



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**ESTUDIO DE LOS PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS DE
ACETIFICACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE VINAGRE DE
NARANJA Y VINAGRE DE ARÁNDANOS.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por: **Cristina Verónica Davies**

Dirigida por: **Dra. María Mercedes Ferreyra**

Dra. María Inmaculada Álvarez Cano

Dra. María José García Esparza

Septiembre de 2015

A mi hijo Agustín

A mis padres Myrta y Eduardo

A mis directoras Dra. María Mercedes Ferreyra, Dra. María Inmaculada Álvarez Cano y Dra. María José García Esparza, por haberme acompañado en este largo camino, por su paciencia, apoyo y confianza.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología:

- A Liliana, amiga y compañera en este aventura de trabajar con las bacterias del ácido acético, por compartir “bichos”, papers, equipos, logros y desánimos;*
- A Carina, que siempre estuvo dispuesta a colaborar con optimismo, sin importar los horarios o dificultades de la actividad;*
- A la Dra. María del Carmen Schvab, por sus imprescindibles contribuciones y permanente apoyo e insistencia para finalizar la Tesis;*
- A Verónica, Julio, Cristina (la tocaya), Andreína, con quienes compartimos proyectos de investigación, “vinos de naranja”, “vinagres de naranja y arándanos”, “espumantes de naranja”, mates, cumpleaños, risas y rabietas;*
- A los becarios que durante varios años me acompañaron en la ardua tarea diaria de trabajar con microorganismos.*

A la Dra. Luz Marina Zapata, como directora del Laboratorio de Análisis de Metales en Alimentos y otros Sustratos (LAMAS), por su valiosísima colaboración en tantos ensayos y manuscritos. Pero mi mayor reconocimiento es hacia ella, como amiga, de todo corazón, por estar siempre, cada vez que la necesito.

A la Dra. Flavia Perlo y a la Lic. Alicia Noceti por su imponderable colaboración en todo momento.

Al Ing. Jorge A. Gerard, por su gestión personal para el desarrollo de este Doctorado y brindarme, una vez más, una posibilidad de crecimiento profesional.

A todo el personal y autoridades de la Facultad de Ciencias de la Alimentación (UNER) por su generosa colaboración. En particular quiero

destacar al Prof. Daniel Sausto, quien siempre ágilmente, solucionó todos los desperfectos técnicos que se me presentaron.

A la Universidad Nacional de Entre Ríos, por el apoyo económico brindado a través del financiamiento de los proyectos de investigación, en cuyo marco se desarrollaron estas experiencias.

Para finalizar, la parte más sensible:

A mi hijo Agustín, mi razón de ser en la vida, mi gran orgullo, por ser un niño tan adulto y entender (muchas veces) los momentos que no le pude dedicar. A mis padres Myrta y Eduardo, por su apoyo permanente y amor incondicional que hicieron un poco más llevadero el esfuerzo de todos estos años. A mis hermanos y especialmente a mis sobrinitos, Catalina, Martina, Paulina y Bautista que con su dulzura, inocencia y alegría lograron, aunque sea por momentos, que olvide las preocupaciones de la Tesis.

A Dios y a la Virgen María por su intercesión, por todas las bendiciones que me ha dado en la vida.

Resumen
Summary
Resum

En la República Argentina, la provincia de Entre Ríos, se caracteriza desde hace décadas por la producción citrícola y más recientemente, por el cultivo de arándanos. En los últimos cinco años, un elevado porcentaje de la producción nacional de naranjas (15-25 %), muy similar al destinado a exportación, fue derivado a la industria por su dificultad para ser comercializado en mercados más rentables. Por otro lado, el incremento del volumen de arándanos no exportables, con baja presencia en el mercado interno de consumo en fresco, y las escasas posibilidades de industrialización, han provocado impactos socioeconómicos y ambientales desfavorables.

La industria vinagrera en Argentina se dedica a la elaboración de vinagres a partir de alcohol, vino blanco o tinto y manzana, mientras que no se tienen referencias de vinagres elaborados a partir de cítricos o de arándanos. A nivel mundial, hay algunos antecedentes bibliográficos respecto de vinagres de arándanos, sin embargo, no se halló información referente a vinagre de naranjas. Dada la elevada concentración de azúcares presente en ambos frutos (8-15 %), se planteó la posibilidad de obtener vinagres utilizando como sustratos, los productos de la fermentación alcohólica de naranjas y de arándanos. Además, considerando que estas materias primas son ricas en compuestos antioxidantes, se trataría del desarrollo de nuevos productos con características funcionales.

En el presente estudio se hicieron ensayos de acetificación en sistema sumergido, utilizando un sustrato alcohólico de naranjas y un sustrato alcohólico de arándanos, respectivamente. En todos los casos se usó como cultivo iniciador una especie del género *Acetobacter*, previamente aislada e identificada en el laboratorio de Biotecnología y Microbiología (Facultad de Ciencias de la Alimentación, Universidad Nacional de Entre Ríos, Argentina), en el cual se llevó a cabo esta investigación. Las condiciones iniciales fijadas en cada tratamiento fueron: pH, volumen del sustrato, concentración de alcohol y ácido acético. La temperatura se mantuvo constante en $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante todo el proceso.

Luego de un estudio preliminar acerca de la influencia de factores externos en la elaboración de vinagres, tales como velocidad de agitación (V_{ag}) y caudal de aire (Q_a), se redefinió la región experimental de trabajo con el fin de determinar las condiciones que maximicen la velocidad de acetificación (r_A) y el rendimiento GK (R_{GK}), en sistema discontinuo. Para ello se elaboró un diseño central compuesto, en el que se evaluaron V_{ag} , en los niveles 400 rpm y 800 rpm, y Q_a , en los niveles 0,6 L/min (0,3 vvm) y 1,2 L/min (0,6 vvm). El diseño se analizó mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR).

Los resultados de los ensayos de obtención de ambos tipos de vinagres indicaron que, V_{ag} y Q_a tuvieron influencia significativa sobre r_A , y V_{ag} presentó un efecto significativo sobre R_{GK} . Para vinagre de naranja, la combinación de variables de proceso que maximizaron ambas respuestas simultáneamente fue: 701 rpm y 0,36 vvm y, en estas condiciones, $r_A=2,28$ g/L/h y $R_{GK}=89,63$ %. El proceso de acetificación desarrollado según esos parámetros, presentó valores muy similares a los predichos: $r_A=2,29\pm 0,17$ g/L/h y $R_{GK}=88,19\pm 5,00$ %. Para vinagre de arándanos, la combinación de variables que maximizó ambas respuestas fue: 677 rpm y 0,38 vvm, en la que $r_A=1,53$ g/L/h y $R_{GK}=87,04$ %. El proceso de acetificación desarrollado según esos parámetros, presentó una $r_A=1,52\pm 0,06$ g/L/h y un $R_{GK}=85,16\pm 2,45$ %, también muy similares a los predichos.

Para ambos procesos biooxidativos se registró una disminución en r_A a elevados niveles de V_{ag} y Q_a (alrededor de 700 rpm y 0,4-0,6 vvm). Puesto que se verificó una elevada correlación lineal entre la velocidad de crecimiento microbiano (r_X) y r_A , la reducción detectada en esta última pudo ser consecuencia de la inhibición ejercida por una elevada concentración de oxígeno disuelto en el caldo de fermentación, sobre la velocidad de crecimiento específico de las bacterias del ácido acético (BAA).

De las diferencias halladas entre los procesos de obtención de ambos productos, se pueden mencionar una mayor r_A , mayor velocidad específica máxima de crecimiento (μ_M) y menor extensión de la fase lag durante la obtención de vinagres de naranjas, respecto de los registrados para vinagres de arándanos. Este comportamiento se puede atribuir, en primer lugar, a que la

especie de *Acetobacter* inoculada fue aislada a partir de naranjas por lo que pudo haber presentado mayor dificultad para adaptarse a un sustrato diferente. Por otro lado, las mayores concentraciones de compuestos fenólicos en los arándanos, podrían haber ejercido algún tipo de actividad inhibitoria hacia el crecimiento bacteriano.

Las condiciones experimentales que maximizaron r_A y R_{GK} en los procesos batch de cada tipo de vinagre, se utilizaron como variables de proceso para el estudio del proceso de acetificación en sistema semicontinuo. En este caso, la evaluación de la proporción de carga (C/D) indicó que no hubo diferencias estadísticas significativas en las variables respuestas, r_A y R_{GK} , para los dos niveles evaluados, 40 % y 60 %.

El desarrollo de un segundo ciclo oxidativo posibilitó el incremento de la velocidad de acetificación entre 2,2 y 2,9 veces respecto de la calculada en el primer ciclo. Este comportamiento seguramente se debió a la adaptación del cultivo bacteriano a las condiciones ambientales de elevada acidez predominantes al iniciar un nuevo ciclo oxidativo. No se determinaron diferencias estadísticas significativas en los rendimientos GK, lo que indicó que las pérdidas por evaporación se mantuvieron constantes durante el proceso.

Los vinagres de naranjas y de arándanos obtenidos en las mejores condiciones experimentales detalladas previamente, fueron embotellados y almacenados a temperaturas entre 20-25 °C, simulando condiciones de comercialización o alacena. La caracterización de estos vinagres se encuadró dentro de los estándares de calidad especificados para vinagres de frutas en las legislaciones argentina y española, incluso después de un período de maduración de seis meses.

Dada la importancia de los componentes antioxidantes presentes en las frutas de origen, se evaluaron las modificaciones que experimentaron a lo largo del proceso productivo. En general, se registró una disminución de estos compuestos y de su actividad antioxidante. La mayor contribución a la actividad antioxidante en vinagre de naranjas se debió al ácido ascórbico y compuestos fenólicos, mientras que en vinagres de arándanos, se debió a antocianinas y fenoles totales.

The province of Entre Ríos, in Argentina, has been characterized by citrus production for decades and more recently, by blueberry production. A high percentage (15-25 %) of Argentinian orange production, very similar to the exportable one, has been derived to industry due to the difficulty to commercialize in more profitable trades, in the last five years. In addition, the increasing volume of blueberries not suitable to export, with limited presence in the domestic market and few industrialization possibilities, has caused negative social, economical and environmental impacts.

Argentinian vinegar industry produces vinegars from alcohol, white and red wine and apple. However, the bibliography does not provide enough information about this product made from citrus or blueberries. Very few studies report on blueberry vinegars but nothing about vinegars produced from orange were found. Since both fruits possess high sugars content (8-15%), the possibility of making vinegar from alcoholic orange and blueberry substrates was evaluated. Furthermore, as these fruits are rich in bioactive compounds, new products with functional characteristics could be developed.

Submerged acetification assays were performed using both oranges and blueberries alcoholic substrates. A previously isolated and identified *Acetobacter* strain (Biotecnología y Microbiología laboratory, Facultad de Ciencias de la Alimentación, Universidad Nacional de Entre Ríos, Argentine), was utilized to prepare the starter culture. pH, substrate volume, ethanol and acetic acid concentrations were set for each treatment. The operation temperature was maintained within the range 30 ± 1 °C.

After a preliminary study on external acetification factors like agitation speed (V_{ag}) and air flow rate (Q_a), the experimental work area was redefined in order to determine the conditions that maximize both acetification rate (r_A) and GK yield (R_{GK}), in discontinuous culture. A central composite design was performed and levels evaluated were 400 rpm and 800 rpm for V_{ag} , and 0.6 L/min (0.3 vvm) and 1.2 L/min (0.6 vvm) for Q_a . Response surface methodology (MSR) was used to analyze this experimental design.

Results indicated that, both V_{ag} and Q_a had significant influence on r_A , and V_{ag} , on R_{GK} for all vinegars assays. With regard to orange vinegar, acetification rate and GK yield were maximized to the values of 2.28 g/L/h and 89.63 %, respectively, when V_{ag} was 701 rpm and Q_a , 0.36 vvm. The process performed with these parameters showed similar values to those predicted: $r_A=2.29\pm 0.17$ g/L/h y $R_{GK}=88.19\pm 5.00$ %. Concerning blueberry vinegar, acetification rate and GK yield were maximized to the values of 1.53 g/L/h and 87.04 %, respectively, when V_{ag} was 677 rpm and Q_a , 0.38 vvm. The process performed with these parameters showed similar values to those predicted: $r_A=1.52\pm 0.06$ g/L/h y $R_{GK}=85.16\pm 2.45$ %.

Acetification rate decreased at high V_{ag} and Q_a levels (around 700 rpm and 0.4-0.6 vvm) for both orange and blueberry vinegars. This r_A reduction may suggest a type of inhibition over specific growth rate caused by a high dissolved oxygen value, since a high linear correlation among r_A and microbial growth rate (r_X) was verified.

Higher acetification rate, higher maximum specific growth rate (μ_M) and shorter lag phase were observed in orange vinegar processes when compared to blueberry vinegar ones. This behavior may be firstly attributed to the *Acetobacter* strain as it was isolated from oranges which could have undergone adaptation difficulties to a different substrate. On the other hand, higher phenolics concentrations in blueberries than oranges might have exerted a type of microbial growth inhibition.

Each vinegar type experimental conditions that maximized r_A and R_{GK} in batch system were used as process variables to develop the semicontinuous acetification study. Substrate loading proportion (C/D) assessment showed no statistically significant differences in r_A and R_{GK} at both levels evaluated, 40 % and 60 %.

A second oxidative cycle allowed for 2.2 to 2.9-fold increase in the acetification rate, regarding the calculated in the first cycle. This behavior may have occurred due to bacteria adaptation to high acidity environmental conditions, at the beginning of a new cycle. No significant differences were

determined in R_{GK} , indicating evaporation losses remained constant during all the process.

Orange and blueberry vinegars obtained at previously determined best experimental conditions were bottled and maintained at 20-25 °C for simulating commercialization or kitchen cupboard conditions. Both vinegars characterization fit within Argentinian and Spanish fruit vinegars quality standards, even after a six months aging period.

Since orange and blueberry antioxidants compounds are of great importance, concentration changes were assessed during overall productive process. In general terms, a decrease of the aforementioned compounds as well as the associated antioxidant activity was registered. The major contributors to antioxidant activity were both ascorbic acid and phenolics compounds in orange vinegars, and anthocyanins as well as phenolics compounds in blueberry vinegars.

En la República Argentina, la provincia d'Entre Ríos, es caracteriza des de fa dècades per la producció cítrica i més recentment, pel cultiu de nabius. En els últims cinc anys, un elevat percentatge de la producció nacional de taronges (15-25 %), molt similar al destinat a exportació, va ser derivat a indústria per la seua dificultat per a ser comercialitzat en mercats més rendibles. D'altra banda, l'increment del volum de nabius no exportables, amb baixa presència en el mercat intern de consum en fresc, i les escasses possibilitats d'industrialització, han provocat impactes socioeconòmics i ambientals desfavorables.

La indústria vinagrera a Argentina, es dedica a l'elaboració de vinagres a partir d'alcohol, vi blanc o negre i poma, mentre que no es tenen referències de vinagres elaborats a partir de cítrics o de nabius. A nivell mundial, hi ha alguns antecedents bibliogràfics respecte de vinagres de nabius, no obstant açò, no es va trobar informació referent a vinagre de taronges. Donada l'elevada concentració de sucres present en ambdós fruits (8-15 %), es va plantejar la possibilitat d'obtenir vinagres utilitzant com a substrats, els productes de la fermentació alcohòlica de taronges i de nabius. A més, considerant que aquestes matèries primeres són riques en compostos antioxidants, es tractaria del desenvolupament de nous productes amb característiques funcionals.

En el present estudi es van fer assajos d'acetificació en sistema submergit, utilitzant un substrat alcohòlic de taronges i un substrat alcohòlic de nabius, respectivament. En tots els casos es va usar com a cultiu iniciador, una espècie del gènere *Acetobacter*, prèviament aïllada i identificada en el laboratori de Biotecnologia i Microbiologia (Facultad de Ciencias de la Alimentación, Universidad Nacional de Entre Ríos, Argentina), en el qual es va dur a terme aquesta recerca. Les condicions inicials fixades en cada tractament van ser: pH, volum del substrat, concentració d'alcohol i àcid acètic. La temperatura es va mantindre constant en $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ durant tot el procés.

Després d'un estudi preliminar sobre la influència de factors externs de l'elaboració de vinagres tals com, velocitat d'agitació (V_{ag}) i cabal d'aire (Q_a),

es va redefinir la regió experimental de treball amb la finalitat de determinar les condicions que maximitzen la velocitat d'acetificació (r_A) i el rendiment GK (RGK), en sistema discontinu. Per açò es va elaborar un disseny central compost, en el qual es van avaluar V_{ag} , en els nivells 400 rpm i 800 rpm, i Q_a , en els nivells 0,6 L/min (0,3 vvm) i 1,2 L/min (0,6 vvm). El disseny es va analitzar mitjançant la metodologia de superfície de resposta (MSR).

Els resultats dels assajos d'obtenció de ambdós tipus de vinagres van indicar que, V_{ag} i Q_a van tindre influència significativa sobre r_A , i V_{ag} va presentar un efecte significatiu sobre el rendiment GK. Per a vinagre de taronja, la combinació de variables de procés que van maximitzar ambdues respostes simultàniament va ser: 701 rpm i 0,36 vvm i, en aquestes condicions, $r_A=2,28$ g/L/h i $RGK=89,63$ %. El procés d'acetificació desenvolupat segons aqueixos paràmetres, va presentar valors molt similars als predits: $r_A=2,29\pm 0,17$ g/L/h i $RGK=88,19\pm 5,00$ %. Per a vinagre de nabius, la combinació de variables que va maximitzar ambdues respostes va ser: 677 rpm i 0,38 vvm, en la qual $r_A=1,53$ g/L/h i $RGK=87,04$ %. El procés d'acetificació desenvolupat segons aqueixos paràmetres, va presentar una $r_A=1,52\pm 0,06$ g/L/h i un $RGK=85,16\pm 2,45$ %, també molt similars als predits.

Per ambdós processos biooxidatius es va registrar una disminució en r_A a elevats nivells de V_{ag} i Q_a (al voltant de 700 rpm i 0,4-0,6 vvm). Ja que es va verificar una elevada correlació lineal entre la velocitat de creixement microbià (r_X) i r_A , la reducció detectada en aquesta última va poder ser conseqüència de la inhibició exercida per un excés en la concentració d'oxigen dissolt en el líquide de fermentació, sobre la velocitat de creixement específic de les bacteris de l'àcid acètic (BAA).

De les diferències trobades entre els processos d'obtenció de ambdós productes, es poden esmentar una major r_A , major velocitat específica màxima de creixement (μ_M) i menor extensió de la fase lag durant l'obtenció de vinagres de taronges, respecte dels registrats per a vinagres de nabius. Aquest comportament es pot atribuir, en primer lloc, al fet que l'espècie d'*Acetobacter* inoculada va ser aïllada a partir de taronges pel que va poder haver presentat major dificultat per a adaptar-se a un substrat diferent. D'altra banda, les majors

concentracions de compostos fenòlics en els nabius, podrien haver exercit algun tipus d'activitat inhibidora cap al creixement bacterià.

Les condicions experimentals que van maximitzar r_A i RGK en els processos batch de cada tipus de vinagre, es van utilitzar com a variables de procés per a l'estudi del procés d'acetificació en sistema semicontinu. En aquest cas, l'avaluació de la proporció de càrrega (C/D) en sistema semicontinu va indicar que no va haver-hi diferències estadístiques significatives en les variables respostes, r_A i RGK, per als dos nivells avaluats, 40 % i 60 %.

El desenvolupament d'un segon cicle oxidatiu, va possibilitar l'increment de la velocitat d'acetificació entre 2,2 i 2,9 vegades respecte de la calculada en el primer cicle. Aquest comportament segurament es va deure a l'adaptació del cultiu bacterià a les condicions ambientals d'elevada acidesa predominants en iniciar un nou cicle oxidatiu. No es van determinar diferències estadístiques significatives en els rendiments GK, la qual cosa va indicar que les pèrdues per evaporació es van mantenir constants durant el procés.

Els vinagres de taronges i de nabius obtinguts en les millors condicions experimentals detallades prèviament, van ser embotellats i emmagatzemats a temperatures entre 20-25 °C, simulant condicions de comercialització o armari de rebost. La caracterització d'aquests vinagres es va enquadrar dins dels estàndards de qualitat especificats per a vinagres de fruites en les legislacions argentina i espanyola, fins i tot després d'un període de maduració de 6 mesos.

Donada la importància dels components antioxidants presents en les fruites d'origen, es van avaluar les modificacions que van experimentar al llarg del procés productiu. En general, es va registrar una disminució d'aquests compostos i de la seua activitat antioxidant. La major contribució a l'activitat antioxidant en vinagre de taronges es va deure a l'àcid ascòrbic i compostos fenòlics, mentre que en vinagres de nabius, es va deure a les antocianinas i fenols totals.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Origen del vinagre	2
I.2. Bacterias del ácido acético	4
I.2.1. Características generales	4
I.2.2. Taxonomía.....	6
I.2.3. Metabolismo	8
I.3. Sistemas de producción de vinagre	14
I.3.1. Sistemas de acetificación	15
I.3.2. Sistemas de alimentación.....	21
I.4. Factores involucrados en la fermentación acética.....	22
I.4.1. Sustrato	23
I.4.2. Concentración de oxígeno disuelto.....	25
I.4.3. Temperatura	27
I.5. Operaciones posteriores al proceso fermentativo.....	28
I.6. Mercado de vinagres	30
I.7. Mercado de frutas cítricas.....	32
I.8. Mercado de arándanos	35
I.9. Bibliografía.....	37

II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

II.1. Objetivos generales.....	51
II.2. Objetivos específicos	52
II.3. Plan de trabajo.....	52

PRIMERA PARTE: CULTIVO INICIADOR**CAPÍTULO 1. Selección del cultivo iniciador.**

1.1. Introducción	57
1.2. Materiales y Métodos.....	58
1.2.1. Bacterias acéticas.....	58
1.2.2. Medios de cultivo	58
1.2.3. Sistemas de aireación	59
1.2.4. Métodos analíticos.....	60
1.2.5. Tratamiento estadístico	61
1.3. Resultados y Discusión.....	61
1.3.1. <i>Gluconacetobacter</i> sp.....	61
1.3.2. <i>Acetobacter</i> sp.....	64
1.3.3. <i>Acetobacter aceti</i>	66
1.4. Conclusiones	70
1.5. Bibliografía.....	70

SEGUNDA PARTE: VINAGRE DE NARANJAS**CAPÍTULO 2. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema discontinuo.**

2.1. Introducción	75
2.2. Materiales y Métodos.....	77
2.2.1. Materia prima.....	77
2.2.2. Proceso general de obtención de vinagre de naranjas.....	78
2.2.2.1. Acondicionamiento del sustrato alcohólico	79
2.2.2.2. Inoculación.....	79
2.2.2.3. Acetificación.....	80

2.2.2.3.1. Desarrollo del proceso de acetificación en sistema discontinuo (batch)	81
2.2.2.4. Envasado. Maduración. Clarificación. Filtración	82
2.2.3. Diseños estadísticos experimentales.....	82
2.2.3.1. Estudio preliminar del proceso de acetificación. Diseño factorial	83
2.2.3.2. Determinación de las mejores condiciones de acetificación	85
2.2.4. Determinación de parámetros cinéticos.....	87
2.2.4.1. Relación entre velocidad de crecimiento bacteriano y velocidad de acetificación	87
2.2.4.2. Velocidad específica máxima de crecimiento bacteriano (μ_M)	88
2.2.5. Técnicas analíticas	89
2.2.6. Tratamiento estadístico	91
2.2.6.1. Diseño factorial 2^2	91
2.2.6.2. Obtención de las mejores condiciones de acetificación.....	92
2.2.6.3. Análisis de regresión.....	93
2.3. Resultados y Discusión.....	93
2.3.1. Caracterización del vino de naranja.....	93
2.3.2. Análisis del diseño factorial 2^2	94
2.3.2.1. Velocidad de acetificación	97
2.3.2.2. Rendimiento GK	99
2.3.3. Determinación de las mejores condiciones de proceso.....	101
2.3.3.1. Velocidad de acetificación	103
2.3.3.2. Rendimiento GK	105

2.3.3.3. Combinación de factores que optimizan ambas respuestas	107
2.3.4. Desarrollo del proceso de acetificación optimizado.....	108
2.3.5. Determinación de parámetros cinéticos.....	109
2.3.5.1. Relación entre velocidad de crecimiento bacteriano y velocidad de acetificación	109
2.3.5.2. Velocidad específica máxima de crecimiento bacteriano (μ_M)	112
2.4. Conclusiones	113
2.5. Bibliografía.....	115
CAPÍTULO 3. Acetificación de sustrato alcohólico de naranjas en sistema semicontinuo.	
3.1. Introducción	120
3.2. Materiales y Métodos.....	121
3.2.1. Preparación del cultivo iniciador de <i>Acetobacter</i> sp.	121
3.2.2. Acondicionamiento del sustrato alcohólico para la fermentación acética.....	121
3.2.3. Equipo de acetificación.....	122
3.2.4. Desarrollo del proceso de acetificación en sistema semicontinuo	123
3.2.5. Tratamiento estadístico	125
3.3. Resultados y Discusión.....	125
3.4. Conclusiones	133
3.5. Bibliografía.....	134
CAPÍTULO 4. Caracterización de vinagre de naranjas.	
4.1. Introducción	138
4.2. Materiales y Métodos.....	141

4.2.1. Evaluación de componentes antioxidantes.....	141
4.2.2. Caracterización del vinagre de naranja	142
4.2.3. Técnicas analíticas	143
4.2.4. Tratamiento estadístico	147
4.3. Resultados y Discusión.....	148
4.3.1. Evaluación de componentes antioxidantes.....	148
4.3.1.1. Ácido ascórbico	148
4.3.1.2. Fenoles totales (FT)	149
4.3.1.3. Carotenoides totales.....	150
4.3.1.4. Actividad antioxidante (AA).....	150
4.3.2. Caracterización del vinagre de naranjas.....	152
4.3.2.1. Acidez.....	154
4.3.2.2. pH	155
4.3.2.3. Densidad	155
4.3.2.4. Extracto seco.....	156
4.3.2.5. Cenizas.....	156
4.3.2.6. Azúcares reductores totales	157
4.3.2.7. Etanol remanente	157
4.4. Conclusiones	158
4.5. Bibliografía.....	159

TERCERA PARTE: VINAGRE DE ARANDANOS

CAPÍTULO 5. Acetificación de sustrato alcohólico de arándanos en sistema discontinuo.

