
- Solución de almidón al 2% (p/v): Disolver a ebullición en 100 mL de agua destilada 2 g de almidón.
- Solución de tiosulfato de sodio 0,025N: Disolver 6,205 g de tiosulfato de sodio pentahidratado ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) y 0,4 g de NaOH en 1 L de agua. El tiosulfato de sodio se estandariza con  $\text{KIO}_3$ .
- Solución de yodato de potasio 0,01N: Disolver 0,3567 g de  $\text{KIO}_3$  en 1 L de agua destilada.

**Estandarización del tiosulfato:**

- A un matraz de erlenmeyer se agregan 10 mL de la solución patrón de  $\text{KIO}_3$ . Se agregan 20 mL de agua destilada, 1 g de KI y 1 mL de HCl concentrado. Titular con tiosulfato de sodio agregando almidón cerca del punto final.

**Procedimiento:**

- Se destapa la botella de DBO correspondiente y se agrega 1 mL de  $MnSO_4$  y 1 mL de KI.
- Se tapa la botella y se agita cuidadosamente invirtiéndola de manera sucesiva (se forma un precipitado amarillo).
- Se espera que decanten la tercera parte de los sólidos.
- Se agrega 1 o 1,5 mL de  $H_2SO_4$  concentrado, se agita con precaución por inversión hasta disolver el precipitado.
- Se deja reposar.
- Se titula 200 mL de muestra con tiosulfato de sodio (retirando 100 mL de la botella) usando almidón como indicador.

Cálculo:

$$OD(mg/L) = V * N * 8000 / 200$$

Donde:

V = volumen de tiosulfato de sodio gastado en la titulación. (mL)

N = Normalidad del tiosulfato de sodio.

**Muestra sin inóculo:**

$$DBO_5 (mg/L) O_2 = \frac{(OD_1 - OD_2)}{P}$$

**Muestra con inóculo:**

$$DBO_5 (mg/L) O_2 = \frac{(OD_1 - OD_2) - (B_1 - B_2) * f}{P}$$

Donde:

$OD_1$  = oxígeno disuelto en la muestra a tiempo 0 (mg/L).

$OD_2$  = oxígeno disuelto en la muestra a tiempo 5 (mg/L).

$B_1$  = oxígeno disuelto en el control del blanco a tiempo 0 (mg/L).

$B_2$  = oxígeno disuelto en el control del blanco a tiempo 5 (mg/L).

f = Proporción de inóculo entre la muestra y el control de inóculo. (% inóculo en la muestra diluida / % inóculo en el control).

P = Fracción volumétrica decimal de la muestra.

## 2. DQO ( Demanda química de oxígeno)

### Materiales:

- Tubos de digestión.
- Placa calefactora.
- Bureta graduada.

### Reactivos:

- **Solución digestora:**
  - o Disolver en 500 mL de agua destilada 10,216 g de  $K_2Cr_2O_7$ , 167 mL de  $H_2SO_4$  concentrado y 33,3 g de  $HgSO_4$  en cantidad proporcional a la concentración de cloro en la muestra. La relación es 10:1. Se completa con agua destilada a 1 L.
- **Solución catalítica:**
  - o Disolver en 1 L de  $H_2SO_4$  concentrado 10 g de  $AgSO_4$ , dejar reposar.
- **Solución de sulfato ferroso amoniacal (FA) 0,35N:**
  - o Disolver 13,72 g de  $Fe (NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$  en agua añadir 20 mL de ácido sulfúrico, enfriar y completar a 1 L de agua destilada.
- **Solución patrón de dicromato 0,05N:**
  - o Disolver 2,4516 g de  $K_2Cr_2O_7$  secado durante 2 horas a  $105^\circ C$  en 1 L de agua.
- **Indicador de Ferroína:**
  - o Disolver 1,485 g de 1-10 fenantrolina monohidrato con 0,695 g de  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$  en 100 mL de agua destilada.
- **Solución de ftalato ácido potásico:**
  - o Disolver 0,425 g de  $HOOC-C_6H_4COOK$  que debe ser secado previamente a  $105^\circ C$  hasta peso constante en 1 L de agua. Esta solución tiene una DQO de 500 mg/L.

### PROCEDIMIENTO:

- Colocar en un tubo 2,5 mL de muestra con una DQO inferior a 1000 mg  $O_2/L$ .
- Se prepara un blanco con agua destilada (2,5 mL)
- Se añade 1,5 mL de solución digestora.