5.1. Introducción	167
5.2. Materiales y métodos.....	169

5.2.1. Proceso general de obtención de vinagre de arándanos.....	169
5.2.1.1. Fermentación alcohólica.....	169
5.2.1.2. Acetificación del sustrato alcohólico de arándanos	171
5.2.1.3. Envasado. Maduración. Clarificación. Filtración.	174
5.2.2. Diseño experimental.	174
5.2.3. Determinación de parámetros cinéticos.....	176
5.2.3.1. Relación entre velocidad de crecimiento bacteriano y velocidad de acetificación.	176
5.2.3.2. Velocidad específica máxima de crecimiento bacteriano (μ_M)	176
5.2.4. Técnicas analíticas	177
5.2.5. Tratamiento estadístico	178
5.2.5.1. Obtención de las mejores condiciones de acetificación....	178
5.2.5.2. Análisis de regresión.....	179
5.3. Resultados y Discusión.....	180
5.3.1. Caracterización de la materia prima, sustrato destinado a vinificación y mosto alcohólico de arándanos.....	180
5.3.2. Determinación de las mejores condiciones de acetificación.....	181
5.3.2.1. Velocidad de acetificación	182
5.3.2.2. Rendimiento GK	185
5.3.2.3. Combinación de factores que optimizan ambas respuestas	187
5.3.3. Desarrollo del proceso de acetificación optimizado.....	188
5.3.4. Determinación de parámetros cinéticos.....	190
5.3.4.1. Relación entre velocidad de crecimiento microbiano (r_X) y velocidad de acetificación (r_A)	190

5.3.4.2. Velocidad específica máxima de crecimiento bacteriano (μ_M)	193
5.4. Conclusiones	197
5.5. Bibliografía.....	198
CAPÍTULO 6. Acetificación de sustrato alcohólico de arándanos en sistema semicontinuo.	
6.1. Introducción	204
6.2. Materiales y Métodos.....	204
6.2.1. Preparación del cultivo iniciador de <i>Acetobacter</i> sp.	204
6.2.2. Desarrollo del proceso de acetificación en sistema semicontinuo.	205
6.2.3. Tratamiento estadístico	209
6.3. Resultados y Discusión.....	209
6.4. Conclusiones	216
6.5. Bibliografía.....	217
CAPÍTULO 7. Caracterización de vinagre de arándanos.	
7.1. Introducción	220
7.2. Materiales y Métodos.....	223
7.2.1. Evolución de componentes antioxidantes.....	223
7.2.2. Caracterización del vinagre de arándanos	224
7.2.3. Técnicas analíticas	226
7.2.4. Tratamiento estadístico.	229
7.3. Resultados y Discusión.....	230
7.3.1. Evolución de componentes antioxidantes.....	230
7.3.1.1. Antocianinas Totales.	231
7.3.1.2. Fenoles Totales.	232

7.3.1.3. Actividad antioxidante (AA).....	234
7.3.2. Caracterización del vinagre de arándanos.	236
7.3.2.1. Acidez.....	237
7.3.2.2. pH	238
7.3.2.3. Densidad	238
7.3.2.4. Extracto seco. Azúcares reductores totales. Cenizas totales	239
7.3.2.5. Etanol residual.....	239
7.4. Conclusiones	239
7.5. Bibliografía.....	240
III. CONCLUSIONES GENERALES	247

Figura I.1. Vías metabólicas de la asimilación oxidativa del etanol: ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y del glioxilato vía acetil-CoA.	9
Figura I.2. Representación esquemática del metabolismo de los carbohidratos por las BAA.....	12
Figura I.3. Esquema de los sistemas antiguos de fabricación de vinagre: a) Método de Orléans. b) Método Luxemburgués. c) Método alemán o Schutzenbach.....	16
Figura I.4. Esquema de Acetator FRINGS.....	19
Figura I.5. Representación esquemática de factores que afectan el proceso de acetificación.....	23
Figura I.6. Volumen de exportaciones e importaciones de vinagres y sucedáneos.....	31
Figura I.7. Distribución de la actividad citrícola en la República Argentina.....	32
Figura I.8. Zonas productoras de naranjas en la República Argentina.	33
Figura I.9. Zonas productoras de arándanos en la República Argentina.	35
Figura I.10. Principales ciudades productoras de arándanos en Argentina.....	36
Figura 1.1. Agitador orbital (shaker).	59
Figura 1.2. Sistema de inyección de aire.....	59
Figura 1.3. Curva de crecimiento de <i>Gluconacetobacter</i> sp. en diferentes sistemas de cultivo.	62
Figura 1.4. Evolución de acidez total en diferentes sistemas de cultivo inoculados con <i>Gluconacetobacter</i> sp.....	64
Figura 1.5. Curva de crecimiento de <i>Acetobacter</i> sp. en diferentes sistemas de cultivo.....	65

Figura 1.6. Evolución de acidez total en diferentes sistemas de cultivo inoculados con <i>Acetobacter</i> sp.....	66
Figura 1.7. Curva de crecimiento de <i>Acetobacter aceti</i> en diferentes sistemas de cultivo.....	68
Figura 1.8. Evolución de acidez total en diferentes sistemas de cultivo inoculados con <i>Acetobacter aceti</i>	68
Figura 2.1. Diagrama de flujo de elaboración de vinagre de naranja	78
Figura 2.2. Biorreactor New Brünswick Cientific Co., Modelo Bioflo 2000, utilizado en las experiencias.....	81
Figura 2.3. Evolución de la acidez total durante la bioxidación de un sustrato alcohólico de naranjas utilizando <i>Acetobacter</i> sp. en cultivo batch.	96
Figura 2.4. Interacciones entre velocidad de agitación y caudal de aire sobre la velocidad de acetificación, durante la bioxidación de un sustrato alcohólico de naranjas, utilizando <i>Acetobacter</i> sp. en cultivo batch.	97
Figura 2.5. Evolución de los recuentos celulares durante la bioxidación de un sustrato alcohólico de naranja utilizando <i>Acetobacter</i> sp. en cultivo batch.	98
Figura 2.6. Interacciones entre velocidad de agitación y caudal de aire sobre el rendimiento GK, durante la bioxidación de un sustrato alcohólico de naranja, utilizando <i>Acetobacter</i> sp. en cultivo batch.....	100
Figura 2.7. Rendimiento GK de vinagres de naranja obtenidos en cultivo batch con <i>Acetobacter</i> sp. para cada tratamiento y su réplica.	101
Figura 2.8. Superficie de respuesta estimada para velocidad de acetificación durante la producción de vinagre de naranja.....	104
Figura 2.9. Región de la superficie de respuesta donde se maximiza la velocidad de acetificación para vinagre de naranja.....	105

Figura 2.10. Superficie de respuesta estimada para rendimiento GK durante la producción de vinagre de naranja.	106
Figura 2.11. Región de la superficie de respuesta donde se maximiza el rendimiento GK para vinagre de naranja.....	107
Figura 2.12. Región de la superficie de respuesta donde se maximizan ambas repuestas para vinagre de naranja (gráfico de contornos superpuestos).....	108
Figura 2.13. Acetificación de sustrato alcohólico de naranjas en sistema discontinuo según parámetros optimizados (700 rpm/0,36 vvm): media de acidez total (g/L ácido acético) y media de ln RC (ln de recuento bacteriano) en función del tiempo de proceso.....	109
Figura 2.14. Concentración celular (X) vs. densidad óptica (DO) a $\lambda=540$ nm, durante la acetificación de un sustrato alcohólico de naranjas con <i>Acetobacter</i> sp.....	110
Figura 2.15. Velocidad de crecimiento microbiano (r_x) vs. velocidad de acetificación (r_A) para acetificación de un sustrato alcohólico de naranjas.....	112
Figura 3.1. Equipo de acetificación en sistema semicontinuo.	122
Figura 3.2. Esquema de elaboración de vinagre de naranja en sistema semicontinuo.	124
Figura 3.3. Evolución del crecimiento microbiano y la acidez total para la acetificación de vino de naranja en proceso semicontinuo con 40 % de carga/descarga (C/D).	126
Figura 3.4. Evolución del crecimiento microbiano y la acidez total para la acetificación de vino de naranja en proceso semicontinuo con 40 % de carga/descarga (C/D), (réplica).	127
Figura 3.5. Evolución del crecimiento microbiano y la acidez total para la acetificación de vino de naranja en proceso semicontinuo con 60 % de carga/descarga (C/D).	127

Figura 3.6. Evolución del crecimiento microbiano y la acidez total para la acetificación de vino de naranja en proceso semicontinuo con 60 % de carga/descarga (C/D), (réplica).	128
Figura 3.7. Evolución de la acidez total durante la acetificación de un sustrato alcohólico de naranja en proceso semicontinuo	131
Figura 4.1. Esquema de toma de muestras para la caracterización del vinagre de naranjas.	143
Figura 5.1. Diagrama de flujo de elaboración de vinagre de arándanos.	170
Figura 5.2. Biorreactor New Brünswick Cientific Co., Modelo Bioflo 2000, utilizado en las experiencias de acetificación de sustrato alcohólico de arándanos.	173
Figura 5.3. Superficie de respuesta estimada para velocidad de acetificación durante la producción de vinagre de arándanos.	184
Figura 5.4. Región de la superficie de respuesta donde se maximiza la velocidad de acetificación para vinagre de arándanos.	185
Figura 5.5. Superficie de respuesta estimada para rendimiento GK durante la producción de vinagre de arándanos	186
Figura 5.6. Región de la superficie de respuesta donde se maximiza el rendimiento GK para vinagre de arándanos.	187
Figura 5.7. Región de la superficie de respuesta donde se maximizan ambas repuestas para vinagre de arándanos (gráfico de contornos superpuestos).	188
Figura 5.8. Acetificación de mosto alcohólico de arándanos en sistema discontinuo según parámetros optimizados (677 rpm/0,38 vvm): media de acidez total (g/L ácido acético) y media de ln RC (ln de recuento bacteriano) en función del tiempo de proceso.	190
Figura 5.9. Concentración celular vs. recuento celular (RC) de <i>Acetobacter</i> sp. durante acetificación de sustrato alcohólico de arándanos.	191

Figura 5.10. Velocidad de crecimiento microbiano (r_x) vs. velocidad de acetificación (r_A) para acetificación de sustrato alcohólico de arándanos.....	193
Figura 6.1. Equipo de acetificación de sustrato alcohólico de arándanos en sistema semicontinuo.....	206
Figura 6.2. Esquema de elaboración de vinagre de arándanos en sistema semicontinuo.....	208
Figura 6.3. Evolución del crecimiento microbiano y la acidez total durante acetificación de un sustrato alcohólico de arándanos en proceso semicontinuo con 40 % de carga/descarga (C/D).....	210
Figura 6.4. Evolución del crecimiento microbiano y la acidez total durante acetificación de un sustrato alcohólico de arándanos en proceso semicontinuo con 40 % de carga/descarga (C/D), (réplica).....	210
Figura 6.5. Evolución del crecimiento microbiano y la acidez total durante la acetificación de un sustrato alcohólico de arándanos en proceso semicontinuo con 60 % de carga/descarga (C/D).....	211
Figura 6.6. Evolución del crecimiento microbiano y la acidez total durante la acetificación de un sustrato alcohólico de arándanos en proceso semicontinuo con 60 % de carga/descarga (C/D), (réplica).....	211
Figura 6.7. Evolución de la acidez total durante acetificación de sustrato alcohólico de arándanos en proceso semicontinuo.....	215
Figura 7.1. Estructura general de las antocianinas.....	221
Figura 7.2. Esquema de toma de muestras (TM) para caracterización del vinagre de arándanos.....	225

Tabla I.1. Organización actual de géneros de BAA.	7
Tabla I.2. Destino de la producción de naranjas en la República Argentina.....	34
Tabla 1.1. Crecimiento y velocidad de acetificación de <i>Gluconacetobacter</i> sp.	61
Tabla 1.2. Crecimiento y velocidad de acetificación de <i>Acetobacter</i> sp... ..	65
Tabla 1.3. Crecimiento y velocidad de acetificación de <i>Acetobacter acetii</i> (NRRL B-999).....	67
Tabla 2.1. Diseño factorial 2 ² para sustrato alcohólico de naranja	84
Tabla 2.2. Diseño experimental de la etapa de acetificación discontinua de sustrato alcohólico de naranja, utilizando <i>Acetobacter</i> sp.....	86
Tabla 2.3. Caracterización fisicoquímica del vino de naranjas.....	94
Tabla 2.4. Resultados del proceso de acetificación de un sustrato alcohólico de naranjas con <i>Acetobacter</i> sp., en sistema discontinuo.....	95
Tabla 2.5. Respuestas obtenidas en el diseño experimental (MSR) de la acetificación batch de un sustrato alcohólico de naranjas con <i>Acetobacter</i> sp.	102
Tabla 2.6. Parámetros cinéticos de la acetificación de un sustrato alcohólico de naranjas, según diseño de MSR.....	111
Tabla 3.1. Velocidad de acetificación y rendimiento GK en cada ciclo de acetificación de un sustrato alcohólico de naranja, en sistema semicontinuo con diferentes proporciones de carga/descarga (C/D).....	129
Tabla 4.1. Concentración de componentes antioxidantes presentes en distintas etapas del proceso de obtención de vinagre de naranjas.	148
Tabla 4.2. Coeficientes de correlación (r) entre componentes antioxidantes y actividad antioxidante (ABTS y DPPH), en vinagres de naranja	151

Tabla 4.3. Especificaciones del Código Alimentario Argentino (C.A.A.) y Código Alimentario Español (C.A.E.) para vinagres de procedencia frutal y de origen vínico	152
Tabla 4.3. Reiteración en Capítulo 7	236
Tabla 4.4. Parámetros fisicoquímicos de vinagre de naranja recién obtenido (Vn0) y al cabo de 6 meses de maduración (Vn6).....	153
Tabla 5.1. Composición nutricional del arándano	168
Tabla 5.2. Diseño experimental de la etapa de acetificación discontinua de un sustrato alcohólico de arándanos, utilizando <i>Acetobacter</i> sp.	175
Tabla 5.3. Caracterización fisicoquímica de la materia prima y sustratos, en diferentes etapas de la producción del mosto alcohólico de arándanos.	180
Tabla 5.4. Respuestas obtenidas en el diseño experimental (MSR) de la acetificación batch de un sustrato alcohólico de arándanos con <i>Acetobacter</i> sp.	182
Tabla 5.5. Parámetros cinéticos de la acetificación de un sustrato alcohólico de arándanos, según diseño de MSR.	192
Tabla 6.1. Velocidad de acetificación y rendimiento GK en cada ciclo de la acetificación de un sustrato alcohólico de arándanos en sistema semicontinuo con diferentes proporciones de carga/descarga (C/D).....	212
Tabla 7.1. Concentración de componentes antioxidantes presentes en distintas etapas del proceso de obtención de vinagre de arándanos	230
Tabla 7.2. Coeficientes de correlación (r) entre componentes antioxidantes y actividad antioxidante (ABTS y DPPH), en vinagres de arándanos (p<0,05).....	235
Tabla 7.3. Parámetros fisicoquímicos de vinagre de arándanos joven (Va0) y al cabo de 6 meses de maduración (Va6)	237

a	área interfacial líquido-gas por unidad de volumen de fluido.
AA	actividad antioxidante.
ABTS	2,2' azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) o radical ABTS ^{•+} .
ADH	enzima alcohol deshidrogenasa.
ALDH	enzima aldehído deshidrogenasa.
AT _i	acidez total, expresada como ácido acético, en el tiempo t _i .
AT _f	acidez total, expresada como ácido acético, en el tiempo t _f .
AV	acidez volátil.
BAA	bacterias del ácido acético.
C	concentración de oxígeno en el cultivo.
C*	concentración de oxígeno en el cultivo en equilibrio con la fase gaseosa (solubilidad).
C.A.A.	Código Alimentario Argentino.
C.A.E.	Código Alimentario Español.
C/D	proporción de carga o porcentaje de carga/descarga en sistema semicontinuo.
DO	densidad óptica.
DPPH	2,2-difenil-1-picril hidrazilo o radical DPPH [•] .
EAA	equivalente de ácido ascórbico.
ED	vía de Entner-Doudoroff.
EI	sistema de cultivo con medio EYPS e inyección de aire.
ES	sistema de cultivo con medio EYPS agitado en shaker.
FAD	coenzima flavín-adenín dinucleótido.
FT	fenoles totales.
GAE	equivalente de ácido gálico.

k_L	coeficiente de transferencia de materia en la fase líquida.
k_{La}	coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno.
K_S	constante de saturación.
MA	mosto alcohólico de arándanos.
MSR	metodología de superficie de respuesta.
μ	velocidad específica de crecimiento microbiano.
μ_M	velocidad específica máxima de crecimiento microbiano.
NADP ⁺	coenzima dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato.
NOA	Noroeste Argentino.
NEA	Noreste Argentino.
PPO	polifenoloxidasas.
PQQ	quinona de pirroloquinolina.
Qa	caudal de aire.
q_o	velocidad de consumo de oxígeno por célula.
Qo	velocidad de consumo de oxígeno por unidad de volumen de caldo.
r	coeficiente de correlación.
r_A	velocidad volumétrica de formación de producto, en este caso, velocidad de acetificación.
r_X	velocidad volumétrica de crecimiento microbiano.
RC	recuento celular.
R_{GK}	rendimiento GK.
RI	sistema de cultivo con medio RAE (1a, 2e) e inyección de aire.
Ro_2	velocidad de transferencia de oxígeno del gas al líquido.
RS	sistema de cultivo con medio RAE (1a, 2e) agitado en shaker.
S	concentración de sustrato limitante del crecimiento.

SNA	sustrato alcohólico de naranja destinado a acetificación.
SA	sustrato alcohólico de arándanos destinado a acetificación.
SV	sustrato de arándanos destinado a vinificación.
t_i	tiempo de proceso inicial.
t_f	tiempo de proceso final.
TM	toma de muestras.
Vag	velocidad de agitación.
Va0	vinagre joven de arándanos.
Va6	vinagre de arándanos madurado durante 6 meses.
Vn0	vinagre joven de naranjas.
Vn6	vinagre de naranja madurado durante 6 meses.
vvm	volumen de aire/volumen de medio de cultivo/min.
WD	vía de la hexosa monofosfato o pentosas fosfato o vía de Warburg-Dickens.
X	concentración celular.

I. Introducción

I.1. Origen del vinagre

El vinagre ha sido conocido desde las civilizaciones antiguas debido a su uso como agente saborizante y conservador de alimentos. Si bien ha sido tradicionalmente considerado como un producto industrial secundario sin interés comercial relevante, la gran diversidad de productos que actualmente contienen vinagre (salsas, ketchup, mayonesa, aderezos) ha favorecido su resurgimiento (Ignacio de Ory, Romero, & Cantero, 2002; Qi et al., 2013). También se ha propuesto su uso medicinal debido a que presenta efectos fisiológicos que contribuyen a regular la glucosa en sangre y la presión sanguínea, ayudar a la digestión, estimular el apetito y promover la absorción de calcio (Xu, Tao, & Ao, 2007). Recientemente se aislaron dos cepas, *Acetobacter indonesiensis* y *Acetobacter syzygii*, a partir de yogur y leche coagulada de origen iraní, que demostraron aceptables características probióticas (Haghshenas et al., 2014).

Se han encontrado referencias sobre la producción de vinagres a partir de materias primas muy diversas tales como uva, sidra, cebolla, arroz, malta, coco, ananá, suero lácteo (Solieri & Giudici 2009), arándanos (Su & Chien 2010; Hidalgo et al. 2013), frutillas (Claudio Hidalgo, Mateo, Cerezo, & Torija, 2010; Ubeda et al., 2013), té (Kaur, Kocher, & Phutela, 2011), durazno, cerezas, damasco (K. Beheshti-Maal & Shafiei, 2009; Keivan Beheshti-Maal, Shafiei, & Kabiri, 2010), mango (Ameyapoh et al., 2010), castañas de caju (Silva, Torres Neto, Silva, Silva, & Swarnakar, 2007), kiwi (Bortolini, Sant'Anna, & Torres, 2001), miel (Cassanego Ilha et al. 2000).

El vinagre es una solución diluida de ácido acético obtenida por un proceso fermentativo de dos etapas. En la primer etapa, una solución inocua de azúcares y/o sustancias amiláceas fermentables, son convertidos en etanol mediante levaduras del tipo *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que en la segunda fase, la solución alcohólica producida es oxidada hasta ácido acético por la acción de bacterias de la familia *Acetobacteriaceae* (Adams, 1998). Este proceso se denomina acetificación. Ya que ambos tipos de microorganismos

son parte de la microbiota natural de las materias primas utilizadas, la producción de vinagre puede ocurrir como una fermentación espontánea.

El origen del vinagre fue casual, como consecuencia de dejar involuntariamente vino en contacto con aire (Adams, 1998) y apenas se lo puede diferenciar del descubrimiento del vino. Las referencias más antiguas se hallan en la cultura babilónica (5000 años a.c.) e indican que utilizaban dátiles como principal materia prima para obtener vino y vinagre. Este último era empleado como conservante de todo tipo de alimentos. En la antigua Grecia, Hipócrates recomendaba vinagre contra un gran número de enfermedades. Los alquimistas lo usaban como disolvente durante siglos ya que el ácido acético que contiene el vinagre fue el ácido más fuerte del que se disponía. En la Biblia, una fuente tan importante como antigua, se lo menciona como una bebida refrescante y energizante, o bien como condimento, tal como se lo utiliza hoy en día (Mazza & Murooka, 2009).

En el siglo XVIII, A. de Lavoisier profundizó el estudio de la elaboración de vinagre desde el punto de vista químico. Demostró que un componente del aire al que llamó *oxígeno*, era el responsable de la combustión y el origen de la acidez. La palabra oxígeno, según la etimología de origen griego, significa “formador de ácido”. Además concluyó que los otros componentes del aire no tenían efectos sobre la materia (Mazza & Murooka, 2009).

A comienzos del siglo XIX, el químico y físico británico H. Davy demostró que la acetificación era debida a la transformación de alcohol en ácido acético, y logró identificar su fórmula química. En 1822 el científico alemán C. Persoon identificó en un microorganismo al principal agente para la transformación de vino en vinagre al que denominó *Mycoderma aceti* y en 1862 Pasteur confirmó definitivamente la efectividad de los estudios de Persoon. En 1867, expuso públicamente los resultados de sus investigaciones en este campo a los fabricantes de vino de la ciudad de Orléans. En una primera parte describió los principios teóricos de la transformación de vino en vinagre, mientras que en la segunda parte explicó el procedimiento de fabricación, enfermedades de los vinagres y conservación de vinos y vinagres. Estos estudios fueron publicados en el año 1868 en una amplia memoria titulada:

“Études sur le vinaigre, sa fabrication, ses maladies, moyens de les prévenir; nouvelles observations sur la conservation des vins par la chaleur”. En 1868 presentó este opúsculo a la Academia de Ciencias, haciendo hincapié en la aplicación a gran escala que se había realizado de los procedimientos industriales (Martínez Montalvo, 2002; Gándara & Dagognet, 2008).

La palabra vinagre proviene etimológicamente del latín “vinum acre” de la que deriva la locución francesa “vin aigre” equivalente al vino agrio (Suarez Lepe & Iñigo Leal, 2004).

La definición de vinagre difiere de acuerdo a cada país. De acuerdo al Código Alimentario Argentino (art. 1328), se entiende por Vinagre o Vinagre de vino el producto de la fermentación acética del vino. Los vinagres obtenidos por fermentación de materias primas distintas al vino (cerveza, sidra, frutas, cereales, alcohol, etc) deberán venderse con el nombre que especifique su origen. Para los vinagres de vino y de alcohol, la acidez total no deberá ser menor de 5 % p/v expresada como ácido acético, mientras que para vinagres de otros orígenes, aquella no será menor de 4 % p/v expresada como ácido acético.

Según el Código Alimentario Español se define como vinagre al líquido apto para el consumo humano resultante de la doble fermentación alcohólica y acética de productos de origen agrario, y específicamente como vinagre de frutas o vinagre de bayas, al producto obtenido a partir de frutas o de bayas de fruta mediante fermentación alcohólica y acética (Boletín Oficial del Estado 2012).

I.2 Bacterias del ácido acético

I.2.1. Características generales

Las bacterias del ácido acético (BAA) son un grupo ampliamente distribuido en la naturaleza que suelen encontrarse en frutas, flores, miel, suelo, como así también en hábitats artificiales azucarados, ácidos y

alcohólicos, como las bebidas fermentadas y jugos (Yamada et al. 1999; Kersters et al. 2006; Raspor & Goranovic 2008).

Si bien son habitualmente asociadas a la descomposición de los vinos debido a la producción de acetaldehído y ácido acético a partir del etanol (Drysdale & Fleet, 1988; Raspor & Goranovic, 2008), tienen su aplicación más conocida y tradicional en la producción de vinagre. Sin embargo, a partir de los avances logrados en el conocimiento de su taxonomía y fisiología, se ha despertado un gran interés en la industria biotecnológica para la producción de cocoa y de celulosa microbiana. Otros productos de la biotransformación de las BAA o sus enzimas son el ácido 2-ceto-L-glucónico utilizado para la producción de vitamina C, D-tagatosa, como agente espesante y edulcorante no calórico y, shikimato, que es un intermediario clave para muchos antibióticos (Raspor & Goranovic, 2008).

Morfológicamente, son microorganismos Gram-negativos o Gram-variables, de forma elipsoidal o cilíndrica. Su tamaño varía entre 0,4 a 1 µm de ancho y de 0,8 a 4,5 µm de longitud, y pueden encontrarse solos, a pares o formando cadenas. Son móviles debido a la presencia de flagelos polares o peritricos y poseen un metabolismo aeróbico estricto con el oxígeno como aceptor final de electrones. Presentan actividad catalasa positiva y oxidasa negativa (Madigan, Martinko, & Parker, 2004).

Su temperatura óptima de crecimiento se ubica entre 25 - 30 °C (De Ley, Gillis, & Swings, 1984) y la máxima tolerada se estima entre 35 - 40 °C. En efecto, se han aislado cepas a partir de frutos y cereales de países tropicales que pueden desarrollarse normalmente y producir ácido acético hasta los 40 °C (Ndoye et al., 2006; K. Beheshti-Maal & Shafiei, 2011).

El rango de pH óptimo para el desarrollo se ubica entre 5 - 6 (Holt et al. 1994; Ribereau-Gayon et al. 2003), sin embargo pueden multiplicarse fácilmente en medio ácido hasta un pH 3,5 (De Ley et al. 1984; Ribereau-Gayon et al. 2003; Cleenwerck & De Vos 2008) e incluso se lograron aislar BAA a pHs tan bajos como 2,0 - 2,3 (Kittelmann, Stamm, Follmann, & Triiper, 1989; Du Toit & Pretorius, 2002).

I.2.2. Taxonomía

Históricamente, las BAA se conocían como “bacterias del vinagre” porque los primeros estudios se realizaron en vinagres y después en vinos y cervezas fermentadas (Gullo & Giudici, 2009). En 1868, Pasteur publicó el primer estudio sistemático que describía la “madre del vinagre” como una masa de microorganismos vivos (*Mycoderma aceti*) que llevaban a cabo la acetificación por el método de Orleáns (cultivo superficial).

En 1925, Visser't Hooft, propuso la primera clasificación taxonómica basada en criterios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos. Sin embargo, el advenimiento de las nuevas tecnologías de la ingeniería genética, como las técnicas moleculares (hibridación ADN – ADN, porcentaje de G+C del genoma bacteriano, secuenciación automática de diferentes regiones del ADN), ha permitido la revisión permanente de la clasificación de las BAA. De esta manera, se logró tanto el reordenamiento de las ya existentes como así también la identificación de nuevos géneros y especies (Gonzalez Benito 2005; Cleenwerck & De Vos 2008; Yamada & Yukphan 2008; Gullo & Giudici 2009). Considerando que las BAA colonizan diferentes hábitats, se supone que seguirán siendo actualizados permanentemente.

Actualmente, la familia *Acetobacteriaceae* está compuesta por 19 géneros (Tabla I.1). *Acetobacter*, *Komagataeibacter* y *Gluconacetobacter*, con 25, 14, y 10 especies respectivamente, son los géneros donde mayor diversidad de especies han sido descritas (Trček & Barja, 2015). Las especies más utilizadas en la producción de vinagre son aquellas en las que se ha comprobado una importante habilidad para oxidar el etanol a ácido acético y una alta resistencia a este compuesto (Nakano & Fukaya 2008; Yamada 2014). Específicamente, las bacterias utilizadas para este propósito son: *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Acetobacter pomorum*, *Acetobacter polyoxogenes*, *Komagataeibacter europaeus*, *Komagataeibacter hansenii*, *Komagataeibacter oboediens*, *Komagataeibacter intermedius*, *Komagataeibacter xylinus* y *Gluconacetobacter entanii* (Sokollek, Hertel, &

Hammes, 1998; Gullo, Caggia, De Vero, & Giudici, 2006; Gullo, De Vero, & Giudici, 2009; Wu, Gullo, Chen, & Giudici, 2010; Yuzo Yamada et al., 2012; Fu, Chen, Yi, & Hou, 2013).

TABLA I.1. Organización actual de géneros de BAA.

Género	Especie tipo	Cantidad de especies descriptas
<i>Acetobacter</i>	<i>A. aceti</i>	25
<i>Gluconobacter</i>	<i>G. oxydans</i>	15
<i>Acidomonas</i>	<i>A. methanolica</i>	1
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>G. liquefaciens</i>	10
<i>Asaia</i>	<i>A. bogorensis</i>	8
<i>Kozakia</i>	<i>K. baliensis</i>	1
<i>Saccharibacter</i>	<i>S. floricola</i>	1
<i>Swaminathania</i>	<i>S. salitolerans</i>	1
<i>Neoasaia</i>	<i>N. chiangmaiensis</i>	1
<i>Granulibacter</i>	<i>G. bethesdensis</i>	1
<i>Tanticharoenia</i>	<i>T. sakaeratensis</i>	1
<i>Commensalibacter</i>	<i>C. intestini</i>	1
<i>Ameyamaea</i>	<i>A. chiangmaiensis</i>	1
<i>Neokomagataea</i>	<i>N. thailandica</i>	2
<i>Komagataeibacter</i>	<i>K. xylinus</i>	14
<i>Endobacter</i>	<i>E. medicaginis</i>	1
<i>Swingsia</i>	<i>S. samuiensis</i>	1
<i>Nguyenibacter</i>	<i>N. vanlangensis</i>	1

Fuente: Trček & Barja 2015

I.2.3. Metabolismo

Aunque las BAA tienen un metabolismo estrictamente aerobio, se ha observado que pueden sobrevivir en condiciones de anaerobiosis o con tensión de oxígeno muy baja, debido a la posibilidad de utilizar quinonas como aceptores finales de electrones en lugar del oxígeno. No obstante, en estas condiciones, su crecimiento y desarrollo está muy restringido y cualquier proceso que involucre una aireación favorece en gran medida su desarrollo (Drysdale & Fleet, 1988).

Según la fuente de carbono que dispongan en el medio de cultivo, las BAA pueden utilizar diferentes rutas metabólicas, con intermediarios y productos finales distintos. De forma general, se puede decir que realizan una oxidación incompleta de azúcares y alcoholes, produciendo una acumulación de ácidos orgánicos como productos finales. Cuando el sustrato es etanol producen ácido acético y de ahí el nombre con el que se las conoce (Jara Campos, 2009).

I.2.3.1. Metabolismo del etanol y otros alcoholes

La oxidación del etanol a ácido acético es llevada a cabo por todos los géneros de BAA, con excepción de *Asaia* (Yuzo Yamada et al., 2000) y *Saccharibacter* (Jojima et al., 2004).

El alcohol es parcialmente oxidado en dos reacciones catalíticas secuenciales, para dar ácido acético y agua (Matsushita, Toyama, & Adachi, 1994; Yakushi & Matsushita, 2010). En primer lugar, el etanol es transformado en acetaldehído por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y posteriormente el acetaldehído es oxidado a ácido acético por acción de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) (Figura I.1). Ambas enzimas están localizadas en la membrana citoplasmática y orientadas hacia el espacio periplasmático. La ADH es una quinoproteína que contiene la quinona de pirroloquinolina (PQQ) como grupo prostético (Chinnawirotpisan et al., 2003). Estos dos complejos enzimáticos están conectados con la cadena respiratoria que, por medio de la

ubiquinona, transfiere los electrones hasta el oxígeno que actúa como aceptor final (Matsushita et al., 1994).

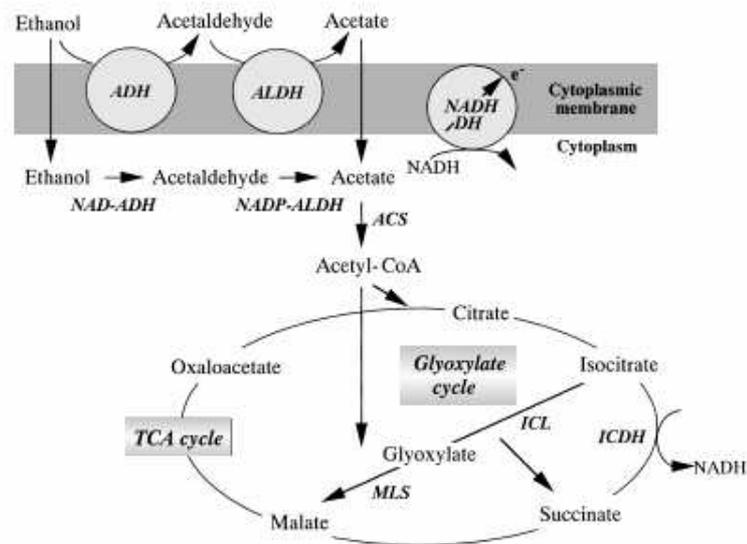


Figura I.1. Vías metabólicas de la asimilación oxidativa del etanol: ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y del glioxilato vía acetil-CoA (Chinnawirotpisan et al., 2003).

La ADH ligada a la membrana tiene un pH óptimo de 4, aunque puede estar activa a pH inferiores y es independiente de la coenzima dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato (NADP^+). La actividad de esta ADH es más estable en *Acetobacter* que en *Gluconobacter*, lo que puede explicar la mayor producción de ácido acético de las primeras (Matsushita et al., 1994). La ALDH presenta un pH óptimo entre 4 y 5 y, al igual que la ADH, es activa a valores de pH inferiores e independiente de NADP^+ .

También se han detectado otras formas de ADH en el citoplasma, generalmente dependientes de NADP^+ , aunque en cantidades menores (Adachi, Miyagawa, Shinagawa, Matsushita, & Ameyama, 1978; Matsushita et al., 1994; Adachi et al., 2003). Chinnawirotpisan et al. (2003) concluyeron que sólo la quinoproteína ADH está involucrada en la producción de ácido acético

extracelular, mientras que la ADH dependiente del NADP^+ participa sólo en la asimilación del etanol a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y del ciclo del glioxilato.

La enzima ALDH presenta mayor sensibilidad a la deficiencia de oxígeno, lo que implica que si existe limitación de oxígeno disuelto en el medio se produce una acumulación de acetaldehído (Ribereau-Gayon et al., 2003), que puede llegar a ser tóxico para las propias bacterias. Asimismo, esta enzima es más sensible a la concentración de etanol que la ADH y por tanto, medios con alto contenido alcohólico, pueden presentar una mayor acumulación de acetaldehído (Jara Campos, 2009).

Aunque la característica metabólica común de las BAA es la oxidación incompleta de los sustratos, el ácido acético producido puede ser oxidado completamente hasta CO_2 y H_2O (De Ley et al. 1984; Saeki et al. 1997; García-García et al. 2009; Matsutani et al. 2013) siempre que estas bacterias dispongan del ciclo de los ácidos tricarboxílicos funcional (Guillamón & Mas, 2011). Esta reacción también conocida como sobreoxidación, se desarrolla en el citoplasma y es catalizada por las enzimas solubles ADH y ALDH dependientes del NADP^+ (Figura I.1).

Las especies pertenecientes a los géneros *Acetobacter* y *Gluconacetobacter* pueden oxidar completamente el acetato aunque la presencia de glucosa, fructosa o etanol reprimen el funcionamiento de aquellas rutas metabólicas, por lo que la sobreoxidación sólo se dará cuando se hayan consumido completamente las fuentes de carbono presentes en el medio (Saeki et al. 1997; Guizani & Mothershaw 2006). Las cepas de *Gluconobacter* no poseen el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, por lo que no son capaces de continuar la oxidación del acetato (Guillamón & Mas, 2011).

El glicerol, después del etanol, es el alcohol más utilizado por las BAA. Sin embargo, el proceso de oxidación del glicerol está inhibido cuando hay elevadas concentraciones de etanol en el medio, es decir, al inicio del proceso de acetificación en el caso de vinagres (Yamada et al. 1979; Ribereau-Gayon et al. 2003). Este alcohol es mayoritariamente transformado en 1,3-

dihidroxiacetona (cetogénesis) mediante la enzima glicerol deshidrogenasa de las células de *Gluconobacter oxydans* (Hu et al. 2010; Hu et al. 2011), aunque una parte se puede utilizar de forma efectiva para la producción de biomasa (Guillamón & Mas, 2011).

La capacidad de oxidación de las BAA se extiende también a otros alcoholes primarios y polialcoholes, los cuales son transformados en sus respectivas cetonas o cetosas, como la acetoína, a partir de 2,3-butanodiol. Además, algunos polialcoholes son convertidos en sus correspondientes azúcares: fructosa a partir de manitol, sorbosa de sorbitol, eritrosa de eritritol. Ya que la mayoría de las enzimas que catalizan estas reacciones se localizan en la membrana celular, se produce una acumulación de estos sustratos en el medio que los hace apropiados para su uso en biotecnología (Deppenmeier, Hoffmeister, & Prust, 2002).

I.2.3.2. Metabolismo de los carbohidratos

Las BAA pueden utilizar diferentes carbohidratos como fuente de carbono, tales como fructosa, galactosa, arabinosa, manitol, manosa, ribosa, sorbitol o xilosa (De Ley et al., 1984), aunque la glucosa es la más utilizada. Ya que la vía de la glucólisis o Embden-Meyerhof-Parnas está ausente o es muy débil, las BAA deben utilizar otras rutas alternativas para utilizar los hidratos de carbono como fuente de carbono y energía (Figura I.2). La vía metabólica de utilización de los azúcares es la vía de la hexosa monofosfato o pentosas fosfato o vía de Warburg-Dickens (WD). En *Acetobacter* se agrega el ciclo de los ácidos tricarbónicos, ausente en *Gluconobacter*.

Después de una fosforilación inicial, la glucosa puede ser oxidada por la vía de las pentosas fosfato (WD) hasta gliceraldehído-3-fosfato, o por la vía Entner-Doudoroff (ED) hasta gliceraldehído-3-fosfato o piruvato. El gliceraldehído-3-fosfato procedente de las vías de WD y ED es primero metabolizado a piruvato, y posteriormente oxidado a acetato. Algunos géneros de BAA pueden oxidar completamente este acetato a CO₂ y H₂O por el ciclo de los ácidos tricarbónicos o del glioxilato (Vegas Pérez, 2011).

La oxidación de la glucosa a glucono- δ -lactona y posteriormente hasta ácido glucónico es especialmente activa en *Gluconobacter oxydans* y es característica de sustratos ricos en azúcares como la uva o los mostos (De Ley et al. 1984; Drysdale & Fleet 1988; Fugelsang & Edwards 2007). Además tienen la propiedad de oxidar el ácido glucónico y formar los ácidos ceto-5-glucónico, ceto-2-glucónico y diceto-2,5-glucónico (Qazi et al., 1991; Ribereau-Gayon et al., 2003). En este caso las deshidrogenasas que oxidan estos compuestos son flavoproteínas que contienen la coenzima flavín-adenín-dinucleótido (FAD) como grupo prostético (Matsushita et al., 1994).

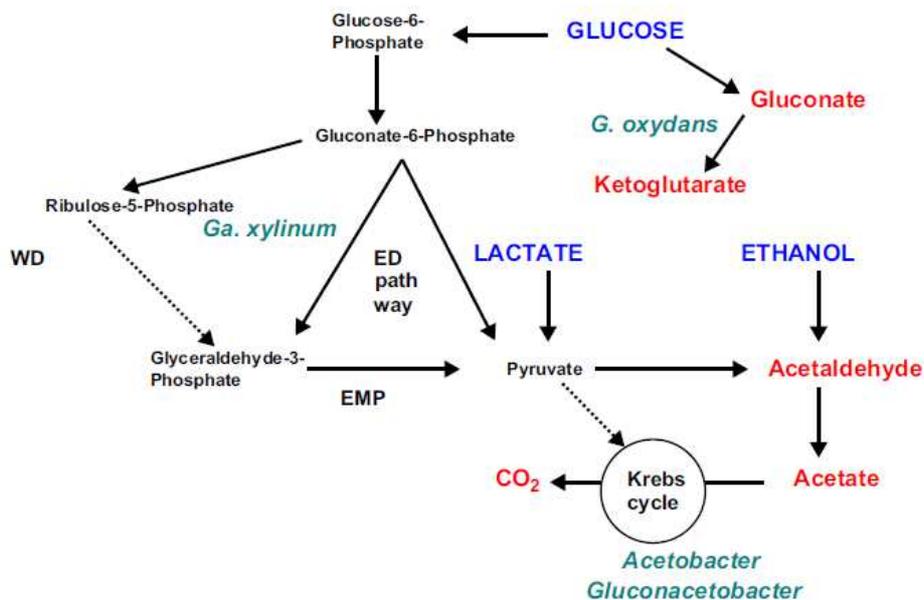


Figura I.2. Representación esquemática del metabolismo de los carbohidratos por las BAA (Guillamón & Mas, 2011).

Por otro lado, a partir de la asimilación de otros carbohidratos, las BAA pueden producir una gran variedad de exopolisacáridos como levano (a partir de sacarosa), celulosa y acetano (polisacárido ácido similar al xantano). Estos polisacáridos son los responsables de la formación del biofilm y la

retención de las BAA en la superficie del líquido a acetificar durante la producción de vinagres (Moonmangmee et al. 2002; Valepyn et al. 2012).

I.2.3.3. Metabolismo de los ácidos orgánicos

Además de la asimilación del ácido acético, del cual ya se ha hecho referencia en el apartado I.2.3.1, las BAA pueden metabolizar una gran variedad de ácidos orgánicos entre los cuales se pueden citar el ácido cítrico, fumárico, láctico, málico, pirúvico y succínico. A pesar de que estos ácidos pueden ser metabolizados completamente, también es posible una degradación incompleta con la formación de metabolitos intermedios que son excretados al medio (Vegas Pérez, 2011).

El ácido láctico es una buena fuente de carbono para varias BAA y se puede oxidar por diferentes rutas metabólicas y con distintos productos finales. Una de ellas es la oxidación a piruvato, luego su hidrólisis hasta acetaldehído y CO₂ por acción de la enzima piruvato descarboxilasa y por último, la oxidación del acetaldehído a ácido acético (Ribereau-Gayon et al., 2003).

I.2.3.4. Metabolismo del nitrógeno

Sólo tres géneros de la familia *Acetobacteraceae* (*Gluconoacetobacter*, *Acetobacter* y *Swaminathania*) poseen especies diazótroficas, es decir, que tienen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico (N₂) y reducirlo a amonio: *Gluconoacetobacter diazotrophicus*, *Gluconoacetobacter johanna*, *Gluconoacetobacter azotocaptans*, *Acetobacter peroxydans*, *Swaminathania salitolerans*, *Acetobacter nitrogenifigens* y *Gluconoacetobacter kombuchae* (Dutta & Gachhui, 2007).

La mayoría de las BAA utilizan el amonio inorgánico como única fuente de nitrógeno y, a partir de éste pueden sintetizar todos los aminoácidos y compuestos nitrogenados (De Ley et al., 1984). Sin embargo, se ha detectado que la presencia de algunos aminoácidos como el glutamato, glutamina, prolina o histidina tiene un efecto estimulador sobre el crecimiento de BAA, mientras

que otros aminoácidos pueden inhibir su crecimiento, como es el caso de la valina para *G. oxydans* o la treonina y homoserina para *A. aceti* (Belly & Claus, 1972).

Probablemente, los aminoácidos y otros compuestos nitrogenados liberados durante la autólisis de las levaduras son suficientes para el crecimiento de las BAA. Mientras que en vinagres de alcohol o vinos con bajo contenido en aminoácidos, como la sidra, se deben agregar nutrientes para la elaboración de vinagre (Valero et al., 2005), esto no es necesario para los vinos (Guillamón & Mas, 2011).

I.3 Sistemas de producción de vinagre.

El proceso de acetificación puede ser representado químicamente por medio de la siguiente reacción:



De acuerdo con la estequiometría de esta reacción se puede calcular que 1 L de etanol debe producir 1,036 kg de ácido acético y 0,313 kg de agua. Este cálculo indica, aproximadamente, que un 1 % v/v de etanol proporcionará un 1 % p/v de ácido acético y de aquí que esta relación se utilice tanto para predecir la acidez final del vinagre como para calcular el rendimiento de la fermentación (Adams & Moss 1997; de Ory et al. 2002; Gullo et al. 2014). Por lo que, en ausencia de pérdidas por evaporación o sobreoxidación, la suma de las concentraciones de etanol (% v/v) y de la acidez total (% p/v), conocida como concentración total o GK (*Gesammte Konzentration*), debería permanecer constante durante la acetificación (Ormaechea Landa 1991; Adams 1998; Tesfaye et al. 2000; Leonel et al. 2015).

La oxidación del etanol a ácido acético es una reacción exotérmica que produce aproximadamente 8,4 MJ por cada litro de etanol oxidado (Adams,

1998). Excesos de temperatura no controlados podrían destruir las BAA o limitar su actividad enzimática. Además, se aumentaría la posibilidad de evaporación de los compuestos volátiles (etanol, ácido acético) con lo cual disminuiría el rendimiento y la calidad del producto final. Para evitar estos inconvenientes se hace necesario instalar mecanismos de disipación de calor en el fermentador como serpentines de enfriamiento con agua (Wendu Tesfaye, Morales, García-Parrilla, & Troncoso, 2003; García Garibay, Quinteros Ramirez, & López Munguía, 2007).

I.3.1. Sistemas de acetificación

Existen varias técnicas de acetificación que se diferencian en cuanto a los modos mediante los cuales se articulan entre sí los tres componentes que actúan, es decir, etanol, bacterias y oxígeno (Adams & Moss, 1997). Las técnicas pueden ser superficiales, en las cuales las BAA crecen abundantemente en la superficie del medio donde la concentración de oxígeno es elevada, o bien en cultivo sumergido, donde las bacterias permanecen suspendidas en el sustrato a acetificar y se asegura el suministro de aire con diferentes sistemas (Wendu Tesfaye et al., 2003).

I.3.1.1. Sistemas superficiales

La transformación espontánea del vino expuesto al aire durante un período prolongado de tiempo fue el único sistema utilizado por el hombre hasta prácticamente el siglo XVII en que hizo su aparición el primer sistema de fermentación controlado, el **sistema Orleáns**, también llamado sistema lento (Fig. I.3.a). El proceso consiste en la carga de toneles perforados para su aireación, con un líquido alcohólico. Las bacterias forman una película superficial en la interfase entre el líquido y el aire, llamada “madre del vinagre”. Una vez alcanzado el grado de acidez apropiado, se extrae una parte del contenido del tonel, se lo sustituye por nuevo líquido alcohólico, y así recomienza el proceso (Adams & Moss 1997; Adams 1998; Suarez Lepe &

Iñigo Leal 2004; Mazza & Murooka 2009). El vinagre producido por este método es de muy buena calidad, sin embargo resulta un proceso lento y costoso, por lo que hoy en día, es empleado para la producción de vinagres selectos y tradicionales, como el Aceto Balsámico y el Vinagre de Jerez. Este sistema permite realizar simultáneamente la acetificación y el envejecimiento (Tesfaye et al. 2002; Suarez Lepe & Iñigo Leal 2004).

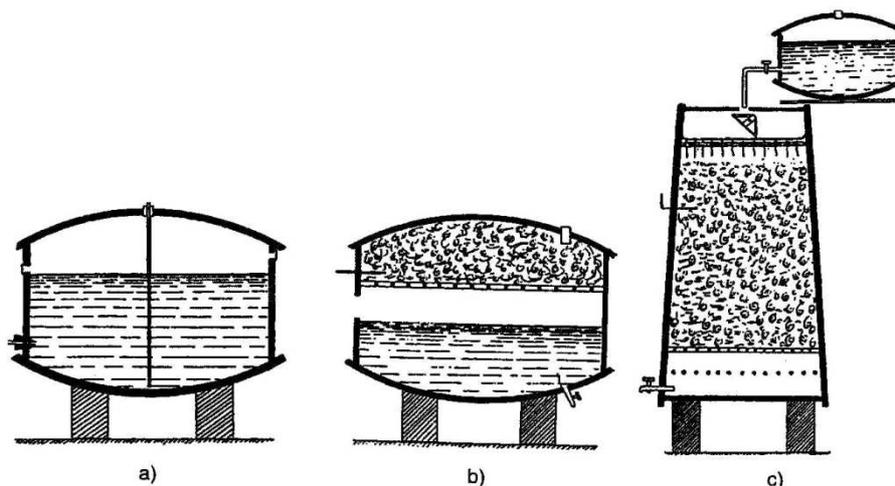


Figura I.3. Esquema de los sistemas antiguos de fabricación de vinagre: a) Método de Orléans. b) Método Luxemburgués. C) Método alemán o Schutzenbach (Suarez Lepe & Iñigo Leal, 2004).

Un gran avance en vinagrería se produjo con la aparición del sistema ideado por Boerhaave y posteriormente modificado por Schutzenbach en 1823, llamado **sistema rápido o alemán**, lo que representó el paso de un sistema estático a uno dinámico (Fig. I.3.c). La mezcla hidroalcohólica es rociada, continua y lentamente, sobre una superficie de material inerte inoculada con bacterias acéticas, contra una corriente de aire de sentido contrario. El relleno de material inerte y poroso, normalmente virutas de madera de haya, proporciona una amplia superficie para el desarrollo de las bacterias acéticas y mejora la transferencia de oxígeno al líquido. El líquido parcialmente acetificado es recogido en un colector en el fondo del tanque y recirculado hasta que se alcanza el grado de acidez deseado (Adams & Moss, 1997; Suarez Lepe &

Iñigo Leal, 2004). Sin embargo, este método presentaba el inconveniente de evaporar parte del etanol, ácido acético y componentes aromáticos volátiles debido a la corriente ascendente de aire, con lo cual el rendimiento se veía disminuido. Aunque se los considera obsoletos, todavía existen unas cuantas instalaciones a escalas muy pequeñas que emplean este método (Ormaechea Landa 1991; Adams & Moss 1997).

El sistema **luxemburgués** de cubas rotatorias consiste en un tonel que se divide en dos partes separadas por un falso fondo perforado, donde la parte menor se rellena con virutas de madera de haya (Fig. 1.3.b). El fundamento del método se basa en que, alternativa y periódicamente, las virutas quedan sumergidas en el líquido en proceso de acetificación y salen para sufrir una aireación mediante la cual, y con el enorme aumento de la superficie de oxidación de la que disponen las bacterias acéticas, se mejora notablemente la velocidad de producción de ácido acético. En primer lugar se carga la cuba hasta 1/5 de su volumen con un vinagre de vino de buena calidad, de manera de empapar las virutas y sembrarlas de bacterias acéticas (Suarez Lepe & Iñigo Leal, 2004).

A pesar del aumento en la velocidad de acetificación lograda con los sistemas en cultivo superficial, que emplean virutas como soporte (Schutzenbach y luxemburgués), se han observado los siguientes inconvenientes:

- Acumulación de bacterias muertas sobre las virutas debido a la falta de aireación o a los aumentos de temperatura.
- Desarrollo de bacterias productoras de celulosa (*Acetobacter xylinum*).
- Infección por anguílulas, que son muy difíciles de combatir una vez que se desarrollan.
- Aumentos de temperatura difíciles de controlar, con pérdidas de alcohol por evaporación, originando una disminución en el rendimiento.
- Necesidad de grandes espacios y obras civiles, debido al elevado tamaño de los generadores de relleno (Suarez Lepe & Iñigo Leal, 2004).

I.3.1.2. Sistemas sumergidos

Otro gran avance en el proceso de acetificación fue el **método de cultivo sumergido**, en el cual las bacterias acéticas suspendidas en el medio de fermentación reciben oxígeno en forma de burbujas finamente divididas provenientes de un aireador y un agitador ubicados en la base del equipo. Este sistema se comenzó a estudiar en 1923, pero fue puesto a punto por Hromatka y Ebner en 1949, teniendo en cuenta la metodología utilizada para la producción industrial de penicilina (Suarez Lepe & Iñigo Leal, 2004; Mazza & Murooka, 2009). Como resultado se obtuvo una velocidad de crecimiento logarítmica de las bacterias acéticas, con elevados rendimientos de producto debidos a la dispersión de pequeñas burbujas en el seno del líquido que aseguraban el alto suministro de oxígeno que demanda esta fermentación.