- Se añade 3,5 mL de solución catalítica. Se procede escurriendo la solución por las paredes del tubo inclinado hasta que se formen dos fases.
- Tapar herméticamente y sellar los tubos con teflón y para film.
- Agitar los tubos sin tocar la tapa y colocarlos en la placa calefactora a 150°C, se mantienen 2 h.
- Valoración: se vacían los tubos a matraces se lavan los tubos con 2 mL de agua, y se agrega 1 gota de ferroína y se valora con FAS hasta cambio de color de azul a rojo.
- Se valora también el blanco.

### CALCULOS:

$$DQO(\text{mg}/L) = [(B - A) * 8000 * N_{FAS}] * \frac{fd}{V}$$

Donde:

- B = mL de FAS gastados en el blanco.
- A = mL de FAS gastados en la muestra.
- fd = Factor de dilución.
- V = Volumen de la muestra (2,5 mL)

NOTA: Medir DQO de muestra filtrada y sin filtrar.

### Estandarización de la Solución FAS.

5 mL de solución patrón de dicromato mas 3,5 mL de ácido sulfúrico concentrado mas ferroína, se titulan con la solución FAS.

$$N_{FAS} = \frac{N_d - V_d}{V_{FAS}}$$

Donde:

$N_d$  = Normalidad de la solución estándar de dicromato.

$V_d$  = Volumen de la solución estándar de dicromato adicionada a la muestra.

$V_{FAS}$  = Volumen de FAS usado para titular el blanco.

**Actividades:**

**3. Sólidos Totales (ST):**

**Materiales:**

- Capsula de porcelana.
- Estufa de secado.
- Desecadora.
- Balanza analítica.

**Procedimiento:**

- Secar y pesar la capsula. (A) g.
- Tomar 20 mL de muestra y poner en la capsula.
- Poner en estufa a 103°C dejar secar hasta peso constante (B) g.
- Enfriar en desecadora.
- Calcular por diferencia.

$$ST(mg/L) = \frac{(B - A) * 1000}{\text{volumen de la muestra}}$$

**4. Sólidos Volátiles (SV):**

**Materiales:**

- Muestra ST.
- Mufla.
- Desecadora.
- Balanza analítica.

**Procedimiento:**

- Tomar la capsula con los ST, registrar la masa en g (b) y ponerla en la mufla a 550°C, previa calcinación en mechero.
- Mantener hasta alcanzar peso constante.
- Enfriar en desecadora y pesar (C) g.
- Calcular por diferencia.

$$SV(mg/L) = \frac{(B - C) * 1000}{\text{volumen de la muestra}(L)}$$

**Sólidos fijos:**

$$SF(mg/L) = \frac{(C - A) * 1000}{\text{volumen de la muestra}(L)}$$

Donde

A = peso del crisol seco. (g)

C = peso del crisol + muestra seca incinerada (g).

**5. Sólidos suspendidos totales (SST):**

**Materiales:**

- Capsula de porcelana.
- Papel filtro de fibra de vidrio Whatman 934 AH.
- Equipo de filtración al vacío.
- Balanza analítica.
- Desecadora.

**Procedimiento:**

- Instalar correctamente el sistema de filtración.
- Colocar el filtro en el aparato de filtración, aplicar vacío y lavar con 3 porciones sucesivas de 20 mL de agua destilada.
- Continuar la succión para remover totalmente el agua y descartar el agua de lavado.
- Calcular por diferencia.

## Guía de Laboratorio N° 6

### Obtención de Amilasas Fúngicas

#### *Objetivo General:*

Generación de amilasas a partir de hongos productores de enzimas hidrolíticas del almidón.

#### *Objetivos Específicos:*

- Enriquecimiento y aislamiento a partir de leguminosas de hongos productores de enzimas hidrolíticas del almidón.
- Medición de la actividad enzimática en forma soluble.

#### *Actividades:*

##### **Aislamiento y Screening:**

- En tres placas de petri con medio sólido de agar YPD con 5% de NaCl y 0,01% de tetraciclina, a orilla de mechero o bajo la campana de flujo laminar, colocar en c/u 5 lentejas, colóquelas separadamente para que tenga una mayor amplitud de nutrientes los hongos.
- Incubar a 28°C por 7 días.
- De las colonias de hongos de color VERDE que crecieron sobre las placas, píquelas con un Asa Recta, tome un par de muestras y las repica (siembra en picadura) en 3 placas de Petri con YPD con 5%.
- Incubar a 28°C por 7 días.
- De las colonias aisladas, píquelas con un Asa Recta, tome un par de muestras y las repica (siembra en picadura) en 3 placas de Petri un medio sólido de almidón al 1% y agar al 1,5 %
- Incubar a 28°C por 4 días.
- Después del 4 días, saque de la incubadora coloque para films a su alrededor y reserve en el refrigerador.