A partir de ese momento, se comenzaron a diseñar y patentar varios métodos para la acetificación en sistema sumergido que emplean diferentes sistemas de aireación. Básicamente estos fermentadores aseguran mayores coeficientes de transferencia de oxígeno y no están equipados con sistemas de agitación (Adams 1998; Tesfaye et al. 2002). A continuación se describen algunos de ellos.

En 1950 se creó el Acetator Frings, base de la biotecnología vinagrera actual. Este acetificador utiliza una turbina-estator que además de funcionar como dispositivo de aireación, aspirando de modo continuo aire desde el exterior, genera una intensa mezcla con el medio de cultivo. La turbina tiene un cuerpo hueco conectado con el exterior de manera que cuando gira genera un vacío que succiona aire del exterior. Rodeando la turbina se encuentra el estator. Con este diseño se consigue una dispersión homogénea del aire en forma de burbujas pequeñas, con lo cual la superficie de transferencia del oxígeno es mayor y, al tener una mayor velocidad de transferencia, se tiene también una mayor velocidad de producción de ácido acético, con gasto de energía relativamente bajo. Además, cuenta con serpentina de enfriamiento, termómetro, analizador-registrador continuo y automático del contenido alcohólico residual (*Alkograph*) y dispositivo antiespuma (Figura I.4). En este

tipo de fermentador es posible realizar tanto una fermentación semicontinua como una continua, aunque se consiguen niveles más bajos de acidez (Mazza & Murooka, 2009).

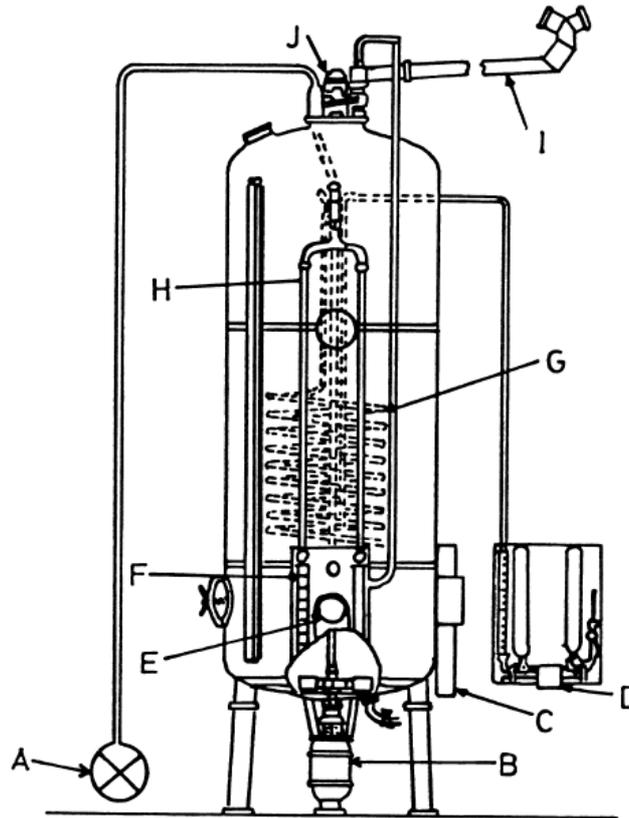


Figura I.4. Esquema de Acetator FRINGS. A: bomba de carga, B: motor y aireador, C: dispositivo para medición de alcohol residual (*Alkograph*), D: válvula de entrada de agua de refrigeración, E: termostato que controla D, F: rotámetro, G: serpentina de refrigeración, H: entrada de aire, I: salida de gases, J: dispositivo antiespuma (Adams, 1998).

En 1959, Cohee desarrolló el Cavitator con el propósito de mejorar el suministro de aire al equipo. El diseño incluía un tubo hueco a lo largo del fermentador hasta la superficie del medio líquido que, al girar, succionaba medio y aire de la parte superior del fermentador, mezclándolos íntimamente

mediante la formación de burbujas muy pequeñas (Suarez Lepe & Iñigo Leal 2004; García Garibay et al. 2007). Sin embargo, pocos años después dejó de funcionar porque presentaba muchos problemas técnicos (Mazza & Murooka, 2009).

Un acetificador más reciente es el Vinegator, de origen suizo, en el cual se utiliza una turbina Effigas como sistema de aireación (Suarez Lepe & Iñigo Leal, 2004).

En los acetificadores de torre o columnas de burbujeo, la agitación y aireación se producen mediante la inyección de aire comprimido desde el fondo de la columna de elevada relación altura/diámetro, con bajo gasto de energía. La velocidad de transferencia de oxígeno que se logra es elevada debido a que el aire atraviesa un difusor (placa perforada) ubicado en la base del equipo, con lo cual las burbujas salen finamente divididas. Sin embargo, sólo se han utilizado en escala de planta piloto construidas en material plástico, con capacidad de 3000 litros (W Tesfaye et al., 2002; Suarez Lepe & Iñigo Leal, 2004).

En Francia se comercializa un sistema que utiliza la inyección de aire mediante un chorro denominado Jet System. La introducción de la mezcla aire-líquido se realiza tangencialmente, lo que imprime un movimiento de rotación al líquido contenido en el tanque. La relación altura/diámetro de estos acetificadores es similar a los de columna de burbujeo. Se logran rendimientos del 92 al 95 % (Suarez Lepe & Iñigo Leal, 2004).

Como otra alternativa a los sistemas de cultivos sumergidos, en 1969, la compañía japonesa Tanabe Seiyaku publicó el primer proceso industrial que hacía uso de enzimas inmovilizadas. A partir de allí se han descrito numerosos procesos y muy diferentes técnicas de inmovilización de células, aunque las aplicaciones industriales fueron relativamente escasas. Si bien estos métodos permiten una producción continua, de manera estable y con altas velocidades de acetificación, una limitación que presentan algunos de ellos es la dificultad en la transferencia de oxígeno y la baja acidez final, que los hacen poco recomendables para la producción industrial (Suarez Lepe & Iñigo Leal, 2004).

Dentro de las ventajas de la fermentación en cultivo sumergido se incluyen los elevados rendimientos (95 al 98 % del valor teórico), velocidad de crecimiento logarítmico y mayor velocidad de acetificación: mientras que con un biorreactor de virutas se logra una velocidad máxima de 0,02 a 0,025 % p/v/h, con el sistema sumergido se consiguen 0,12 a 0,17 % p/v/h. Además, la superficie necesaria para acetificar un mismo volumen de etanol es muy inferior a la requerida con generadores de virutas: para 300 L de etanol diarios se necesitan 30 m² con este último mientras que con el primero, sólo 0,55 m². Por ello, los métodos sumergidos son los utilizados habitualmente en los procesos industriales de obtención de vinagres (Adams 1998; Suarez Lepe & Iñigo Leal 2004; Mazza & Murooka 2009).

I.3.2. Sistemas de alimentación

La forma de operar el biorreactor es otra clave para obtener resultados aceptables de una fermentación. En principio, el sistema de alimentación puede realizarse en forma discontinua, semicontinua o continua. La elección del sistema apropiado depende de la forma en que las principales variables del proceso influyen en la actividad de las BAA: dependiendo del propósito específico debería operarse en las mejores condiciones ambientales posibles para su desarrollo. Las consideraciones más importantes en este punto son la economía y la calidad del producto final (Isidoro García-García, Santos-Dueñas, Jiménez-Ot, Jiménez-Hornero, & Bonilla-Venceslada, 2009).

El modo **discontinuo** implica tres fases principales: carga de la materia prima e inoculación, fermentación y descarga completa del medio fermentado con el producto de la biotransformación.

El sistema **semicontinuo**, consiste en el desarrollo de sucesivos ciclos discontinuos de acetificación, cada uno con la conversión del etanol que contiene el medio en ácido acético. Al final de cada ciclo, un volumen dado del reactor se descarga y se rellena con medio inicial mientras que el volumen remanente, actúa como inóculo para la siguiente etapa (García-García et al., 2007). Este sistema es el modo de operación más común en la industria

vinagrera (Arnold et al. 2002; Tesfaye et al. 2002; de Ory et al. 2004; García-García et al. 2007) .

El proceso **continuo** consiste principalmente en la descarga continua de un pequeño volumen del producto, con una composición constante en el tiempo, para lo cual se requiere un suministro continuo de sustrato con el objetivo de mantener constante el volumen del medio de fermentación en el biorreactor (Tefaye et al., 2002).

Cuando se quiere producir vinagre de acidez mayor a 8-9 % ácido acético, se debe excluir la operación en continuo y el modo habitual de trabajo en estos casos es el semicontinuo (García-García et al., 2009).

I.4. Factores involucrados en la fermentación acética.

Como en cualquier otro proceso fermentativo, resulta evidente la necesidad de alcanzar poblaciones bacterianas numerosas en el menor tiempo posible, lo cual será consecuencia de su velocidad de crecimiento específico, y ésta a su vez, de las condiciones en que se lleve a cabo el mismo.

Los factores involucrados en la fermentación acética pueden ser divididos en principales y secundarios. Los principales son aquellos relacionados con el metabolismo de las bacterias acéticas, tales como sustrato, oxígeno y temperatura (Nieto, 1991; Tesfaye et al., 2003; García-García et al., 2009). Estos detendrán el proceso fermentativo en un corto tiempo a menos que sean estrictamente controlados. Los factores secundarios son aquellos que aumentan la vitalidad de las bacterias acéticas y determinan la velocidad de acetificación y costo de producción del producto final sin llegar a detener el proceso: diseño del fermentador, volumen de trabajo, proporción de carga, velocidad de carga y cultivo iniciador (Figura I.5) (Tefaye et al., 2003). Sin embargo, el estudio de la fermentación acética es complicado debido a la gran interdependencia existente entre todos ellos. Ninguna observación es válida si no se detallan las condiciones bajo las que se ha realizado, ya que el efecto de

una variable de proceso depende mucho de la situación de las demás (Nieto, 1991; Tesfaye et al., 2003).

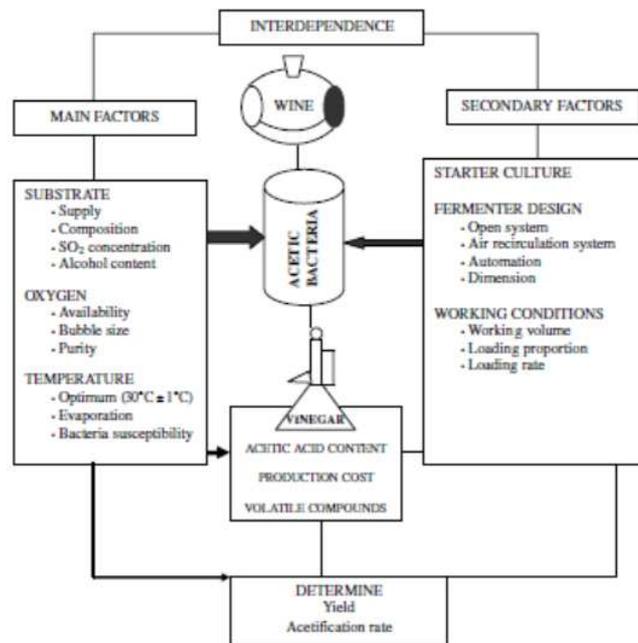


Figura I.5. Representación esquemática de factores que afectan el proceso de acetificación (Tesfaye et al., 2003).

I.4.1. Sustrato

El sustrato cumple un rol muy importante: su composición determina tanto el crecimiento de las BAA como la calidad del vinagre (Tesfaye et al., 2002). Tanto el etanol como el ácido acético pueden tener un efecto activador como inhibidor en el crecimiento microbiano, dependiendo de las concentraciones en el medio (de Ory et al., 2002). Una elevada concentración del alcohol resulta en una fuerte inhibición bacteriana. A nivel industrial, es sabido que concentraciones de etanol mayores a 50 g/L afectan adversamente la velocidad de acetificación. Por otro lado, y de acuerdo a lo mencionado en el apartado I.2.3.1, concentraciones muy bajas de etanol pueden conducir a la muerte de parte del cultivo, o a la sobreoxidación cuando se trata de bacterias

que utilizan el ácido acético como fuente de carbono y producen dióxido de carbono y agua. Esto es importante cuando se pretende utilizar las BAA como starter en ciclos subsiguientes. Por este motivo, en sistemas semicontinuos es aconsejable realizar cada recarga de sustrato cuando la concentración de etanol sea del 0,2 - 0,3 % v/v (Tesfaye et al. 2002; García-García et al. 2009).

Considerando los modelos cinéticos propuestos por Gomez et al. (1994) para *Acetobacter aceti*, se podría considerar que la concentración óptima de etanol en el medio de fermentación estaría alrededor de 13 g/L, aunque este valor depende también de la concentración de otros compuestos tóxicos como el ácido acético (Ignacio de Ory et al., 2002).

También el ácido acético presenta un efecto activador-inhibidor sobre las BAA. Varios autores han demostrado el aumento en la velocidad de crecimiento, y por ende en el consumo de alcohol, a concentraciones inferiores a 10 g/L (Bar et al. 1987). Nanba et al. (1984) observaron un efecto activador en el crecimiento con una notable disminución en la duración de la fase lag a esas concentraciones de ácido. Según las ecuaciones cinéticas propuestas por Gomez et al. (1994) se pudo establecer que la concentración óptima para el metabolismo bacteriano era de 10 g/L (de Ory et al. 2002).

Aunque las BAA son tolerantes a concentraciones de ácido acético que normalmente resultan tóxicas para la mayoría de los microorganismos, su grado de tolerancia a este compuesto depende de la especie y de la fase de crecimiento en que se encuentre. Por lo tanto, el efecto del ácido acético sobre el crecimiento de las BAA es función de las concentraciones del sustrato y del producto y de las condiciones de crecimiento (Gullo et al., 2014).

Las especies descritas con mayor grado de resistencia al ácido acético son: *Gluconacetobacter europaeus*, *Gluconacetobacter intermedius*, *Gluconacetobacter oboediens* (actualmente definidas por Yamada et al. (2012) como *Komagataeibacter europaeus*, *Komagataeibacter intermedius* y *Komagataeibacter oboediens*, respectivamente) y *Gluconacetobacter entanii* (Raspor & Goranovic, 2008; Gullo et al., 2014). Trcek et al. (2006) indicaron que la elevada resistencia al ácido acético que presentó *Gluconacetobacter*

europaeus (10 %) fue atribuida a la mayor actividad de la ADH y a su mayor estabilidad frente a ese ácido. La mayor actividad de la ADH que podría producir un pool energético superior disponible para procesos como la bomba de eliminación de acetato/ácido acético en la membrana citoplasmática, se ha reportado como una maquinaria adicional en el mecanismo de resistencia a la acidez en BAA (Trček et al., 2006).

I.4.2. Concentración de oxígeno disuelto

La hipersensibilidad de las BAA a deficiencias de oxígeno (Nieto, 1991) pueden desacelerar el proceso de bioconversión o dejarlas inviables, a menos que el medio sea continuamente oxigenado (García-García et al. 2009; Schlepütz et al. 2013) . Por este motivo y por el consumo propio de este gas en la reacción de acetificación, se requieren mantener altos niveles de aireación durante el proceso biotecnológico (García Garibay et al., 2007).

La concentración de oxígeno disuelto en el caldo de cultivo durante la fermentación tiene un efecto significativo en el crecimiento bacteriano y en la velocidad de producción de ácido acético (velocidad de acetificación). Los factores más importantes que afectan el oxígeno disuelto son la velocidad de transferencia de este gas a la fase líquida, la velocidad de flujo de aire y la presión parcial de oxígeno del aire suministrado (Garrido-Vidal et al. 2003; Rubio-Fernández et al. 2004).

Según la teoría de la doble película, la transferencia de oxígeno del gas hacia los microorganismos debe atravesar las siguientes resistencias: transferencia del oxígeno desde el interior de la burbuja hasta la interfase gas-líquido, movimiento a través de la interfase gas-líquido, difusión a través de la película líquida relativamente inmóvil que rodea la burbuja, transporte a través del fluido, difusión a través de la película líquida relativamente inmóvil que rodea las células, movimiento a través de la interfase líquido-célula y, finalmente, transporte a través del citoplasma hasta el sitio de la reacción. Sin embargo, cuando el caldo de fermentación se encuentra en mezcla perfecta, la mayor resistencia a la transferencia de oxígeno corresponde a la película

líquida que rodea las burbujas de gas. De esta manera la velocidad de acetificación depende de la velocidad de transferencia de materia a través de esta película y se expresa mediante la ecuación I.1:

$$R_{O_2} = k_L a (C^* - C) \quad (I.1)$$

Donde: k_L = coeficiente de transferencia de materia en la fase líquida.

a = área interfacial líquido-gas por unidad de volumen de fluido.

C = concentración de oxígeno en el cultivo.

C^* = concentración de oxígeno en el cultivo en equilibrio con la fase gaseosa (solubilidad).

Es decir, el proceso completo es impulsado por la diferencia entre la concentración de oxígeno en el gas y en la bacteria (Doran, 1998; García-García et al., 2009) .

Una elevada aireación es indeseable para el mejoramiento de la velocidad de acetificación, ya que reduce el rendimiento del proceso y las características organolépticas del vinagre, puesto que tiende a volatilizar los componentes volátiles tales como el etanol y el ácido acético. Por ello algunos autores han sugerido el uso de aire enriquecido en oxígeno a bajas velocidades de flujo (Rubio-Fernández et al., 2004).

Por estas razones, la elección del sistema de distribución gas-líquido tiene un efecto considerable en el diseño del reactor. El objetivo principal es lograr transferencias de oxígeno elevadas y eficientes, sin importantes reducciones en el rendimiento debidas a pérdidas de sus componentes volátiles (García-García et al., 2009). Efectivamente, la productividad de los procesos fermentativos industriales es a menudo limitada por la velocidad de transferencias de oxígeno (Fregapane, Nieto, & Salvador, 1999).

I.4.3. Temperatura

La temperatura óptima para procesos industriales de acetificación es de aproximadamente 30 °C (Adams, 1998). de Ory et al. (1998) encontraron que una temperatura de 30,9 °C maximizaba la velocidad específica de crecimiento de *Acetobacter aceti* durante la producción de vinagre de vino, mientras que el crecimiento era completamente inhibido a temperaturas superiores a 35°C e inferiores a 8 °C.

Temperaturas superiores al óptimo inducen la desnaturalización de las proteínas y de los ácidos nucleicos y causan daño celular, y con ello se pueden reducir irreversiblemente las funciones metabólicas celulares. Esto podría causar serios inconvenientes tanto en la velocidad del proceso como en el rendimiento. Este último resultaría afectado debido a la evaporación de compuestos volátiles entre los que se incluyen el sustrato (etanol), el producto intermedio (acetaldehído) y el producto final (ácido acético) (de Ory et al., 1998; Tesfaye et al., 2003). Para evitar estos efectos perjudiciales y teniendo en cuenta también que se trata de una reacción exotérmica, es imprescindible el empleo de sistemas de enfriamiento y un estricto control de esta variable.

El criterio de selección de las cepas se comenzó a fundamentar no sólo en su pureza sino también en la resistencia a temperaturas y concentraciones de sustrato y producto relativamente altas (Teskaye et al., 2002). Se han aislado cepas de *Acetobacter* a partir de frutas que presentaron elevada velocidad de acetificación a 38 – 40 °C (Saeki et al. 1997), así como de especies de *A. tropicalis* y *A. pasteurianus* en la región del sub-Sahara África, capaces de producir un elevado contenido en ácido acético a 35 y 38 °C, respectivamente (Ndoye et al., 2006). Recientemente se obtuvieron cepas termo-adaptadas de *A. pasteurianus* (SKU1108), que desarrollan la fermentación acética a 40°C (Matsutani et al., 2013).

I.5. Operaciones posteriores al proceso fermentativo

El vinagre descargado del fermentador es una suspensión compleja que esencialmente contiene microorganismos y restos celulares, con un elevado grado de turbidez, especialmente si fue obtenido por cultivo sumergido. Para reducir la concentración inicial de sólidos, la suspensión debe ser primeramente clarificada con agentes floculantes adecuados, para eliminar los coloides que generarían un producto inestable a causa de la precipitación de sólidos durante el almacenamiento y posterior embotellado (García-García et al., 2009). Luego se realiza la filtración, cuya finalidad es la separación definitiva de las impurezas del vinagre. Las operaciones de clarificación y filtración pueden ser complementarias o excluyentes entre sí (Ormaechea Landa, 1991).

La acción de los floculantes permite la formación de complejos coloidales por adsorción con sustancias insolubles del vinagre como los polifenoles, taninos, proteínas. Los clarificantes orgánicos (gelatina, albúmina, caseinato potásico) son más eficaces en cuanto al grado de limpieza y estabilidad del producto obtenido, pero alteran la composición del vinagre. Sin embargo, los clarificantes inorgánicos (bentonita es el más utilizado) forman un gel en solución acuosa que atrapa las partículas enturbadoras y favorece la decantación rápida, sin alterar la composición del producto. Para una mejor eficacia en el tratamiento, ambos coagulantes (orgánicos e inorgánicos) suelen utilizarse conjuntamente (Ormaechea Landa, 1991).

La filtración es la operación más importante de los postratamientos ya que asegura la estabilidad y seguridad del producto final. De hecho, los requerimientos de calidad de un vinagre para el consumo humano implican la remoción de la materia en suspensión, además de la coloidal, ya que de otra manera afectarían su estabilidad (García-García et al., 2009).

El método tradicional de filtración, en el cual la alimentación se hace pasar a través de filtros en la misma dirección que el filtrado, ha sido ampliamente reemplazado por el sistema tangencial. Este procedimiento implica la circulación de la suspensión a través de una cámara inundada en

contacto tangencial con la superficie de la membrana de filtración. Una ligera sobrepresión en la cámara provoca el paso de líquido al otro lado de la membrana. El tipo de flujo utilizado previene la acumulación de sólidos en la membrana, con lo cual se evita la necesidad de coadyuvantes de filtrado. Uno de los diseños más efectivos es el de cartuchos empaquetados con membranas de fibra hueca. Además, el producto obtenido presenta una calidad óptima ya que se eliminan las impurezas típicas relacionadas con el color y aroma (García-García et al., 2009).

Una vez clarificado el vinagre, se lo puede transferir a barricas de madera (normalmente de roble), ya que allí adquiere características organolépticas particulares generadas mediante procesos físicos, químicos y físico-químicos (Tesfaye et al., 2002). Los principales cambios implican pérdida de agua a través de los poros de la madera, aumento en la concentración de ácido acético, extracción de compuestos fenólicos de la madera y formación de compuestos aromáticos, principalmente ésteres (Tesfaye, Morales, Benítez, García-Parrilla, & Troncoso, 2004).

Como alternativa al uso de las barricas de roble, principalmente por razones económicas, se ha estudiado el envejecimiento de vino y vinagre utilizando virutas de roble (Morales et al. 2004; Tesfaye et al. 2004; Durán Guerrero et al. 2011) Estos estudios demostraron un envejecimiento acelerado del vinagre, con una extracción de compuestos fenólicos similar a la alcanzada utilizando barricas, lo cual podría implicar una importante reducción en los costos de producción. Recientemente se ha patentado un procedimiento de elaboración de vinagres en el que se unifica en una sola etapa la fermentación acética y el envejecimiento. Se trata de un proceso de acetificación en cultivo sumergido, en el que se introducen virutas de roble para la obtención de un producto de similares propiedades físico-químicas y sensoriales que el producido mediante envejecimiento tradicional en botas de roble (García Barroso, Durán Guerrero, Castro Mejías, Natera Marín, & Cejudo Basante, 2013).

Si el vinagre no pasa por la etapa de envejecimiento en madera y se destina a un almacenamiento en botella, también puede experimentar cambios

físico-químicos y organolépticos debido a la evolución, oxidación y envejecimiento de ciertos compuestos específicos del vinagre, tales como azúcares reductores, ácido cítrico, dióxido de azufre, gomas, pectinas y mucílagos. La presencia de oxígeno normalmente desencadena una serie de reacciones químicas y enzimáticas, tales como: oscurecimiento del color, presencia de precipitados marrón, pérdida de densidad y cuerpo, pérdida de aromas. Estos cambios dependen del tipo de vinagre, de la materia prima, del proceso de elaboración y de las condiciones de almacenamiento (Casale, Sáiz Abajo, González Sáiz, Pizarro, & Forina, 2006).

I.6. Mercado de vinagres

Los vinagres que se comercializan dependen de las materias primas disponibles en cada país. Así, en EEUU, el principal productor mundial de vinagres, cerca del 70% de la población consume vinagres de granos, y en menor proporción, de manzana y de sidra. En Francia se prefieren los de vino blanco o tinto, mientras que en Gran Bretaña los favoritos son los de cebada malteada. El vinagre de alcohol de caña es el de mayor consumo en Latinoamérica, mientras que en Japón y otros países asiáticos, lo es el vinagre de arroz. Dentro de los llamados vinagres especiales, en España, el producto más conocido es el procedente de Jerez, cuya elaboración se realiza con el sistema de Soleras y Criaderas y añejado exclusivamente en madera de roble californiano. Por otro lado, en Italia se destaca el Aceto Balsámico elaborado a partir de uvas blancas Trebbiano, originario de Módena, en el norte de Italia, y posicionado como el mejor Aceto del mundo no sólo por su historia sino por su método de elaboración (Gurisatti, 2012).

Según las fuentes del mercado, en Argentina se consumen unos 30 millones de litros de vinagre por año, sin contar Acetos y otras variantes saborizadas, que redondean a la fecha 2,4 millones de litros más. Si bien el crecimiento es lento, las marcas apuestan por hacer crecer la categoría tanto en volumen como en profundidad (J. Hidalgo, 2013).

En la figura I.6 se puede observar que durante los años 2000-2001 mientras que en el mercado cambiario era 1\$ = 1 US\$, la importación fue de gran magnitud. Sin embargo, la posterior devaluación de la moneda argentina produjo una importante reducción de las adquisiciones. Las exportaciones tuvieron un crecimiento leve entre 2003 y 2005, recuperándose a partir de 2006 para alcanzar en 2008 una marca significativa. Este incremento expresa la mayor inserción en los mercados internacionales, sustentada por un buen nivel de calidad del producto y posicionándose con un precio competitivo (Negri & Bonvini, 2009).

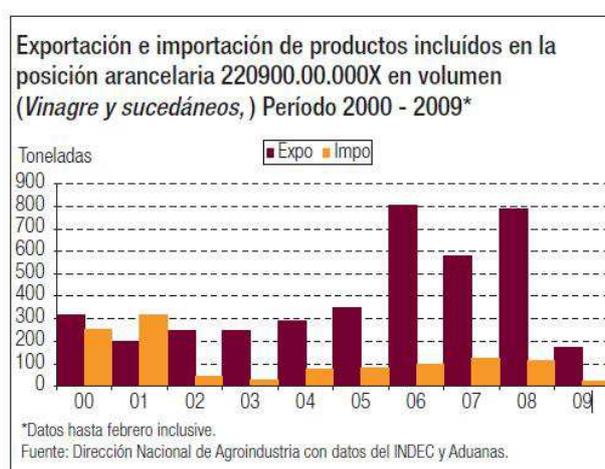


Figura I.6. Volumen de exportaciones e importaciones de vinagres y sucedáneos.

Mientras que el Aceto Balsámico se produce en pequeñas cantidades, el 90% se destina al consumo familiar y el 10% restante a la industria. El 68% de la producción total corresponde al vinagre de alcohol, el 19% al de vino y el 13% al de manzana. Las empresas elaboradoras están ubicadas, principalmente, en las provincias de Buenos Aires, Córdoba, San Juan y Mendoza (J. Hidalgo, 2013).

Los vinagres se comercializan en concentraciones entre 4 y 6% de ácido acético, mientras que los más concentrados son empleados para usos domésticos, como blanqueador y limpiavidrios (J. Hidalgo, 2013).

Si bien se han publicado algunos trabajos acerca de la producción de vinagres de arándanos (Su & Chien, 2010, 2007; C. Hidalgo et al., 2013), hasta la fecha no se han reportado estudios sobre la elaboración de vinagres a partir de frutas cítricas.

I.7. Mercado de frutas cítricas

La citricultura constituye una de las principales actividades económicas de la República Argentina e incluye el cultivo del limón, naranja, mandarina y pomelo. La producción citrícola se localiza en dos regiones denominadas NOA (noroeste argentino), donde se producen principalmente limones y en menor medida, naranjas y pomelos y NEA (noreste argentino), donde predominan las mandarinas y naranjas (Figura I.7).



Figura I.7. Distribución de la actividad citrícola en la República Argentina.

Durante la temporada 2012/2013 Argentina se ubicó en el 8º lugar entre los principales productores mundiales de cítricos, con un total de 2.824.000 t, sin embargo se estima una disminución en estas cantidades para 2013/2014 (1.670.000 t.) como consecuencia de la ocurrencia de fenómenos climáticos importantes que afectaron la campaña. A esta situación también debe agregarse la tendencia en aumento de los últimos seis años, referida a los incrementos en los costos en dólares de insumos y servicios, con fuerte efecto de la mano de obra (FEDERCITRUS, 2014).

Dentro del mapa citrícola nacional, la provincia de Entre Ríos (Figura I.8) es la principal productora de naranjas con un 52 % de la producción nacional (FEDERCITRUS, 2014).

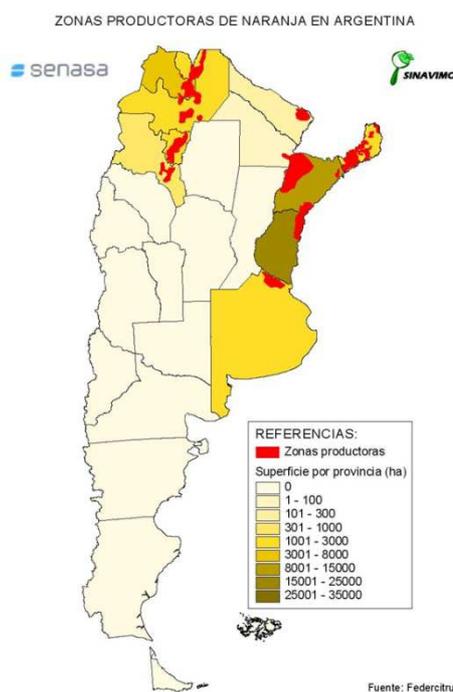


Figura I.8. Zonas productoras de naranjas en la República Argentina.

Si bien el principal destino de la producción de naranjas es la distribución en fresco en mercado interno, el porcentaje de fruta que se envía para industrialización es elevado y representa una proporción muy similar a la

destinada a exportación (Tabla I.2). La fruta que se destina a industrialización suele ser el descarte de los productos frescos puesto que los precios de estos últimos son más altos.

TABLA I.2. Destino de la producción de naranjas en la República Argentina. (FEDERCITRUS, 2014).

	2010	2011	2012	2013
Mercado interno	57 %	68 %	63 %	72 %
Exportación	20 %	15 %	12 %	13 %
Industria	23 %	17 %	25 %	15 %

Actualmente la industrialización de los descartes de naranjas incluye la elaboración de jugo concentrado, aceites esenciales y cáscara deshidratada. Los dos primeros son utilizados en la elaboración de gaseosas y otras bebidas sin alcohol, mientras que la cáscara se utiliza para la fabricación de pectina (Dansa, Céspedes, Nocera, & Salvarregui, 2005).

Los promisorios resultados obtenidos en la elaboración de "vino de naranja" con muy interesantes y apetecibles propiedades sensoriales, conforme a la opinión de los jueces que integran paneles de degustación entrenados a tal fin, hacen suponer que es factible obtener un vinagre de jugo de naranja con buenas cualidades organolépticas (Schwab, 2006).

Aunque el vinagre obtenido a partir de jugos cítricos podría considerarse como un subproducto de la industria debido a la importante producción de citrus en esta región, también constituirían, junto con los vinos cítricos, una novedad para el mercado argentino, ya que formarían parte de productos típicos con características regionales.

I.8. Mercado de arándanos

El arándano es una fruta del grupo de los “berries”, de consumo tradicional en países del Hemisferio Norte como EE.UU., Alemania, Francia, Italia e Inglaterra. La demanda generada por estos países durante los períodos invernales, de carencia de estos frutos, sumado a la posibilidad de producir en contra-estación, impulsó la introducción de su cultivo en la República Argentina a principios de la década de los ´90.

Las tres zonas de la Argentina con mayor producción se identifican como NOA, Centro y NEA (Figura I.9) (Argentinean Blueberry Committee, n.d.)



Figura I.9. Zonas productoras de arándanos en la República Argentina.

La región ubicada sobre el margen del río Uruguay en la provincia de Entre Ríos (NEA), específicamente la ciudad de Concordia, ha tenido un notable desarrollo probablemente debido a las condiciones agroecológicas de la región, una de las más favorables del país para lograr el óptimo desarrollo de la planta y obtener fruta de calidad (Anderson, Kulczycki, Vergara, & Tejedor, 2006) (Figura I.10).



Figura I.10. Principales ciudades productoras de arándanos en Argentina.

De esta manera, la Argentina se constituyó en un importante proveedor de arándanos a EE.UU., Canadá y la U.E., principalmente en la ventana de mercado que va desde fines de setiembre a noviembre; sin embargo, el consumo interno está muy poco desarrollado.

Entre los años 2003 y 2012 la producción total de arándanos en Argentina pasó de 845 t a 20300 t. Este incremento de la producción se debió tanto a los nuevos productores que se dedicaron a plantar arándanos, con el consiguiente aumento de la superficie de cultivo, como también al incremento de la producción debido al crecimiento de las plantaciones más antiguas.

En el año 2008, entre el 80 y 85% del arándano producido se destinó a exportación, el 3% a mercado interno para consumo en fresco e industrialización, mientras que el resto se descartó (Divo de Sesar et al., 2008). Esta tendencia se mantuvo en el año 2013: 85% se destinó a la exportación de fruto fresco, 10% para mercado interno y el 5% se descartó (Asociación de Productores de Arándanos de la Mesopotamia Argentina, 2013).

En los últimos años se ha incrementado la proporción de descarte debido a múltiples factores, entre ellos el aumento de la productividad que provocó una disminución del precio de venta, con lo cual el productor no

alcanzó a cubrir los costos de cosecha y, por ende, se detuvo la recolección de las bayas. Además influyeron la selectividad de la demanda, el mercado interno poco desarrollado y problemas eventuales como enfermedades, presencia de defectos y frutas con bajo calibre. Estos factores han provocado, además del lógico impacto socioeconómico, un impacto ambiental adverso ya que algunos productores se deshicieron de las bayas no comercializadas en campos a cielo abierto, ocasionando una elevada contaminación ambiental (Zapata, 2014).

En la ciudad de Concordia, provincia de Entre Ríos, se han realizado algunas investigaciones orientadas a la obtención de productos de arándanos como extractos de antocianinas, jugo concentrado, pasas de arándanos o bebidas isotónicas (Larrocca, 2010; Vuarant et al., 2010; Zapata, 2014). Además, en el mercado local se venden algunas producciones artesanales de vino de arándanos y mermeladas, aunque la cantidad de bayas industrializadas en estas producciones no ha sido significativa y la calidad sensorial, nutricional y el contenido de fitonutrientes de los productos elaborados necesitaría ser optimizada.

Por todo lo expuesto se considera de interés generar experiencias en I+D+i en el desarrollo de productos con posibilidades de industrialización, en este caso el vinagre de arándanos, partiendo de materias primas ricas en compuestos antioxidantes.

I.9. Bibliografía

- Adachi, O., Miyagawa, E., Shinagawa, E., Matsushita, K., & Ameyama, M. (1978). Purification and properties of particulate alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42, 2331–2340.
- Adachi, O., Moonmangmee, D., Toyama, H., Yamada, M., Shinagawa, E., & Matsushita, K. (2003). New developments in oxidative fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(6), 643–653.

- Adams, M. R. (1998). Vinegar. In B. J. B. Wood (Ed.), *Microbiology of fermented foods*. (pp. 1–44). Blackie Academic & Professional.
- Adams, M. R., & Moss, M. O. (1997). *Microbiología de los Alimentos*. (E. A. S.A., Ed.). Zaragoza, España.
- Ameyapoh, Y., Leveau, J.-Y., Karou, S., Bouix, M., Sossou, S. K., & de Souza, C. (2010). Vinegar production from togolese local variety mangovi of mango *Mangifera indica* Linn. (Anacardiaceae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 13(3), 132–137.
- Anderson, C., Kulczycki, C., Vergara, A., & Tejedor, M. C. (2006). Cosecha de arándanos. Buenas Prácticas Agrícolas. Disponible en: http://www.inta.gov.ar/concordia/actividad/eventos/material_Curso_2006.pdf.
- Argentinean Blueberry Committee. (n.d.). Estadísticas. Disponible en: <http://www.argblueberry.com/es/estadisticas.html>
- Arnold, S., Becker, T., Delgado, A., Emde, F., & Enenkel, A. (2002). Optimizing high strength acetic acid bioprocess by cognitive methods in an unsteady state cultivation. *Journal of Biotechnology*, 97(2), 133–145.
- Asociación de Productores de Arándanos de la Mesopotamia Argentina. (2013). *No Title*. Concordia, Entre Ríos.
- Bar, R., Gainer, J. L., & Kirwan, D. J. (1987). An unusual pattern of product inhibition: Batch acetic acid fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 29(6), 796–798.
- Beheshti-Maal, K., & Shafiei, R. (2009). Isolation and identification of an *Acetobacter* strain from iranian white-red cherry with high acetic acid productivity as a potential strain for cherry vinegar production in food and agriculture biotechnology. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 54, 201–204.
- Beheshti-Maal, K., & Shafiei, R. (2011). A thermotolerant *Acetobacter* strain isolated from iranian peach suitable for industrial microbiology. *Asian Journal of Biological Sciences*, 244–251.

- Beheshti-Maal, K., Shafiei, R., & Kabiri, N. (2010). Production of apricot vinegar using an isolated *Acetobacter* strain from iranian apricot, 177–180.
- Belly, R. T., & Claus, G. W. (1972). Effect of amino acids on the growth of *Acetobacter suboxydans*. *Archives of Microbiology*, 83, 237–245.
- BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO. Norma de Calidad de Vinagre (2012). España.
- Bortolini, F., Sant'Anna, E. S., & Torres, R. C. (2001). Comportamento das fermentações alcoólica e acética de sucos de kiwi (*Actinidia deliciosa*): composição dos mostos e métodos de fermentação acética. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 21(2), 236–243.
- Casale, M., Sáiz Abajo, M. J., González Sáiz, J. M., Pizarro, C., & Forina, M. (2006). Study of the aging and oxidation processes of vinegar samples from different origins during storage by near-infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 557(1-2), 360–366.
- Cassanego Ilha, E., Sant'anna, E. S., Oliveira Tôrres, R. C., Simas Porto, A. C., & Meinert, E. M. (2000). Utilization of bee (*Apis mellifera*) honey for vinegar production. *Boletim Do Centro Pesquisa Processamento de Alimentos*, 18(1), 39–50.
- Chinnawirotpisan, P., Theeragool, G., Limtong, S., Toyama, H., Adachi, O. O., & Matsushita, K. (2003). Quinoprotein alcohol dehydrogenase is involved in catabolic acetate production, while NAD-dependent alcohol dehydrogenase in ethanol assimilation in *Acetobacter pasteurianus* SKU1108. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(6), 564–571.
- Cleenwerck, I., & De Vos, P. (2008). Polyphasic taxonomy of acetic acid bacteria: An overview of the currently applied methodology. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 2–14.
- Dansa, A. M., Céspedes, V. M., Nocera, P., & Salvarregui, C. (2005). Perfil descriptivo de la cadena cítrica. Disponible en: [http://www.minagri.gob.ar/dimeagro/publicaciones/perspectivas/Perfiles descriptivos/Cadena de cítricos.pdf](http://www.minagri.gob.ar/dimeagro/publicaciones/perspectivas/Perfiles%20descriptivos/Cadena%20de%20cítricos.pdf)

- De Ley, J., Gillis, M., & Swings, J. (1984). Family VI. Acetobacteraceae. En N. . Krieg & J. G. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (pp. 267–278). Baltimore: Williams and Wilkins.
- de Ory, I., Romero, L., & Cantero, D. (1998). Modelling the kinetics of growth of *Acetobacter aceti* in discontinuous culture: influence of the temperature of operation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, 189–193.
- de Ory, I., Romero, L. E., & Cantero, D. (2002). Optimum starting-up protocol of a pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering*, 52(1), 31–37.
- de Ory, I., Romero, L. E., & Cantero, D. (2004). Operation in semi-continuous with a closed pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering*, 63(1), 39–45.
- Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., & Prust, C. (2002). Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60, 233–242.
- Divo de Sesar, M., Pepe, F., Massara, D., Kaen, R., Lopez, V., Stella, A., & Vilella, F. (2008). Variación en el contenido de polifenoles y antocianinas en frutos de los géneros *Vaccinium* y *rubís* asociada a diversos factores condicionantes. In *4° Simposio Internacional y 2° Congreso Latinoamericano de Arándanos y Berries*. (pp. 153–165). Argentina. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.
- Doran, P. M. (1998). *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. Huesca, España: Editorial Acribia S.A.
- Drysdale, G. S., & Fleet, G. H. (1988). Acetic acid bacteria in winemaking: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39(2), 143–154.
- Du Toit, W. J., & Pretorius, I. S. (2002). The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking. *Annals of Microbiology*, 179, 155–179.
- Durán Guerrero, E., Mejías, R. C., Marín, R. N., Bejarano, M. J. R., Dodero, M. C. R., & Barroso, C. G. (2011). Accelerated aging of a Sherry wine vinegar

on an industrial scale employing microoxygenation and oak chips. *European Food Research and Technology*, 232(2), 241–254.

Dutta, D., & Gachhui, R. (2007). Nitrogen-fixing and cellulose-producing *Gluconacetobacter kombuchae* sp. nov., isolated from Kombucha tea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 353–357.

FEDERCITRUS. (2014). La Actividad Citrícola Argentina 2014. Disponible en: <http://www.federcitrus.org/noticias/upload/informes/Act Citricola 14.pdf>

Fregapane, G., Nieto, J., & Salvador, M. D. (1999). Wine vinegar production using a noncommercial 100-litre bubble column dynamic sparger. *Biotechnology and Bioengineering*, 1–6.

Fu, L., Chen, S., Yi, J., & Hou, Z. (2013). Effects of different fermentation methods on bacterial cellulose and acid production by *Gluconacetobacter xylinus* in Cantonese-style rice vinegar. *Food Science and Technology International*, 20(5), 321–331.

Fugelsang, K., & Edwards, C. (2007). *Wine Microbiology. Practical Applications and Procedures* (2° edition.). Springer.

Gándara, D., & Dagognet, F. (2008). *Pasteur: vida, pensamiento y obra. Colección "Grandes Pensadores."* Barcelona, España: Planeta DeAgostini S.A.

García Barroso, C., Durán Guerrero, E., Castro Mejías, R., Natera Marín, R., & Cejudo Basante, M. J. (2013). Procedimiento de obtención de vinagres. España. Disponible en: <http://patentados.com/patente/procedimiento-de-obtencion-de-vinagres/>

García Garibay, M., Quinteros Ramirez, R., & López Munguía, A. (2007). *Biología Alimentaria*. (Editorial LIMUSA SA. Grupo Noriega Editores., Ed.). México.

García-García, I., Cantero-Moreno, D., Jiménez-Ot, C., Baena-Ruano, S., Jiménez-Hornero, J., Santos-Dueñas, I., ... Barja, F. (2007). Estimating the mean acetification rate via on-line monitored changes in ethanol during

a semi-continuous vinegar production cycle. *Journal of Food Engineering*, 80(2), 460–464.

García-García, I., Santos-Dueñas, I. M., Jiménez-Ot, C., Jiménez-Hornero, J. E., & Bonilla-Venceslada, J. L. (2009). Vinegar Engineering. En: L. Solieri & P. Giudici (Eds.), *Vinegars of the world* (pp. 97–120). Milan: Springer-Verlag Italia S.r.l.

Garrido-Vidal, D., Pizarro, C., & González-Sáiz, J. M. (2003). Study of process variables in industrial acetic fermentation by a continuous pilot fermentor and response surfaces. *Biotechnology Progress*, 19(5), 1468–1479.

Gomez, J. M., Romero, L. E., Caro, I., & Cantero, D. (1994). Cinética de crecimiento de *Acetobacter aceti* sobre sustrato alcohólico. *Información Tecnológica*, 5(6), 55–63.

Gonzalez Benito, A. (2005). *Application of molecular techniques for identification and enumeration of acetic acid bacteria*. Universitat Rovira I Virgili de Tarragona.

Guillamón, J. M., & Mas, A. (2011). Acetic Acid Bacteria. En: A. V. Carrascosa, R. Muñoz, & R. Gonzalez (Eds.), *Molecular Wine Microbiology* (1° ed., pp. 227–255). Academic Press, Elsevier.

Guizani, N., & Mothershaw, A. (2006). Fermentation principles. In E. Hui, Y. H. (Ed.), *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. (pp. 63/2–28). London.: Taylor & Francis.

Gullo, M., Caggia, C., De Vero, L., & Giudici, P. (2006). Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar”. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2), 209–12.

Gullo, M., De Vero, L., & Giudici, P. (2009). Succession of selected strains of *Acetobacter pasteurianus* and other acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 2585–2589.

- Gullo, M., & Giudici, P. (2009). Acetic acid bacteria taxonomy from early descriptions to molecular techniques. En: Solieri Lisa & G. Paolo (Eds.), *Vinegars of the World* (pp. 41–60). Milan, Italia: Springer-Verlag Italia S.r.l.
- Gullo, M., Verzelloni, E., & Canonico, M. (2014). Aerobic submerged fermentation by acetic acid bacteria for vinegar production: process and biotechnological aspects. *Process Biochemistry*, 49(10), 1571–1579.
- Gurisatti, V. (2012, July). Vinagres & Acetos: el costado más ácido del vino. *Conexión Brando*. Disponible en: <http://www.conexionbrando.com/1487089-vinagres-amp-acetos-el-costado-mas-acido-del-vino>
- Haghshenas, B., Nami, Y., Abdullah, N., Radiah, D., Rosli, R., & Khosroushahi, A. Y. (2014). Anticancer impacts of potentially probiotic acetic acid bacteria isolated from traditional dairy microbiota. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 690–697.
- Hidalgo, C., García, D., Romero, J., Mas, A., Torija, M. J., & Mateo, E. (2013). *Acetobacter* strains isolated during the acetification of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) wine. *Letters in Applied Microbiology*, 57(3), 227–232.
- Hidalgo, C., Mateo, E., Cerezo, A. B., & Torija, M. (2010). Technological process for production of persimmon and strawberry vinegars, 55–61.
- Hidalgo, J. (2013). Vinagre: la nueva estrella de la mesa gourmet. *PlanetaJOY*. Disponible en: <http://www.planetajoy.com/?Vinagre:+la+nueva+estrella+de+la+mesa+gourmet&page=ampliada&id=5377>.
- Holt, J. M., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. Y., & Williams, S. T. (1994). Genus *Acetobacter* and *Gluconobacter*. En: Williams & Wilkens (Ed.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th edn., pp. 71–84). Maryland, U.S.A.

- Hu, Z. C., Zheng, Y. G., & Shen, Y. C. (2011). Use of glycerol for producing 1,3-dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans* in an airlift bioreactor. *Bioresource Technology*, 102(14), 7177–7182.
- Hu, Z., Liu, Z., & Zheng, Y. (2010). Production of 1, 3-dihydroxyacetone from glycerol by *Gluconobacter oxydans* ZJB09112. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 340–345.
- Jara Campos, C. I. (2009). *Desarrollo de métodos de biología molecular para el análisis directo de bacterias acéticas de vinagre*. Universitat Rovira i Virgili.
- Jojima, Y., Mihara, Y., Suzuki, S., Yokozeki, K., Yamanaka, S., & Fudou, R. (2004). *Saccharibacter floricola* gen. nov., sp. nov., a novel osmophilic acetic acid bacterium isolated from pollen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(Pt 6), 2263–7.
- Kaur, P., Kocher, G. S., & Phutela, R. P. (2011). Production of tea vinegar by batch and semicontinuous fermentation. *Journal of Food Science and Technology*, 48(6), 755–758.
- Kerstens, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K., & Swings, J. (2006). The family *Acetobacteraceae*: The genera *Acetobacter*. En: *Prokaryotes* (pp. 163–200).
- Kittelman, M., Stamm, W. W., Follmann, H., & Triiper, H. G. (1989). Isolation and classification of acetic acid bacteria from high percentage vinegar fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1(1), 47–52.
- Larrocca, A. H. (2010). Desarrollo de una bebida isotónica utilizando jugo de arándanos. En: C. O. Vuarant (Ed.), *Arándanos, Avances Científicos-Tecnológicos en la región de Salto Grande*. Concordia, Entre Ríos: Facultad de Ciencias de la Alimentación. Universidad Nacional de Entre Ríos.
- Leonel, M., Suman, P. A., & García, E. L. (2015). Production of ginger vinegar. *Ciência E Agrotecnologia*, 39(2), 183–190.

- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2004). *Brock. Biología de los Microorganismos* (10° edició.). Madrid: Pearson Prentice Hall.
- Martínez Montalvo, M. C. (2002). La elaboración del vinagre en el s. XIX. Discordia y enfrentamiento químico-biológico. En: *Actas VIII Congreso de la Sociedad Española de Historia de las Ciencias y de las Técnicas* (pp. 687–701).
- Matsushita, K., Toyama, H., & Adachi, O. (1994). Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 36, 247–301.
- Matsutani, M., Nishikura, M., Saichana, N., Hatano, T., Masud-Tippayasak, U., Theergool, G., ... Matsushita, K. (2013). Adaptive mutation of *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 enhances acetic acid fermentation ability at high temperature. *Journal of Biotechnology*, 165(2), 109–19.
- Mazza, S., & Murooka, Y. (2009). Vinegars through the ages. En: L. Solieri & P. Giudici (Eds.), *Vinegars of the world* (pp. 17–40). Springer-Verlag Italia S.r.l.
- Moonmangmee, S., Kawabata, K., Tanaka, S., Toyama, H., Adachi, O., & Matsushita, K. (2002). A novel polysaccharide involved in the pellicle formation of *Acetobacter aceti*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(2), 192–200.
- Morales, M. L., Benitez, B., & Troncoso, a. M. (2004). Accelerated aging of wine vinegars with oak chips: evaluation of wood flavour compounds. *Food Chemistry*, 88(2), 305–315.
- Nakano, S., & Fukaya, M. (2008). Analysis of proteins responsive to acetic acid in *Acetobacter*: molecular mechanisms conferring acetic acid resistance in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 54–9.
- Nanba, A., Tamura, A., & Nagai, S. (1984). Synergistic effects of acetic acid and ethanol on the growth of *Acetobacter* sp. *Journal of Fermentation Technology*, 62, 501–505.

- Ndoye, B., Lebecque, S., Dubois-Dauphin, R., Tounkara, L., Guiro, A.-T., Kere, C., ... Thonart, P. (2006). Thermoresistant properties of acetic acids bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa and destined to industrial vinegar. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 916–923.
- Negri, G., & Bonvini, N. (2009). Aceto balsámico - Aromas, sabores y secretos. *Alimentos Argentinos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGPyA).*, 46, 61–64.
- Nieto, F. J. (1991). Algunos aspectos de la tecnología de la fermentación acética. En: C. Llaguno Marchena & M. C. Polo (Eds.), *El Vinagre de Vino* (pp. 69–103). Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Ormaechea Landa, A. R. (1991). Proceso industrial de elaboración de vinagre. En: C. Llaguno Marchena & M. C. Polo (Eds.), *El Vinagre de Vino* (pp. 49–68). Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Qazi, G. N., Parshad, R., Verma, V., Chopra, C. L., Buse, R., Trager, M., & Onken, U. (1991). Diketo-gluconate fermentation by *Gluconobacter oxydans*. *Enzyme and Microbial Technology*, 13(6), 504–507.
- Qi, Z., Yang, H., Xia, X., Xin, Y., Zhang, L., Wang, W., & Yu, X. (2013). A protocol for optimization vinegar fermentation according to the ratio of oxygen consumption versus acid yield. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 304–309.
- Raspor, P., & Goranovic, D. (2008). Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(2), 101–124.
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., & Lonvaud, A. (2003). *Tratado de Enología. 1. Microbiología del vino. Vinificaciones*. Editorial Hemisferio Sur.
- Rubio-Fernández, H., Salvador, M. D., & Fregapane, G. (2004). Influence of fermentation oxygen partial pressure on semicontinuous acetification for wine vinegar production. *European Food Research and Technology*, 219(4), 393–397.