**NOTA: Si observa poco crecimiento déjelas en la estufa hasta el siguiente laboratorio.**

- Los hongos productores de amilasas se detectan observando un halo de degradación del almidón presente como nutriente en el medio de cultivo (una circunferencia alrededor de la colonia).
- Confirme las colonias haciendo un revelado de la presencia de almidón agregando una solución de  $I_2/KI$  (0,026%  $I_2$  más 0,26% de  $KI$ ) que se acompleja con el polisacárido dando una coloración azul.
- De las colonias con actividad enzimática sobre el almidón, tomar asada con el Asa recta y sembrar en tubos con agar inclinado que contengan medio con 5% de salvado triturado y agar al 2%. (realice al menos 2-3 tubos por colonia).
- Incubar a 28°C durante 5 días.
- Las esporas que se generaron en cada tubo con agar inclinado, resuspéndalas en 5 mL de una solución acuosa de Sarkosyl 0,05% (Sal sódica y/o Sodio Lauroil Sarcosina).
- Inocular 1mL de la suspensión de esporas en matraces de erlenmeyer de 250 mL que contengan 5mL de agua destilada estéril y 5 g de Salvado.
- Incubar a 28°C por 5 días.

- Las enzimas extracelulares producidas en la fermentación del salvado por el hongo, extráigalas con 50 mL de NaCl al 1%.
- Agitar durante 30 min a T° ambiente.
- Filtrar con papel filtro a vacío y conservar el eluido.

### Medición de la actividad enzimática

- La actividad amilásica se determina utilizando almidón como sustrato.
- Cuantifique la desaparición del sustrato por espectrofotometría.
- Prepare una solución sustrato de almidón tamponada (0,05 % almidón, 0,15 M NaCl, 0,1 M acetato de sodio pH: 5.0).
- La reacción enzimática se detiene por el agregado de un revelador (0.006 % I<sub>2</sub> + 0.06 % KI en HCl 0.02 M) del almidón remanente en la solución de incubación.
- El iodo de la solución de I<sub>2</sub>/IK se acompleja con la amilosa nativa con su estructura tridimensional intacta.
- El complejo iodo-amilosa se cuantifica midiendo la absorbancia a 640 nm con un espectrofotómetro.
- La reacción consiste en incubar 10 µl de extracto enzimático con 0.5 ml de solución de sustrato.
- La incubación se realiza a 37°C durante 7.5 min. La reacción se detiene por el agregado de 4.5 ml de solución revelador y se mide la absorbancia a 640 nm.
- El protocolo se detalla a continuación:

Medición de actividad amilásica					
<i>Tubo N°</i>	<i>Extracto enzimático</i>	<i>Solución de sustrato</i>	<i>Incubación a 37°C</i>	<i>Solución reveladora</i>	<i>Absorbancia a 640 nm</i>
1-2	-	0.5 ml	7.5 min	4.5 ml	-
3-4	10 µl				-

La Unidad Amilolítica (UA) es la cantidad de enzima contenida en 100 ml de muestra, que puede hidrolizar 10 mg de almidón en 30 minutos, en las condiciones de la reacción. En esta técnica se incuban 10 µl de muestra con 0.25 mg de almidón contenidos en 0.5 ml de solución de sustrato durante 7 minutos y medio, lo que equivale a incubar 100 ml de muestra con 10.000 mg de almidón durante 30 minutos. Si todo el almidón fuera hidrolizado, la actividad amilásica de la muestra sería de 1000 UA/dl. Para obtener las unidades de actividad amilásica, la fracción de almidón digerido se multiplica por 1000.

Cálculo de los resultados:

$$\text{Amilasa UA / dl} = \frac{\text{Absorbancia(Tubos1 - 2)} - \text{Absorbancia(Tubos3 - 4)}}{\text{Absorbancia(Tubos1 - 2)}} * 1000$$

Ejemplo:

Absorbancia Tubo (1-2): 0.450

Absorbancia Tubo (3-4): 0.200

$$\frac{0.450 - 0.200}{0.450} * 1000 = 555 \text{ UA / dl}$$

Calcular las Unidades Amilolíticas por decilitro (UA/dl).

**No olvide expresar sus resultados gráficamente.**