- Saeki, A., Taniguchi, M., Matsushita, K., Toyama, H., Theeragool, G., Lotong, N., & Adachi, O. (1997). Microbiological aspects of acetate oxidation by acetic acid bacteria, unfavorable phenomena in vinegar fermentation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(2), 317–323.
- Saeki, A., Theeragool, G., Matsushita, K., Toyama, H., Lotong, N., & Adachi, O. (1997). Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperatures. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61(1), 138–145.
- Schlepütz, T., Gerhards, J. P., & Büchs, J. (2013). Ensuring constant oxygen supply during inoculation is essential to obtain reproducible results with obligatory aerobic acetic acid bacteria in vinegar production. *Process Biochemistry*, 48(3), 398–405.
- Schvab, M. del C. (2006). *Bebida alcohólica de jugo de naranja: estudio de los parámetros de calidad, influencia de las variables de proceso y caracterización del producto*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Silva, M. E., Torres Neto, A. B., Silva, W. B., Silva, F. L. H., & Swarnakar, R. (2007). Cashew wine vinegar production: alcoholic and acetic fermentation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 24(02), 163–169.
- Sokollek, S. J., Hertel, C., & Hammes, W. P. (1998). Cultivation and preservation of vinegar bacteria. *Journal of Biotechnology*, 60(3), 195–206.
- Solieri, L., & Giudici, P. (Eds.). (2009). *Vinegars of the world*. Milan, Italia: Springer-Verlag Italia S.r.l.
- Su, M.-S., & Chien, P.-J. (2007). Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. *Food Chemistry*, 104(1), 182–187.
- Su, M.-S., & Chien, P.-J. (2010). Aroma impact components of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) vinegars. *Food Chemistry*, 119(3), 923–928.

- Suarez Lepe, J. A., & Iñigo Leal, B. (2004). Biotecnología de la elaboración de vinagre. En: E. Mundi-Prensa (Ed.), *Microbiología Enológica. Fundamentos de Vinificación*. (3° ed., pp. 472–506). Madrid.
- Tesfaye, W., García-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2000). Set up and optimization of a laboratory scale fermentor for the production of wine vinegar. *Journal of the Institute of Brewing*, 106(4), 215–219.
- Tesfaye, W., Morales, M. L., Benítez, B., García-Parrilla, M. C., & Troncoso, a. M. (2004). Evolution of wine vinegar composition during accelerated aging with oak chips. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 239–245.
- Tesfaye, W., Morales, M. L., García-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2002). Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 12–21.
- Tesfaye, W., Morales, M. L., García-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2003). Optimising wine vinegar production: fermentation and ageing, 1(2), 1–6.
- Trček, J., & Barja, F. (2015). Updates on quick identification of acetic acid bacteria with a focus on the 16S–23S rRNA gene internal transcribed spacer and the analysis of cell proteins by MALDI-TOF mass spectrometry. *International Journal of Food Microbiology*, 196, 137–144.
- Trček, J., Toyama, H., Czuba, J., Misiewicz, A., & Matsushita, K. (2006). Correlation between acetic acid resistance and characteristics of PQQ-dependent ADH in acetic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(3), 366–373.
- Ubeda, C., Callejón, R. M., Hidalgo, C., Torija, M. J., Troncoso, a. M., & Morales, M. L. (2013). Employment of different processes for the production of strawberry vinegars: Effects on antioxidant activity, total phenols and monomeric anthocyanins. *LWT - Food Science and Technology*, 52(2), 139–145.
- Valepyn, E., Berezina, N., & Paquot, M. (2012). Optimization of production and preliminary characterization of new exopolysaccharides from

Gluconacetobacter hansenii LMG1524. *Advances in Microbiology*, 2, 488–496.

- Valero, E., Berlanga, T. M., Roldán, P. M., Jiménez, C., García, I., & Mauricio, J. C. (2005). Free amino acids and volatile compounds in vinegars obtained from different types of substrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(4), 603–608.
- Vegas Pérez, C. A. (2011). *Aplicación de métodos moleculares para el estudio de las bacterias acéticas implicadas en la elaboración de vinagre de vino tradicional*. Universitat Rovira i Virgili.
- Vuarant, C. O., Lesa, C., Zapata, L. M., Montti, M. T., Paz, J. M., & Carbonell, J. V. (2010). Estudios de parámetros de calidad en pasas de arándanos en un proceso de deshidratado por infrarrojos. En: C. O. Vuarant (Ed.), *Arándanos, Avances Científicos-Tecnológicos en la región de Salto Grande* (pp. 117–133). Concordia, Entre Ríos: Facultad de Ciencias de la Alimentación. Universidad Nacional de Entre Ríos.
- Wu, J., Gullo, M., Chen, F., & Giudici, P. (2010). Diversity of *Acetobacter pasteurianus* strains isolated from solid-state fermentation of cereal vinegars. *Current Microbiology*, 60(4), 280–286.
- Xu, Q., Tao, W., & Ao, Z. (2007). Antioxidant activity of vinegar melanoidins. *Food Chemistry*, 102(3), 841–849.
- Yakushi, T., & Matsushita, K. (2010). Alcohol dehydrogenase of acetic acid bacteria: structure, mode of action, and applications in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 1257–1265.
- Yamada, S., Nabe, K., Izuo, M., & Chibata., I. (1979). Enzymatic production of dihydroxyacetone by *Acetobacter suboxydans* ATCC 621. *Journal of Fermentation Technology*, 57, 321–326.
- Yamada, Y. (2014). Transfer of *Gluconacetobacter kakiaceti*, *Gluconacetobacter medellinensis* and *Gluconacetobacter maltaceti* to the genus *Komagataeibacter* as *Komagataeibacter kakiaceti* comb. nov., *Komagataeibacter medellinensis* comb. nov. and *Komagataeibacter*

maltaceti comb. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt 5), 1670–1672.

Yamada, Y., Hosono, R., Lisdyanti, P., Widyastuti, Y., Saono, S., Uchimura, T., & Komagata, K. (1999). Identification of acetic acid bacteria isolated from Indonesian sources, especially of isolates classified in the genus *Gluconobacter*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 45(1), 23–28.

Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., & Uchimura, T. (2000). *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α - Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 823–829.

Yamada, Y., & Yukphan, P. (2008). Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125(1), 15–24.

Yamada, Y., Yukphan, P., Lan Vu, H. T., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasupawat, S., & Nakagawa, Y. (2012). Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). *The Journal of General and Applied Microbiology*, 58(5), 397–404.

Zapata, L. M. (2014). *Obtención de extracto de antocianinas a partir de arándanos para ser utilizado como antioxidante y colorante en la industria alimentaria*. Universitat Politècnica de València.

II. Objetivos y Plan de trabajo

II. 1. Objetivos generales

Producir vinagre a partir de sustratos alcohólicos de frutas de la región, específicamente, naranja y arándanos.

Estudiar los procesos de acetificación de los sustratos alcohólicos de naranjas y de arándanos durante la obtención de los respectivos vinagres.

II. 2. Objetivos específicos

Los objetivos generales se alcanzarán con la consecución de los siguientes objetivos específicos, para cada sustrato:

Evaluar la influencia de algunos factores externos del proceso (caudal de aire y velocidad de agitación) durante la acetificación en sistema sumergido discontinuo.

Determinar las condiciones experimentales que permitan lograr el máximo rendimiento y la mayor velocidad de acetificación en sistema discontinuo.

Aplicar la metodología y las mejores condiciones experimentales establecidas en el proceso discontinuo para el estudio en proceso semicontinuo.

Evaluar el efecto de la proporción de carga en el sistema semicontinuo.

Caracterizar los vinagres recién obtenidos y luego de un período de maduración de 6 meses, mediante análisis fisicoquímicos.

II.3. Plan de trabajo

El trabajo consiste en la obtención de vinagre a partir de dos frutas de la región, naranjas y arándanos, mediante un proceso biotecnológico con cultivo de bacterias acéticas en sistema sumergido.

En primer lugar se estudiaron las mejores condiciones de crecimiento de diferentes especies de BAA con el objeto de obtener un cultivo iniciador apto para el proceso de acetificación. Para ello se evaluó el crecimiento y la velocidad de acetificación de tres especies de bacterias acéticas inoculadas cada una, en dos medios de cultivo y empleando dos sistemas de aireación. A partir de los resultados de estos ensayos se establecieron las condiciones (especie bacteriana, medio de cultivo y sistema de aireación) en que se prepararon los precultivos utilizados como inóculo de los distintos procesos oxidativos en el biorreactor.

Una segunda etapa implicó el estudio preliminar de las influencias de dos factores principales de este proceso biooxidativo, velocidad de agitación y caudal de aire, sobre la velocidad de acetificación y el rendimiento GK en sistema discontinuo para lo que se empleó un diseño factorial 2^2 . Los resultados obtenidos permitieron redefinir la región experimental de trabajo para la posterior determinación de las mejores condiciones de los factores mencionados en los cuales se logró la mayor velocidad de acetificación y el máximo rendimiento GK. A estos efectos se elaboró un diseño central compuesto y su análisis se realizó utilizando la metodología de superficie de respuesta. Las condiciones iniciales fijadas en cada tratamiento fueron: pH, volumen del sustrato, concentración de alcohol y concentración de ácido acético y la temperatura se mantuvo constante en 30 ± 1 °C durante todo el proceso. El monitoreo del proceso se efectuó por medidas de la densidad óptica (absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro UV-visible), pH, acidez total expresada en g/L de ácido acético y recuento celular en cámara de Petroff-Hauser.

En la tercera etapa se ensayó el proceso en sistema semicontinuo, utilizando como parámetros del proceso, los niveles de los factores que maximizaron la velocidad de acetificación y el rendimiento GK en la etapa anterior. En este caso se estudió la "proporción de carga" en dos niveles y se evaluó la velocidad de acetificación y el rendimiento, mediante análisis de varianza del factor en estudio. La comparación de los tratamientos que presentaron diferencias estadísticas significativas se realizó mediante contraste

múltiple de rangos utilizando el test de Fisher (LSD) para un nivel de confianza del 95 %. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante programa estadístico Statgraphics Centurion XV Corporate.

Por último, los vinagres obtenidos en las condiciones que maximizaron la velocidad de acetificación y el rendimiento GK, se envasaron en botellas de vidrio y se evaluaron parámetros fisicoquímicos normalmente utilizados para vinagres comerciales, como así también componentes antioxidantes, puesto que las frutas de origen son ricas en este tipo de compuestos. Estas determinaciones se repitieron al finalizar el período de maduración, que en este caso se fijó en 6 meses, con el fin de evaluar su evolución.

La metodología detallada se aplicó, independientemente para los vinagres de naranja como para los de arándanos.

PRIMERA
PARTE:

CULTIVO
INICIADOR

CAPÍTULO 1:

Selección del cultivo iniciador

1.1. Introducción

Como se ha mencionado en la Introducción general, originalmente el vinagre de vino tradicional se obtuvo por acetificación espontánea del vino en la que el etanol, inicialmente producido por la levadura, experimentaba la oxidación a ácido acético por BAA. Este proceso se llevaba a cabo en barricas de madera y solía ser iniciado por la denominada "madre de vinagre", un cultivo iniciador indefinido obtenido de un vinagre anterior. De esta manera, el producto resultaba de la competencia entre los microorganismos de la flora microbiana presente. En estas condiciones, no se logra asegurar el control del proceso o la calidad del producto final (Hidalgo et al., 2013) por lo que, para iniciar los estudios de acetificación, se decidió trabajar con inóculos puros.

No resulta adecuada la preparación de un cultivo iniciador para los procesos de acetificación a partir de un fermentador en marcha, ya que en el mismo, las BAA están sometidas a condiciones de estrés y morirían rápidamente (Sokollek & Hammes, 1997). Por razones prácticas y económicas, es imprescindible diseñar un medio de cultivo que permita conseguir una elevada población celular en el menor tiempo posible. Como en cualquier otro proceso fermentativo, esto es consecuencia de su velocidad de crecimiento específico, que a su vez, depende de las condiciones en que se desarrolle el mismo, especialmente de la concentración de oxígeno y de la composición del medio (Nieto, 1991; Rubio-Fernández, Salvador, & Fregapane, 2004).

Un cultivo starter adecuado para el proceso de acetificación, debe reunir los siguientes requisitos: concentración celular mayor a $1 \cdot 10^9$ células/mL, fase lag corta, elevada velocidad de conversión de sustrato y alta tolerancia al etanol y ácido acético (Sokollek & Hammes, 1997). Otros investigadores indicaron que se debe garantizar una población bacteriana en el inóculo del orden de $1-5 \cdot 10^8$ células/mL en fase exponencial (de Ory, Romero, & Cantero, 1998, 2002, 2004).

El objetivo perseguido en esta etapa fue establecer las mejores condiciones de crecimiento de diferentes especies de BAA con la finalidad de obtener un cultivo iniciador apto para el proceso de acetificación.

1.2. Materiales y Métodos

Se evaluó el crecimiento y la velocidad de acetificación de tres especies de bacterias acéticas inoculadas cada una, en dos formulaciones de medios de cultivo, empleando dos sistemas de aireación. Cada ensayo se ejecutó colocando 300 mL de medio de cultivo en erlenmeyers de 500 mL e inoculando al 10 % con la especie correspondiente. Todas las experiencias se realizaron a 30 ± 1 °C.

1.2.1. Bacterias acéticas

Teniendo en cuenta que las frutas constituyen un hábitat adecuado para las BAA, se seleccionaron dos especies aisladas en trabajos previos de este grupo de investigación. Una de ellas, *Gluconacetobacter* sp., fue obtenida a partir de arándanos, mientras que *Acetobacter* sp., a partir de naranjas, ambas de esta región. Además, se ensayó una cepa liofilizada de *Acetobacter aceti* (NRRL B-999), provista por el Research, Education and Economics, Agricultural Research Service del United States Department of Agriculture (USDA).

1.2.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron seleccionados a partir de la información bibliográfica consultada:

- Medio RAE (1a, 2e) (AE reforzado): 40 g/L de glucosa; 10 g/L de extracto de levadura; 10 g/L peptona; 3,38 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,5 g/L ácido cítrico. La solución esterilizada por calor húmedo a 121 °C durante 15 min en autoclave VZ tipo Chamberland (Argentina), fue adicionada de 10 mL/L de

ácido acético y 20 mL/L de etanol. Este medio de cultivo fue recomendado por Sokollek & Hammes (1997) para la revitalización de un cultivo iniciador de BAA.

- Medio EYPS: 48 g/L de etanol; 5 g/L de ácido acético; 2 g/L de peptona; 0,8 g/L de KH_2PO_4 ; 0,35 g/L de K_2HPO_4 . 3 H_2O ; 1,5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,25 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,01 g/L de NaCl y 0,01 g/L de MnSO_4 ; pH 3,5 (Fregapane, Nieto, & Salvador, 1999). La solución de todos los componentes fue esterilizada por calor húmedo a 121 °C durante 15 min. Una vez fría se agregaron las sustancias volátiles, etanol y ácido acético.

1.2.3. *Sistemas de aireación*

Para garantizar el crecimiento en condiciones aeróbicas, se ensayaron dos sistemas de aireación:

- Agitación en agitador orbital, shaker, JP SELECTA, modelo Rotabit (España). La velocidad empleada fue de 150 u/min (Figura 1.1).
- Sistema de inyección de aire: por medio de una bomba de aire PRECISION, modelo SR-8500 (China), caudal: 4000 cm^3/min (Figura 1.2).



Figura 1.1. Agitador orbital (shaker).



Figura 1.2. Sistema de inyección de aire.

Por lo tanto, las distintas combinaciones para cada BAA se han codificado de la siguiente manera: EI (EYPS/inyección de aire), ES (EYPS/shaker), RI (RAE (1a, 2e)/ inyección de aire), RS (RAE (1a, 2e)/shaker). Cada combinación se ensayó por triplicado.

1.2.4. *Métodos analíticos*

Se tomaron muestras de cada sistema cada 24 horas y se determinaron los siguientes parámetros:

Densidad óptica (DO): como indicador de la población celular, se midió la absorbancia a 540 nm (Ndoye et al., 2006; Ndoye, Lebecque, Destain, Guiro, & Thonart, 2007; Beheshti-Maal & Shafiei, 2009) mediante un espectrofotómetro UV-visible SHIMADZU, modelo UV 1603 (Japan). Dado que, dependiendo del medio de cultivo empleado (RAE o EYPS), la DO presenta diferentes valores aunque la concentración celular inicial sea similar, la evolución del crecimiento se evaluó en función de la variación de la DO en cada muestreo con respecto a su DO inicial.

Acidez total: mediante titulación con solución de hidróxido de sodio (NaOH) y fenolftaleína como indicador (AOAC, 2005, 18th Ed., Official Method 962.12). El resultado se expresó como g/L de ácido acético. Se asumió que toda la acidez del medio se debe a este ácido.

Velocidad de acetificación (r_A): como indicador de velocidad de formación de ácido acético, se calculó la diferencia entre la acidez final e inicial en cada ciclo de fermentación (Krusong, Yaiyen, & Pornpukdeewatana, 2014). Se determinó según la siguiente expresión:

$$r_A = \frac{AT_f - AT_i}{t_f - t_i} \quad (1.1)$$

donde: AT_f y AT_i = acidez total, expresada como ácido acético (g AcH/L) para los tiempos t_f y t_i , respectivamente (Krusong et al., 2014).

1.2.5. Tratamiento estadístico

Cada una de las determinaciones se efectuó por triplicado. Se utilizó el software Statgraphics Centurión XV Corporate y los resultados se analizaron mediante análisis de varianza y, cuando fue necesario, se aplicó test de Fisher (LSD). En todos los casos se utilizó un nivel de confianza del 95 %.

1.3. Resultados y Discusión

1.3.1. *Gluconacetobacter sp.*

La mayor velocidad de acetificación como así también el mayor incremento de la densidad óptica se registraron en RI, mientras que los más bajos fueron determinados en los sistemas realizados en shaker (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Crecimiento y velocidad de acetificación de *Gluconacetobacter sp.*

SISTEMA	r_A (g/L/h)	Variación de DO_{540}
EI	$0,07 \pm 0,01^b$	$0,5042 \pm 0,1618^b$
ES	$0,06 \pm 0,01^{ab}$	$0,0973 \pm 0,0325^a$
RI	$0,14 \pm 0,00^c$	$1,0716 \pm 0,1268^c$
RS	$0,05 \pm 0,00^a$	$0,3015 \pm 0,0643^{ab}$

EI: medio EYPS con inyección de aire, ES: medio EYPS en shaker, RI: medio RAE (1a, 2e) con inyección de aire, RS: medio RAE (1a, 2e) en shaker. r_A : velocidad de acetificación. DO_{540} : densidad óptica a 540 nm. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias de cada parámetros para los diferentes sistemas ($p < 0,05$).

Para un mejor análisis de los resultados se graficó la evolución diaria de la densidad celular (Figura 1.3). En las curvas de los sistemas ES y RS se

observa una baja pendiente, indicativa de una velocidad de crecimiento lenta, sin apreciarse claramente la fase de latencia. Sin embargo, ésta se encuentra bastante definida en EI y en RI, y a continuación la fase de crecimiento exponencial. Esta diferencia en el comportamiento según el sistema de aireación seguramente se debió a la mayor velocidad de transferencia de oxígeno originada por el sistema de inyección de aire (Rubio-Fernández et al., 2004), teniendo en cuenta que el oxígeno es parte del sustrato en estos procesos.

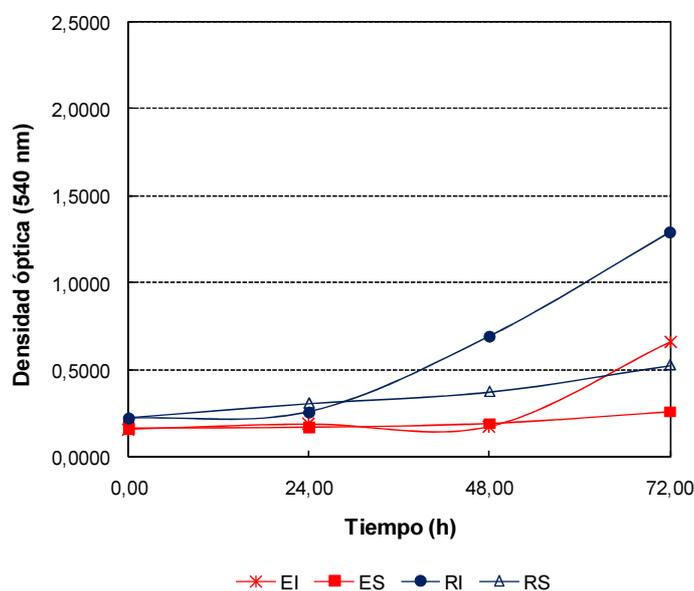


Figura 1.3. Curva de crecimiento de *Gluconacetobacter* sp. en diferentes sistemas de cultivo. EI: EYPS/inyección de aire, ES: EYPS/shaker, RI: RAE/inyección de aire, RS: RAE/shaker.

Al evaluar el crecimiento con los diferentes medios de cultivo se encontró que el sistema EI presentó una fase lag de 48 horas, mientras que la de RI fue de 24 horas. Finalmente, luego de 72 horas de incubación, la densidad celular se incrementó aproximadamente 6 veces en RI, mientras que en EI, el aumento fue de 4 veces respecto de su densidad óptica inicial. Este comportamiento coincide con el observado por Nanba et al. (1984) en cultivos agitados de *Acetobacter* sp. en los cuales, la adición de 10 g/L de ácido acético

incrementó la velocidad de crecimiento y disminuyó la fase lag. Además, se puede realizar otro análisis evaluando las concentraciones iniciales de etanol y ácido acético en cada medio de cultivo. Así, retomando el apartado 1.2.2., se observa que el medio RAE contiene 20 mL/L (16 g/L) de etanol y 10 mL/L (10,5 g/L) de ácido acético. Estas concentraciones son muy similares a las reportadas por Gomez et al. (1994) en su trabajo de investigación en el que determinó que los valores óptimos para el crecimiento de las BAA eran de 13 g/L de etanol y 10 g/L de ácido acético. Sin embargo, las concentraciones en el medio EYPS son muy diferentes (48 g/L de etanol y 5 g/L de ácido acético) lo que probablemente pudo haber ejercido cierta inhibición en el desarrollo microbiano.

La mayor velocidad de acetificación fue registrada en RI y ésta presentó diferencias significativas con el resto de los sistemas analizados. No obstante, se puede observar un máximo de acidez total en RI a las 48 horas (20,31 g/L) y luego, un leve descenso de la misma (Figura 1.4). Puesto que a las 72 horas, el cultivo continuaba en fase de crecimiento exponencial (Figura 1.3). Esta pequeña disminución de la acidez total podría estar relacionada con el carácter superoxidante de esta especie, por el cual pueden utilizar el ácido formado como fuente de carbono y energía, cuando ya no disponen de sustrato alcohólico.

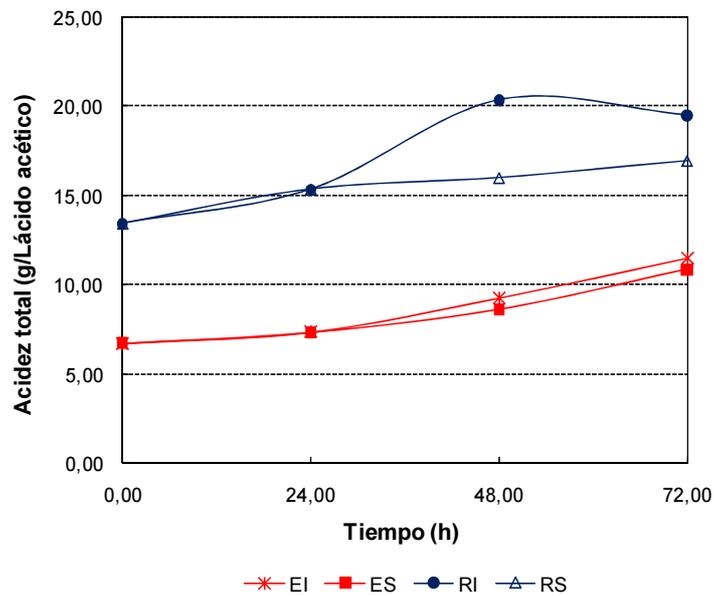


Figura 1.4. Evolución de acidez total en diferentes sistemas de cultivo inoculados con *Gluconacetobacter* sp. EI: EYPS/inyección de aire, ES: EYPS/shaker, RI: RAE/ inyección de aire, RS: RAE/shaker.

1.3.2. *Acetobacter* sp.

Los ensayos realizados con la bacteria *Acetobacter* sp. indicaron que, tanto la velocidad de acetificación como el aumento en la densidad poblacional fueron mayores en el sistema RI (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Crecimiento y velocidad de acetificación de *Acetobacter* sp.

SISTEMA	r_A (g/L/h)	Variación de DO_{540}
EI	$0,06 \pm 0,01^b$	$0,1832 \pm 0,0234^a$
ES	$0,06 \pm 0,00^b$	$0,1582 \pm 0,0165^a$
RI	$0,16 \pm 0,00^c$	$1,9130 \pm 0,0613^b$
RS	$0,05 \pm 0,00^a$	$0,2005 \pm 0,0206^a$

EI: medio EYPS con inyección de aire, ES: medio EYPS en shaker, RI: medio RAE (1a, 2e) con inyección de aire, RS: medio RAE (1a, 2e) en shaker. r_A : velocidad de acetificación. DO_{540} : densidad óptica a 540 nm. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias de cada parámetros para los diferentes sistemas ($p < 0,05$).

Si bien el comportamiento fue similar al observado en los tratamientos efectuados con *Gluconacetobacter* sp., la máxima densidad óptica alcanzada con *Acetobacter* sp. resultó 65 % superior a aquella, en el período analizado (1,2890 y 2,1300, respectivamente).

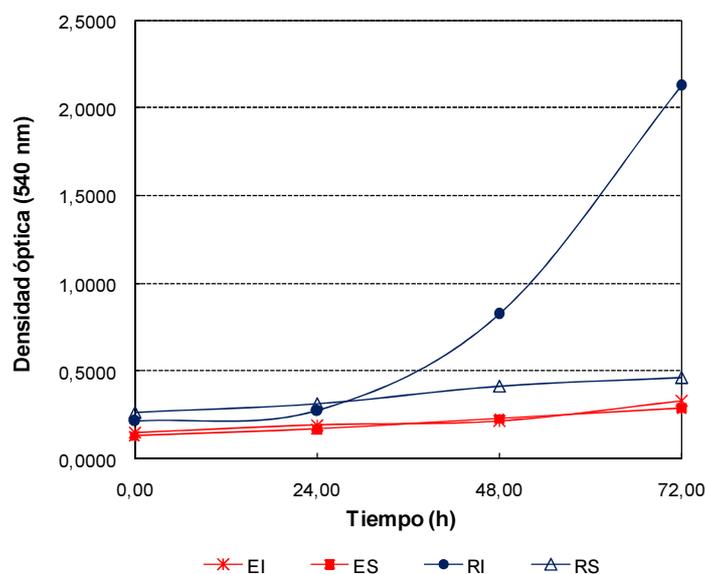


Figura 1.5. Curva de crecimiento de *Acetobacter* sp. en diferentes sistemas de cultivo. EI: EYPS/inyección de aire, ES: EYPS/shaker, RI: RAE/ inyección de aire, RS: RAE/shaker.

La producción de ácido acético no presentó diferencias significativas entre los sistemas formados por el medio EYPS (EI y ES), mientras que en aquellos compuestos por medio RAE, el comportamiento fue análogo al observado con *Gluconacetobacter* sp. El sistema RS mostró la menor r_A , mientras que RI presentó la r_A más alta con el máximo a las 48 horas (22,69 g/L) de ensayo. Luego de este período, la acidez total comenzó a disminuir (Figura 1.6), probablemente por el carácter superoxidante de las *Acetobacter*, puesto que a las 72 hs, el cultivo continuaba en fase de crecimiento exponencial (Figura 1.5).

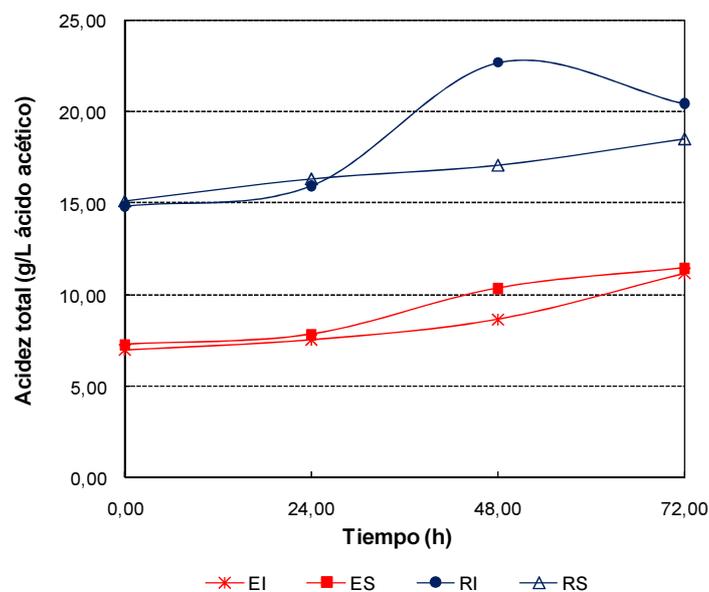


Figura 1.6. Evolución de acidez total en diferentes sistemas de cultivo inoculados con *Acetobacter* sp. EI: EYPS/inyección de aire, ES: EYPS/shaker, RI: RAE/ inyección de aire, RS: RAE/shaker.

1.3.3. *Acetobacter aceti*

El mayor crecimiento y velocidad de acetificación se registraron en RI (Tabla 1.3), tal como sucedió en los ensayos realizados con *Gluconacetobacter* sp. y *Acetobacter* sp.

Tabla 1.3. Crecimiento y velocidad de acetificación de *Acetobacter aceti* (NRRL B-999).

SISTEMA	r_A (g/L/h)	Variación de DO_{540}
EI	0,00±0,00 ^a	0,0527±0,0136 ^b
ES	0,00±0,01 ^a	0,0023±0,0011 ^a
RI	0,08±0,01 ^c	0,1132±0,024 ^c
RS	0,05±0,01 ^b	0,0180±0,0060 ^a

EI: medio EYPS con inyección de aire, ES: medio EYPS en shaker, RI: medio RAE (1a, 2e) con inyección de aire, RS: medio RAE (1a, 2e) en shaker. r_A : velocidad de acetificación. DO_{540} : densidad óptica a 540 nm. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias de cada parámetros para los diferentes sistemas ($p < 0,05$).

Si bien se registraron diferencias significativas entre los tratamientos realizados con la cepa liofilizada de *Acetobacter aceti*, las magnitudes de los parámetros analizados resultaron, en general, muy inferiores a las determinadas en las BAA analizadas previamente. La máxima densidad celular alcanzada fue sólo del 10-17 % de la medida determinada en *Gluconacetobacter* sp. y *Acetobacter* sp. Del mismo modo, la velocidad de acetificación resultó ser entre 57-50 % inferior a la determinada en aquellos, respectivamente.

En las figuras 1.7 y 1.8, ambas realizadas en la misma escala que las anteriores, se observa claramente el escaso crecimiento y baja velocidad de acetificación de *Acetobacter aceti*, para todos los sistemas ensayados.

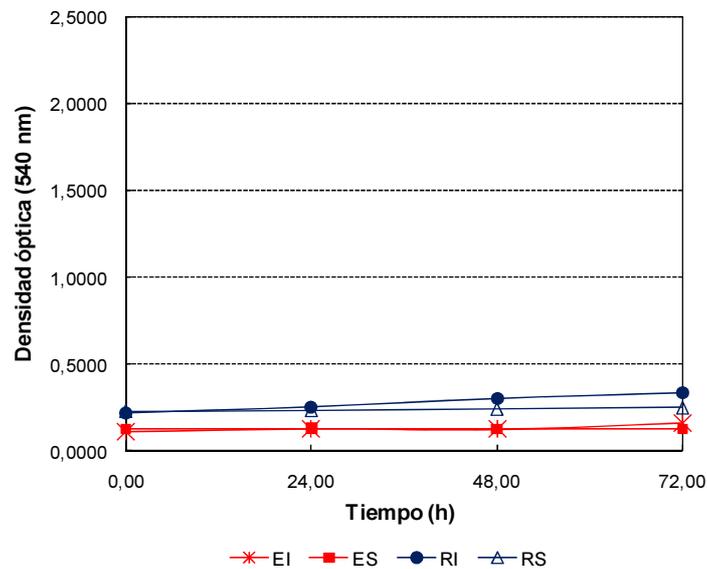


Figura 1.7. Curva de crecimiento de *Acetobacter aceti* en diferentes sistemas de cultivo. EI: EYPS/inyección de aire, ES: EYPS/shaker, RI: RAE/ inyección de aire, RS: RAE/shaker.

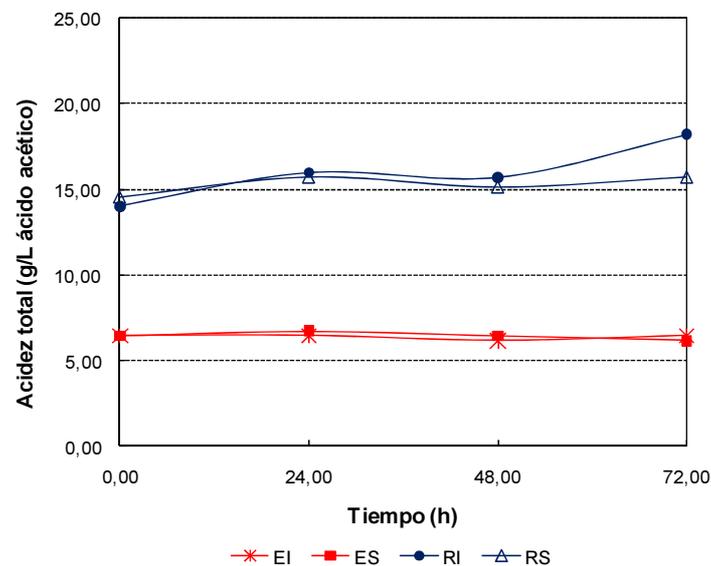


Figura 1.8. Evolución de acidez total en diferentes sistemas de cultivo inoculados con *Acetobacter aceti*. EI: EYPS/inyección de aire, ES: EYPS/shaker, RI: RAE/ inyección de aire, RS: RAE/shaker.

Este comportamiento se puede atribuir a un inadecuado tratamiento de revivificación o bien a la pérdida de viabilidad celular a causa del proceso de liofilización. En este último caso, es conveniente analizar algunos factores que pudieron haber influido en la respuesta observada, si bien se desconoce la historia previa del cultivo.

A pesar de que la liofilización es el método preferido de deshidratación en la industria biotecnológica y farmacéutica, es conocido el hecho que puede producir daños a microorganismos y productos biológicos, con la consiguiente pérdida de viabilidad. La tolerancia a la liofilización depende de factores tales como el medio utilizado, velocidad de congelación, parámetros del proceso, condiciones de rehidratación, estado fisiológico y concentración inicial de las células (Sokollek, Hertel, & Hammes, 1998; Shafiei, Delvigne, & Thonart, 2013). Las bacterias gram negativas, como es el caso de las BAA, generalmente demuestran menor supervivencia que las gram positivas (Miyamoto-Shinohara, Sukenobe, Imaizumi, & Nakahara, 2008).

Entre los efectos dañinos observados se puede mencionar el debido a los radicales libres formados durante los primeros días del almacenamiento que promueven la peroxidación de ácidos grasos insaturados de la célula, que llevan a la formación y acumulación de productos secundarios que acentúan la muerte celular. Además, temperaturas elevadas (35 °C) durante este período pueden producir cambios extremos en la viabilidad celular debido a que resultan afectadas las deshidrogenasas termosensibles (Shafiei et al., 2013). En respuesta a las condiciones de estrés, es común la formación de células viables pero no cultivables (VBNC), es decir, células que no crecen en medios bacteriológicos de rutina pero están vivas y capaces de renovar su actividad metabólica (Oliver, 2005).

1.4. Conclusiones

Los ensayos realizados permitieron, *a priori*, deducir que las mejores condiciones para obtener el cultivo iniciador de BAA para el proceso de acetificación, se obtuvieron con medio RAE (1a/2e) con sistema de inyección de aire (RI) utilizando *Acetobacter* sp.

Se estima que el medio RAE (1a/2e) pudo haber sido el más apropiado en virtud de que las concentraciones de etanol y ácido acético son similares a las informadas como óptimas para las BAA, mientras que las del medio EYPS se alejan de esos valores óptimos. Esto podría haber causado algún tipo de inhibición en el crecimiento y producción de ácido acético.

La mayor velocidad de transferencia de oxígeno originada con el sistema de inyección de aire seguramente redundó en un mayor crecimiento microbiano y su consecuente incremento en la velocidad de acetificación.

El tiempo de incubación debería ser de 48-72 horas ya que *Acetobacter* sp. es una bacteria superoxidante y superado este período, podrían comenzar a consumir el ácido acético producido (diauxia).

1.5. Bibliografía

Beheshti-Maal, K., & Shafiei, R. (2009). Isolation and identification of an *Acetobacter* strain from iranian white-red cherry with high acetic acid productivity as a potential strain for cherry vinegar production in food and agriculture biotechnology. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 54, 201–204.

de Ory, I., Romero, L. E., & Cantero, D. (1998). Modelling the kinetics of growth of *Acetobacter aceti* in discontinuous culture: influence of the temperature of operation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, 189–193.

- de Ory, I., Romero, L. E., & Cantero, D. (2002). Optimum starting-up protocol of a pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering*, 52(1), 31–37.
- de Ory, I., Romero, L. E., & Cantero, D. (2004). Operation in semi-continuous with a closed pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering*, 63(1), 39–45.
- Fregapane, G., Nieto, J., & Salvador, M. D. (1999). Wine vinegar production using a noncommercial 100-Litre bubble column dynamic sparger. *Biotechnology and Bioengineering*, 1–6.
- Gomez, J. M., Romero, L. E., Caro, I., & Cantero, D. (1994). Cinética de crecimiento de *Acetobacter aceti* sobre sustrato alcohólico. *Información Tecnológica*, 5(6), 55–63.
- Hidalgo, C., García, D., Romero, J., Mas, A., Torija, M. J., & Mateo, E. (2013). *Acetobacter* strains isolated during the acetification of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) wine. *Letters in Applied Microbiology*, 57(3), 227–232.
- Krusong, W., Yaiyen, S., & Pornpukdeewatana, S. (2014). Impact of high initial concentrations of acetic acid and ethanol on acetification rate in an internal Venturi injector bioreactor. *Journal of Applied Microbiology*, 118(3), 629–640.
- Miyamoto-Shinohara, Y., Sukenobe, J., Imaizumi, T., & Nakahara, T. (2008). Survival of freeze-dried bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 54(1), 9–24.
- Nanba, A., Tamura, A., & Nagai, S. (1984). Synergistic effects of acetic acid and ethanol on the growth of *Acetobacter* sp. *Journal of Fermentation Technology*, 62, 501–505.
- Ndoye, B., Lebecque, S., Destain, J., Guiro, A. T., & Thonart, P. (2007). A new pilot plant scale acetifier designed for vinegar production in Sub-Saharan Africa. *Process Biochemistry*, 42(11), 1561–1565.

- Ndoye, B., Lebecque, S., Dubois-Dauphin, R., Tounkara, L., Guiro, a.-T., Kere, C., ... Thonart, P. (2006). Thermoresistant properties of acetic acids bacteria isolated from tropical products of Sub-Saharan Africa and destined to industrial vinegar. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(4), 916–923.
- Nieto, F. J. (1991). Algunos aspectos de la tecnología de la fermentación acética. En: C. Llaguno Marchena & M. C. Polo (Eds.), *El Vinagre de Vino* (pp. 69–103). Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Oliver, J. D. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 43(February), 93–100.
- Rubio-Fernández, H., Salvador, M. D., & Fregapane, G. (2004). Influence of fermentation oxygen partial pressure on semicontinuous acetification for wine vinegar production. *European Food Research and Technology*, 219(4), 393–397.
- Shafiei, R., Delvigne, F., & Thonart, P. (2013). Flow-cytometric assessment of damages to *Acetobacter senegalensis* during freeze-drying process and storage. *Acetic Acid Bacteria*, 2(1s).
- Sokollek, S. J., & Hammes, W. P. (1997). Description of a starter culture preparation for vinegar fermentation. *Systematic and Applied Microbiology*, 20, 481–491.
- Sokollek, S. J., Hertel, C., & Hammes, W. P. (1998). Cultivation and preservation of vinegar bacteria. *Journal of Biotechnology*, 60(3), 195–206.

**SEGUNDA
PARTE:**

**VINAGRE DE
NARANJAS**

Capítulo 2:

Acetificación de
sustrato alcohólico
de naranja en
sistema
discontinuo

2.1. Introducción

El propósito de la investigación que se plantea en este capítulo fue evaluar la influencia de factores externos de la elaboración de vinagre tales como, caudal de aire (Q_a) y velocidad de agitación (V_{ag}) y la determinación de las condiciones experimentales que permitan lograr la mayor velocidad de acetificación (r_A) del sustrato alcohólico de naranjas y el máximo rendimiento (R_{GK}) en sistema sumergido discontinuo.

Para este análisis es necesario hacer referencia a la teoría de la transferencia de materia gas-líquido y al consumo de oxígeno en cultivos celulares.

La velocidad de transferencia de oxígeno del gas al líquido (R_{O_2}) es directamente proporcional a la fuerza impulsora y al área disponible para el proceso de transferencia y se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$R_{O_2} = k_L a (C^* - C) \quad (2.1)$$

Donde: k_L = coeficiente de transferencia de materia en la fase líquida.

a = área interfacial líquido-gas por unidad de volumen de fluido.

C = concentración de oxígeno en el cultivo.

C^* = concentración de oxígeno en el cultivo en equilibrio con la fase gaseosa (solubilidad).

El coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$) es una medida de la capacidad de un biorreactor de suministrar oxígeno. Depende del diseño del biorreactor, de las condiciones de operación (caudal de aire, agitación) y de la viscosidad del cultivo. La diferencia ($C^* - C$) representa la fuerza impulsora para la transferencia de materia.

La R_{O_2} es de vital importancia en bioprocesos aeróbicos debido a la necesidad de suministrar oxígeno suficiente al sistema para evitar que los microorganismos estén limitados de este gas, especialmente cuando existen elevadas densidades celulares.

CAPITULO 2. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema discontinuo.

En cultivos discontinuos, la velocidad de consumo de oxígeno varía con el tiempo debido principalmente a que la concentración de células (X) aumenta durante el transcurso del cultivo y la velocidad total de consumo de oxígeno es proporcional al número de células presentes. Además, también varía la velocidad de consumo de oxígeno por célula (q_o), conocida como velocidad específica de consumo de oxígeno. La velocidad de consumo de oxígeno por unidad de volumen de caldo (Q_o) se expresa según la ecuación:

$$Q_o = q_o \cdot X \quad (2.2)$$

En estado estacionario, no puede existir acumulación de oxígeno en el fermentador, por lo que la R_{O_2} debe ser igual a la Q_o . De esta manera, igualando las ecuaciones (2.1) y (2.2), se obtiene:

$$k_L a (C^* - C) = q_o \cdot X \quad (2.3)$$

A partir de la ecuación (2.3) se puede predecir la respuesta del biorreactor a las variaciones en las condiciones de operación de transferencia de materia. Debido a la baja solubilidad del oxígeno en soluciones acuosas a temperatura y presión ambiente (aprox. 10 mg/L), la fuerza impulsora ($C^* - C$) es muy pequeña. Además, por regla general, el k_L en caldos de fermentación es de $3-4 \times 10^{-4}$ m/s para burbujas mayores de 2-3 mm de diámetro y permanece relativamente constante e independiente de las condiciones, mientras que disminuye para burbujas de menor tamaño (Doran, 1998). De modo que, si se necesita una mejora sustancial en la R_{O_2} , es más efectivo centrar la atención en aumentar \underline{a} .

El área interfacial \underline{a} depende del tamaño y número de burbujas presentes, que a su vez dependen de muchos otros factores como la composición del medio, la velocidad del agitador y el caudal de gas. La propiedad más importante de las burbujas de aire en los fermentadores es su tamaño. Para un determinado volumen de gas, la máxima \underline{a} se consigue dispersando el gas en numerosas burbujas muy pequeñas, en vez de unas pocas grandes. Además, al ser más livianas, el tiempo de residencia en el

líquido es mayor y disponen de más tiempo para que se disuelva el oxígeno (Doran, 1998).

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Materia prima.

Para la obtención de vinagre de naranja se utilizó un vino elaborado por el grupo de investigación del Laboratorio de Biotecnología y Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Alimentación (UNER). El mismo fue obtenido por fermentación alcohólica de naranjas de la variedad Washington Navel, con levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. Finalizada la etapa de vinificación, se efectuó el trasiego y filtración a través de membranas de 1 µm de porosidad.

El diseño de un medio de fermentación tiene como finalidad la elección de los componentes necesarios para lograr el crecimiento y la formación de productos correspondientes al proceso a desarrollar. En vinagres de vino no se considera necesaria la adición de nutrientes ya que se encuentran en cantidad suficiente en el sustrato alcohólico usado como materia prima (Nieto, 1991). Además, los aminoácidos y otros compuestos nitrogenados liberados durante la autólisis de las levaduras contribuyen significativamente al crecimiento de las BAA en vinagres de origen vínico. Sin embargo, para vinagres de alcohol u otros con bajo contenido en aminoácidos, como el de sidra (Valero et al., 2005), es necesaria la adición de nutrientes (Guillamón & Mas, 2011).

Se determinaron los siguientes parámetros fisicoquímicos cuyas técnicas analíticas se describen en el apartado 2.2.5: graduación alcohólica, acidez total, acidez volátil, pH, sólidos solubles, azúcares reductores directos, glicerol, anhídrido sulfuroso (SO₂) libre y total. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

2.2.2. Proceso general de obtención de vinagre de naranjas.

El proceso seguido para la elaboración de vinagre de naranja se esquematiza en la figura 2.1. Cada etapa en la que se tomaron muestras para las diferentes determinaciones analíticas se identifica con la sigla (TM).

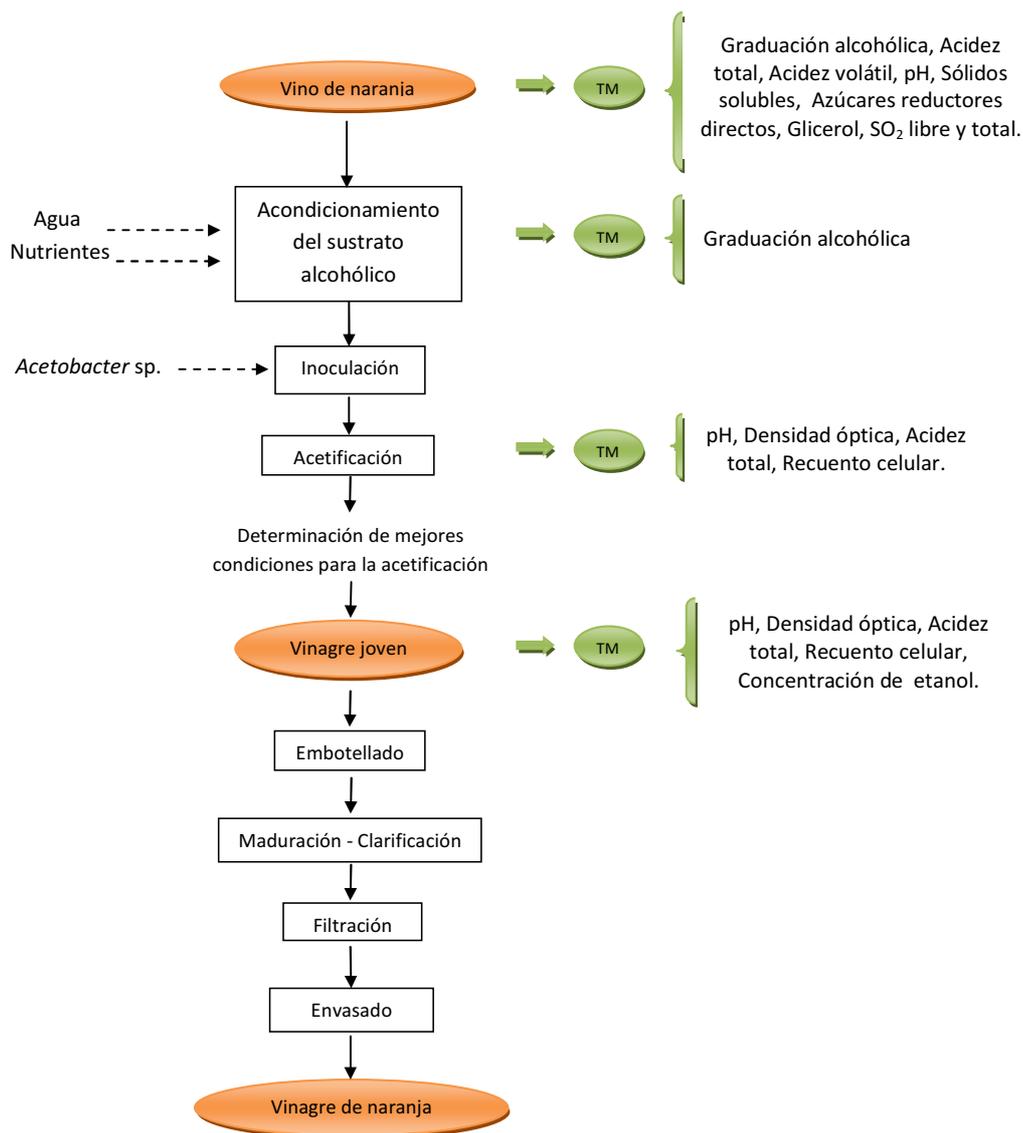


Figura 2.1. Diagrama de flujo de elaboración de vinagre de naranja.

2.2.2.1. Acondicionamiento del sustrato alcohólico.

En la Introducción, apartado I.4.1, se ha mencionado que el etanol podría ejercer un efecto inhibitor sobre las bacterias acéticas a concentraciones superiores a 50 g/L, especialmente en sistemas batch donde se dificultaría el comienzo de la fermentación (de Ory, Romero, & Cantero, 2002; Garrido-Vidal, Pizarro, & González-Sáiz, 2003). Por este motivo, el vino cítrico utilizado como sustrato fue diluido hasta un 6 % v/v de etanol (47,6 g/L). Sin embargo, esta dilución tiene un efecto relevante sobre la concentración de nutrientes, en especial si se tiene en cuenta que el contenido de nitrógeno amínico en el vino de naranja se ubica entre 3,6 y 5,2 mg/100 mL (Ferreyra, 2006). Por este motivo, se decidió realizar la dilución del vino mediante el agregado de una solución de minerales y fuente nitrogenada de la siguiente composición: 0,8 g/L de KH_2PO_4 ; 0,35 g/L de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 1,5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

2.2.2.2. Inoculación

Las bacterias acéticas empleadas para los procesos de acetificación fueron *Acetobacter* sp. aisladas en el laboratorio a partir de naranjas de la región (Capítulo 1, apartado 1.4.).

Los cultivos se dejaron crecer en un caldo de la siguiente composición: 2% de glucosa; 0,5% v/v de etanol; 0,8% de extracto de levadura y 0,5% de peptona (Yamada et al. 1999; Lisdiyanti et al. 2003) hasta la formación del característico velo blanco sobre la superficie (“madre del vinagre”) y la observación de turbidez en el medio. Este período fue de 48-72 horas, luego del cual se agregó glicerol al 20 % v/v como crioprotector y se repartió en criotubos de 1,5 mL para ser conservadas por congelación (-18 °C) en freezer PATRICK (Argentina).

Para realizar los ensayos de acetificación, se descongelaron algunos cultivos de *Acetobacter* sp. y se inocularon en caldo RAE (1a, 2e) para su

revitalización y crecimiento. Luego fueron mantenidos en estufa para cultivo bacteriológico FAETA (Argentina) a 30 °C durante 48-72 horas.

El cultivo iniciador empleado para cada ensayo de acetificación se preparó en erlenmeyer de 500 mL conteniendo 300 mL de medio RAE (1a, 2e) previamente esterilizado por calor húmedo a 121 °C durante 15 min, en autoclave VZ tipo Chamberland (Argentina). Éste fue inoculado al 10 % con el cultivo de *Acetobacter* sp. en etapa de crecimiento y se incubó a 30±1 °C, con sistema de inyección de aire, hasta lograr una concentración celular aproximada del inóculo de 3-5×10⁸ bacterias/mL (de Ory, Romero, & Cantero, 2004).

Como control de esta etapa, se tomó una muestra del caldo luego de la inoculación y otra al finalizar el período de incubación y se determinaron los siguientes parámetros fisicoquímicos: pH, acidez total, densidad óptica (DO), recuento celular (RC), (apartado 2.2.5. de “Técnicas analíticas”).

2.2.2.3. Acetificación

El proceso biooxidativo para la producción de vinagre de naranjas se realizó en un biorreactor de escala laboratorio marca NEW BRÜNSWICK CIENTIFIC Co., modelo Bioflo 2000 (New Jersey, USA) (Figura 2.2), provisto de un vaso de vidrio borosilicato de 2 L de volumen útil. El mismo dispone de un electrodo de control de pH METTLER TOLEDO (Switzerland) y una termocupla con sensor de platino RTD, entradas para inóculo y antiespumante y un orificio para la toma de muestras. La temperatura es corregida por una manta de calefacción situada debajo del vaso, mientras que para refrigerar utiliza una serpentina por la que circula agua de red, previo pasaje por un filtro para agua. Para impedir el paso de microorganismos y esporos, y de esta forma asegurar la esterilidad del aire que ingresa al biorreactor, el equipo posee un filtro absoluto de PTFE cuyo diámetro de poro es de 0,2 µm.

La agitación se realiza mecánicamente mediante un eje provisto de dos turbinas accionado por un motor. El aire se inyecta por la parte inferior del vaso

CAPITULO 2. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema discontinuo.

y es distribuido por un tubo en forma de L que posee tres pequeños orificios. El chorro de aire que sale de cada orificio choca con las paletas de las turbinas generándose de este modo miles de pequeñas burbujas, desde las cuales difunde hacia el seno del líquido. El sistema de agitación se completa con cuatro placas deflectoras que tienen por finalidad cortar o romper el movimiento circular que imprimen las turbinas al líquido, generando mayor turbulencia y mejor mezclado.

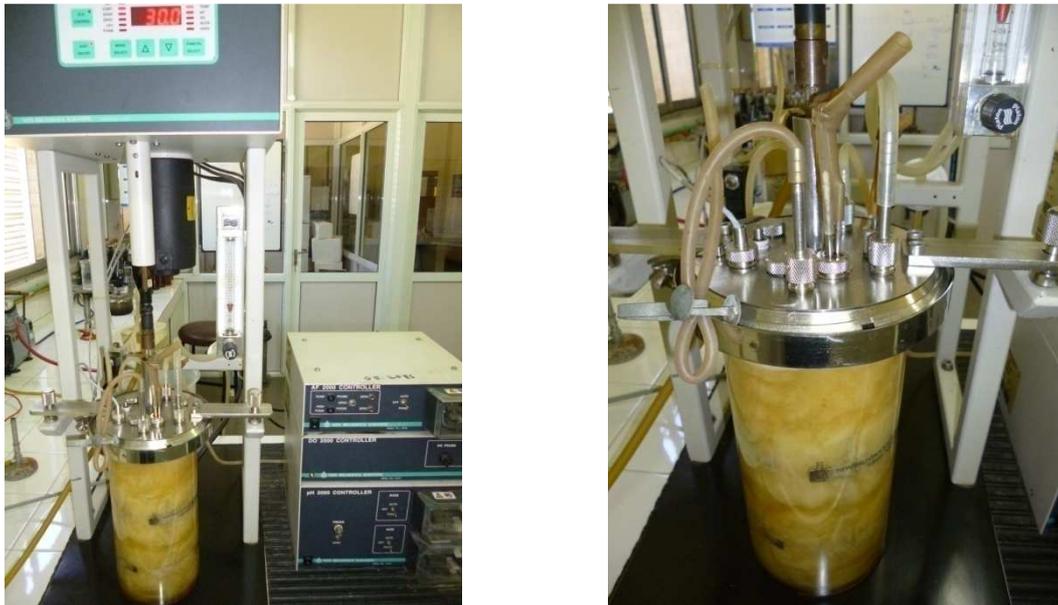


Figura 2.2. Biorreactor New Brunswick Cientific Co., Modelo Bioflo 2000, utilizado en las experiencias.

2.2.2.3.1. Desarrollo del proceso de acetificación en sistema discontinuo (batch).

Se calculó el volumen de la solución de nutrientes necesario para obtener un sustrato alcohólico de naranjas con una graduación alcohólica de 6 % v/v, se colocó en el vaso del fermentador y se esterilizó a 121 °C durante 15 min. Una vez que alcanzó la temperatura ambiente, se agregó el vino de naranjas y, cuando el biorreactor se hubo termostatizado a 30°C (temperatura

CAPITULO 2. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema discontinuo.

de ensayo), se inoculó con el cultivo iniciador obtenido según el procedimiento descripto previamente.

El monitoreo del proceso se realizó a través de muestras tomadas del fermentador cada 4–6 h, mediante determinaciones de pH, acidez total, densidad óptica y recuento celular (apartado 2.2.5. de “Técnicas analíticas”).

Se graficó cada parámetro en función del tiempo y, cuando se estabilizó el valor de la acidez total, luego de la etapa exponencial de crecimiento microbiano, se dio por finalizado el proceso para evitar el consumo del ácido acético por parte de las BAA debido al agotamiento del sustrato alcohólico, tal como se mencionó en el apartado I.4.1.

Se determinó la concentración de etanol remanente (apartado 2.2.5. de “Técnicas analíticas”) en el producto obtenido (vinagre joven) en cada uno de los ensayos.

2.2.2.4. Envasado. Maduración. Clarificación. Filtración.

Los vinagres recién obtenidos (jóvenes) se envasaron en botellas de vidrio y se almacenaron en lugar fresco, seco y oscuro para su maduración (o envejecimiento). Se dejaron clarificar espontáneamente, sin embargo, en los casos en que persistía cierta turbidez (observada a simple vista), se agregó una suspensión de bentonita al 5% (Ough, 1996) y posteriormente se filtró con filtro de 3 μm de porosidad a fin de obtener un producto límpido y transparente. Los vinagres clarificados se envasaron nuevamente en botellas de vidrio, para continuar con la etapa de maduración.

2.2.3. Diseños estadísticos experimentales.

Se trabajó con dos diseños estadísticos que consistieron en realizar un estudio preliminar con el propósito de explorar la región experimental donde se pudieran obtener diferencias en las variables respuesta al modificar los factores

experimentales y, un segundo diseño donde se buscó maximizar las variables respuesta.

2.2.3.1. Estudio preliminar del proceso de acetificación. Diseño factorial.

El diseño factorial suele utilizarse como estudio preliminar ya que permite juzgar si existe una conexión entre las variables y, aunque no sea posible explorar completamente la región experimental de cada factor, a menudo determinan una dirección hacia dónde dirigir una posterior investigación (Box, Hunter, & Hunter, 2008).

En virtud de que se buscó evaluar la influencia de los factores caudal de aire (Q_a) y velocidad de agitación (V_{ag}) del sistema sobre las variables respuestas velocidad de acetificación (r_A) y rendimiento GK (R_{GK}), se elaboró un diseño factorial de dos niveles (2^2) utilizando el software Statgraphics Centurion XV Corporate.

Para la elección de la región experimental de trabajo se tuvieron en cuenta investigaciones como la informada por Tesfaye et al. (2000) donde se determinaron las mejores condiciones experimentales para la preparación de un vinagre de vino en un fermentador de escala laboratorio, en la que se evaluó la velocidad de agitación entre 250 rpm y 450 rpm y el caudal de aire se mantuvo entre 0,33 y 0,98 vvm (volumen de aire/volumen de medio de cultivo/min). Además, Horiuchi et al. (2004) estudiaron el proceso de obtención de vinagre de cebolla en un fermentador con agitación controlada a 200 rpm, aunque en este caso sin inyección de aire. En otras experiencias, en las que se utilizaron fermentadores sin sistema de agitación mecánica, se utilizaron caudales de aire entre 0,2 y 0,6 vvm (de Ory, Romero, & Cantero, 1998; de Ory et al., 2004).

De esta manera se seleccionaron los niveles 0,6 L/min (0,3 vvm) y 1,2 L/min (0,6 vvm) para Q_a , mientras que, para V_{ag} se trabajó con: 200 rpm y 400 rpm. Las combinaciones resultantes se muestran en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Diseño factorial 2² para sustrato alcohólico de naranja.

	Caudal de aire (Qa), (L/min)	Velocidad de agitación (Vag), (rpm)
Tratamiento I	0,6 (0,3 vvm)	200
Tratamiento II	1,2 (0,6 vvm)	200
Tratamiento III	0,6 (0,3 vvm)	400
Tratamiento IV	1,2 (0,6 vvm)	400

Cada uno de los tratamientos se ensayó por duplicado.

El efecto de los factores se evaluó en función de los parámetros que normalmente se utilizan en la industria vinagrera para el control del proceso, velocidad de acetificación y rendimiento GK.

La velocidad de acetificación (r_A) se determinó según la ecuación 1.1 definida en el Capítulo 1, apartado 1.2.4:

$$r_A = \frac{AT_f - AT_i}{t_f - t_i}$$

El cálculo del rendimiento real en la industria vinagrera (rendimiento GK) se realiza comparando la concentración total del vinagre con la concentración total del sustrato. La concentración total (GK) se define como la suma de la acidez total (expresada como g de ácido acético por 100 mL) y de la acidez que se espera obtener por transformación del alcohol presente (Ormaechea Landa 1991; Tesfaye et al. 2000; Leonel et al. 2015):

$$\text{Concentración Total} = \text{Acidez Total} + (\% \text{ alcohol} \times 1,043) \quad (2.4)$$

Teniendo en cuenta la ecuación 2.4, el cálculo de R_{GK} se realizó mediante la siguiente expresión:

$$R_{GK} = \frac{\text{Conc. Total del Vinagre}}{\text{Conc. Total del Vino}} \times 100 \quad (2.5)$$

El análisis del diseño se efectuó mediante análisis de varianza (ANOVA) de los factores ensayados.

Las condiciones iniciales del sustrato, en todos los tratamientos, fueron: volumen del sustrato: 2 L, graduación alcohólica: $6,0 \pm 0,5$ % v/v, pH: $3,65 \pm 0,10$ y acidez total: $5,7 \pm 0,4$ g/L expresada como ácido acético. La temperatura se mantuvo en $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante todo el proceso.

2.2.3.2. Determinación de las mejores condiciones de acetificación.

Luego de ejecutar las experiencias del diseño factorial de dos niveles se elaboró un diseño central compuesto, donde los puntos axiales del mismo se determinaron según la ecuación $(2^k)^{1/4}$, con k=número de factores. La elección de los niveles de cada factor se basó en las conclusiones a las que se arribó luego del análisis del diseño factorial del apartado anterior. Para el factor Vag se consideraron los niveles (-1): 400 rpm y (+1): 800 rpm, y para Qa, (-1): 0,6 L/min (0,3 vvm) y (+1): 1,2 L/min (0,6 vvm). La combinación de los factores experimentales se muestra en la Tabla 2.2. Las respuestas estudiadas fueron r_A y R_{GK} . Se utilizó el software Statgraphics Centurion XV Corporate.

Tal como se ha mencionado, uno de los objetivos de este capítulo consistió en encontrar la mejor combinación de niveles de los factores que maximicen r_A y R_{GK} . Para el análisis del diseño se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) que ha sido empleada exitosamente para la modelización y optimización de varios procesos fermentativos (Garrido-Vidal et al. 2003; Ferreira et al. 2005; Silva et al. 2007).

CAPITULO 2. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema discontinuo.

Tabla 2.2. Diseño experimental de la etapa de acetificación discontinua de sustrato alcohólico de naranja, utilizando *Acetobacter* sp.

<i>Factores originales</i>		<i>Factores codificados</i>		
Velocidad de agitación (rpm)	Caudal de aire (L/min)	Velocidad de agitación (rpm)	Caudal de aire (vvm)	
400	0,60	-1	-1	} 2^2
400	1,20	-1	+1	
800	0,60	+1	-1	
800	1,20	+1	+1	
883	0,90	1,414	0	} Puntos axiales
317	0,90	-1,414	0	
600	1,32	0	1,414	
600	0,48	0	-1,414	
600	0,90	0	0	} Puntos centrales
600	0,90	0	0	
600	0,90	0	0	
600	0,90	0	0	

Para la determinación de las mejores condiciones de proceso para cada respuesta en forma individual, se utilizó la función Optimización de Respuestas del software mencionado, mientras que para determinar la configuración de los factores experimentales considerando ambas repuestas simultáneamente, se empleó la función Optimización de Respuestas Múltiples (Deseabilidad).

Teniendo en cuenta el efecto activador del ácido acético a 10 g/L (Introducción, apartado I.4.1), la acidez total del sustrato se ajustó con un vinagre de naranjas previamente elaborado, en volumen necesario para lograr

esa concentración. De esta manera, las condiciones iniciales del sustrato en todos los tratamientos fueron: volumen del sustrato: 2 L, graduación alcohólica: 6,0±0,5 % v/v, pH: 3,40±0,05 y acidez total: 9,7±0,6 g/L expresada como ácido acético. La temperatura del proceso se fijó en 30±1°C.

2.2.4. Determinación de parámetros cinéticos

2.2.4.1. Relación entre velocidad de crecimiento bacteriano y velocidad de acetificación.

Como es característico para el estudio de cualquier sistema biológico, se evaluó la relación entre la velocidad volumétrica de crecimiento microbiano (r_X) y la velocidad volumétrica de formación de producto, en este caso, velocidad de acetificación (r_A), mediante análisis de regresión simple.

Para la determinación de r_X se debe considerar que en un sistema batch, este parámetro se obtiene como la variación de la concentración celular o biomasa (X) en función del tiempo (t), es decir:

$$r_X = \frac{dX}{dt} \quad (2.6), \text{ (Ertola, Yantorno, \& Mignone, 1994)}$$

Por lo que, para este caso, la ecuación (2.6) resulta:

$$r_X = \frac{(X_2 - X_1)}{(t_2 - t_1)} \quad (2.7)$$

donde: X_1 y X_2 = concentración celular (g/100 mL vinagre) para los tiempos t_1 y t_2 , respectivamente.

Se empleó la técnica de estimación de X (apartado 2.2.5. de "Técnicas analíticas"), con la que se obtuvieron pares de datos de peso seco de biomasa vs. densidad óptica. Mediante representación gráfica se pudo establecer una ecuación para el cálculo de X .

2.2.4.2. Velocidad específica máxima de crecimiento bacteriano (μ_M).

El crecimiento microbiano también se describe mediante la siguiente ecuación:

$$r_X = \mu \times X \quad (2.8)$$

, donde μ es la velocidad específica de crecimiento microbiano. Debido a la naturaleza autocatalítica de este crecimiento, es razonable suponer que X influye en la velocidad con que aumenta la población, r_X .

Para un tipo de microorganismo dado, μ depende principalmente de la composición y concentración del medio de cultivo, presencia de inhibidores, temperatura y pH. Durante el crecimiento equilibrado, μ está relacionada con la concentración de sustrato limitante mediante la ecuación de Monod:

$$\mu = \frac{\mu_M \times S}{K_S + S} \quad (2.9)$$

donde, μ_M es la velocidad específica máxima de crecimiento microbiano, S la concentración de sustrato limitante del crecimiento y K_S la constante de saturación que está inversamente relacionada con la afinidad del microorganismo por el sustrato. Puesto que los valores de K_S son normalmente muy pequeños, del orden de los mg/L, generalmente S es superior a K_S durante la mayor parte del cultivo. De esta manera μ es constante e igual a μ_M en los cultivos discontinuos hasta que el sustrato está prácticamente agotado (Ertola et al., 1994; Doran, 1998).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, para un sistema discontinuo se obtiene la siguiente expresión para X en función del tiempo t :

$$\ln X = \ln X_o + \mu_M \times t \quad (2.10)$$

Donde, X_0 es la concentración de biomasa al inicio de la fase exponencial y t , el tiempo transcurrido en esta fase.

Tal como se mencionó en el apartado I.4.1. de la Introducción general, aunque la característica distintiva de las BAA es su habilidad para metabolizar el etanol en ácido acético, ambos compuestos ejercen influencias complicadas durante el crecimiento como son los efectos sinérgicos o inhibidores que dependen de sus concentraciones en el medio (de Ory et al., 1998; Raspor & Goranovic, 2008).

Existen varios modelos cinéticos que predicen el efecto de varios parámetros sobre μ en BAA, ya sea individualmente (Nanba, Tamura, & Nagai, 1984; de Ory et al., 1998) o en conjunto si se considera el efecto sinérgico (Romero, Gomez, Caro, & Cantero, 1994). En este caso, la expresión resultante es una combinación de tres funciones: una de ellas depende de la concentración de etanol, otra de la de ácido acético y la última, de la concentración de oxígeno disuelto, pero no se considera la influencia de la temperatura.

No obstante, a pesar de no disponer de los instrumentos necesarios para la determinación de todas las variables que involucran los modelos cinéticos, se calculó la velocidad específica máxima de crecimiento bacteriano (μ_M) según la ecuación (2.10).

2.2.5. Técnicas analíticas

Graduación alcohólica: se cuantificó mediante destilación del sustrato alcohólico alcalinizado con una solución de hidróxido de calcio y posterior determinación del grado alcohólico en el destilado por areometría. Los resultados se expresaron como % v/v (International Organisation of Vine and Wine, 2009).

Acidez total: mediante titulación con solución de hidróxido de sodio (NaOH) y fenolftaleína como indicador (AOAC, 2005, 18th Ed., Official Method 962.12). Para la caracterización del vino de naranja, los resultados se

CAPITULO 2. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema discontinuo.

expresaron como g de ácido cítrico anhidro/L de vino. Las muestras tomadas durante la preparación del inóculo y en cada proceso de acetificación, se expresaron como g/L de ácido acético (se asumió que toda la acidez del medio se debe a este ácido).

Acidez volátil: se utilizó el método basado en la destilación directa del vino y posterior valoración de los ácidos volátiles separados con NaOH N/20 en presencia de fenolftaleína. Se expresó como g ácido acético/L vino (Aleixandre Benavent & García Esparza, 1996).

pH: método potenciométrico, con peachímetro BOECO modelo BT-500 (Germany) (AOAC, 2005, 18th Ed., Official Method 960.19).

Sólidos solubles: método refractométrico, expresando los resultados en °Brix (corregidos por temperatura y acidez) con refractómetro termocompensable ATAGO modelo NAR 1T (Japón).

Azúcares reductores directos: técnica volumétrica de Lane-Eynon (AOAC, 1995, 16th Ed., Official Method 923.09). Los resultados se expresaron como g/100 mL de vino.

Glicerol: mediante kit enzimático de Boehringer Mannheim/R-Biopharm, kit # 0148270), expresado en g/L.

Anhídrido sulfuroso (SO₂) libre y total: fueron determinados por iodometría (Método Ripper Simple), expresados en mg/L (Aleixandre Benavent & García Esparza, 1996).

Densidad óptica (DO): medición de la absorbancia a 540 nm., en espectrofotómetro UV-visible SHIMADZU, modelo UV 1603 (Japón).

Recuento celular (RC): en microscopio óptico LEICA modelo DME (New York, USA), con cámara de Petroff-Hauser de 0,02 µL. El resultado se expresó como número de bacterias/mL.

Concentración de etanol remanente: fue analizada mediante el kit enzimático de Boehringer Mannheim/R-Biopharm, Cat. N° 10176290035, expresada como % v/v.

Concentración celular (X): ya que la técnica para la estimación de X requiere grandes volúmenes de muestra debido a la pequeña masa celular de las bacterias acéticas, se determinó experimentalmente la concentración de materia seca en varias muestras tomadas durante los procesos de acetificación, con valores conocidos de D.O. ($\lambda=540$ nm) en el rango entre 0,1000-2,4000. Estas muestras fueron centrifugadas cuatro veces a 4000 rpm/20 min en centrífuga BOECO, modelo C-28 (Germany) y descartado el sobrenadante. Una última centrifugación del pellet obtenido, resuspendido con solución fisiológica se realizó a 14000 rpm/15 min en centrífuga LABNET, modelo Spectrafuge 16 M (USA). Se descartó el sobrenadante y el criotubo, previamente pesado, con el sedimento se colocó en estufa DALVO Instrumentos, modelo CMR1I (Argentina), a 105 °C (Krusong, Yaiyen, & Pornpukdeewatana, 2014) hasta peso constante. Esta medida se realizó en una balanza analítica BOECO modelo BPB31 (Germany) de 210 g de capacidad y d=0,1 mg. De esta forma, se obtuvieron pares de datos de materia seca de biomasa-densidad óptica. Mediante su representación gráfica se pudo establecer una ecuación para el cálculo de X. La materia seca determinada, es equivalente a la concentración celular y fue expresada como g/L de vinagre.

2.2.6. Tratamiento estadístico

2.2.6.1. Diseño factorial 2²

La evaluación de la influencia de los factores Q_a y V_{ag} sobre las variables respuestas r_A y R_{GK} , se realizó mediante un diseño factorial de dos niveles (2^2) utilizando el software Statgraphics Centurion XV Corporate. El análisis del diseño se efectuó mediante análisis de varianza (ANOVA) de los factores ensayados. Se consideró que hubo diferencias estadísticas significativas para un factor determinado cuando el p-valor del ANOVA fue menor que 0,05. Cuando fue necesaria la comparación de los tratamientos que presentaron diferencias estadísticas significativas, se empleó contraste múltiple de rangos mediante test de Fisher (LSD), para un nivel de confianza del 95 %.

2.2.6.2. Obtención de las mejores condiciones de acetificación.

La determinación de las condiciones experimentales, Vag y Qa, que maximizaron cada variable respuesta individualmente, se realizó siguiendo la metodología de superficie de respuesta aplicado a un diseño central compuesto y rotatable con software STATGRAPHICS Centurión XV (Gutiérrez Pulido & Vara Salazar, 2008). Mediante análisis de varianza se analizaron los factores significativos e interacciones en cada respuesta. Se consideró que un factor ejerció influencia estadística significativa sobre una variable respuesta, si $p < 0,05$.

Por otra parte, dado que en la presente investigación se analizaron dos variables respuestas, la mejor combinación de factores que maximizaron estas últimas en forma simultánea, se determinó utilizando la función Deseabilidad del mencionado software, que optimiza variables respuestas múltiples.

Los datos experimentales se ajustaron a una ecuación polinómica que describió las relaciones entre cada variable respuesta y los factores estudiados, mediante el método de regresión múltiple. Además, para una mejor visualización de los datos experimentales, se obtuvieron gráficos de superficie de respuesta y de contorno.

Se verificó la idoneidad del modelo propuesto con el diseño experimental, mediante la verificación de supuestos a través de las pruebas de Kolmogorov-Smirnov, estadístico W de Shapiro-Wilk y Chi-Cuadrado. En estos tres casos se debió comprobar que $p > 0,05$, mientras que los estadísticos de sesgo y curtosis estandarizados debieron presentar valores entre -2 y +2. Además, la normalidad e independencia de los residuos se comprobó mediante la prueba de Durbin Watson ($p > 0,05$).

2.2.6.3. Análisis de regresión

Con este análisis se permite modelar en forma matemática el comportamiento de una variable respuesta en función de uno o más factores independientes (Gutiérrez Pulido & Vara Salazar, 2008). Este análisis estadístico se utilizó para evaluar la relación entre la velocidad volumétrica de crecimiento microbiano (r_X) y la velocidad de acetificación (r_A).

Para establecer la bondad con que el modelo explicó la relación entre ambas variables se evaluaron la significancia de la regresión (p-valor) y el coeficiente de correlación (r). Se consideró que el modelo de regresión fue significativo si $p < 0,05$. Además, puesto que r varía entre -1 y +1, valores cercanos a los extremos indican una fuerte relación lineal (negativa o positiva, respectivamente) entre las variables, mientras que valores próximos a 0, indican que no hubo correlación lineal entre ellas.

2.3. Resultados y Discusión

2.3.1. Caracterización del vino de naranja.

El sustrato utilizado para los estudios de acetificación presentó las siguientes características fisicoquímicas:

Tabla 2.3. Caracterización fisicoquímica del vino de naranjas.

<i>Vino de naranjas</i>	
Etanol (% v/v)	13,72±0,12
pH	3,91±0,02
Acidez total (% ácido cítrico)	0,69±0,03
Acidez volátil (% ácido acético)	0,18±0,01
Azúcares reductores directos (%)	0,52±0,03
Sólidos solubles	8,5±0,1
Glicerol (g/L)	5,6±0,2
SO ₂ total (mg/L)	6,4±0,3
SO ₂ libre (mg/L)	2,2±0,1

Teniendo en cuenta que las bacterias acéticas pueden crecer en vinos que contienen 20 mg/L de SO₂ libre (Joyeux, Lafon-Lafourcade, & Ribereau-Gayon, 1984), se consideró que no era necesaria su eliminación del vino cítrico previo a la inoculación ya que, la posterior dilución con la solución de nutrientes contribuye a disminuir aún más su ya baja concentración.

2.3.2. Análisis del diseño factorial 2²

Los resultados experimentales obtenidos en los tratamientos ensayados se indican en la Tabla 2.4. Las letras minúsculas diferentes en una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los distintos tratamientos ($p < 0,05$), determinadas mediante la prueba de contraste múltiple de rangos según se especificó en la metodología.

CAPITULO 2. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema discontinuo.

Tabla 2.4. Resultados del proceso de acetificación de un sustrato alcohólico de naranjas con *Acetobacter* sp., en sistema discontinuo.

	Tratamiento I	Tratamiento II	Tratamiento III	Tratamiento IV
Velocidad de acetificación global (g/L/h)	0,22±0,02 ^a	0,28±0,03 ^a	0,94±0,04 ^b	1,21±0,02 ^b
Rendimiento GK (%)	70,3±0,9 ^a	71,0±0,8 ^a	79,6±0,2 ^b	80,7±2,6 ^b
Tiempo total de proceso (h)	201,50±4,95 ^a	158,00±4,24 ^b	51,50±0,71 ^c	41,50±3,54 ^c

Tratamiento I: 0,3 vvm / 200 rpm. Tratamiento II: 0,6 vvm / 200 rpm. Tratamiento III: 0,3 vvm / 400 rpm. Tratamiento IV: 0,6 vvm / 400 rpm. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los distintos tratamientos ($p < 0,05$).

Los pares de tratamientos realizados con igual velocidad de agitación (I y II a 200 rpm, III y IV a 400 rpm) no presentaron diferencias estadísticas significativas con respecto a la velocidad de acetificación, mientras que en aquellos efectuados con igual caudal de aire (I y III a 0,3 vvm, II y IV a 0,6 vvm) se observó un importante aumento en r_A en los pares realizados a mayor V_{ag} . Efectivamente, tanto en III (0,94±0,04 g/L/h) como en IV (1,21±0,02 g/L/h) la r_A cuadruplicó su valor respecto de I (0,22±0,02 g/L/h) y II (0,28±0,03 g/L/h), respectivamente.

Una forma de visualizar este comportamiento es mediante la representación de la acidez total en función del tiempo. Según se aprecia en la Figura 2.3, la pendiente de las curvas, indicadora de la velocidad de producción de ácido, resultó mayor para los procesos realizados a 400 rpm.

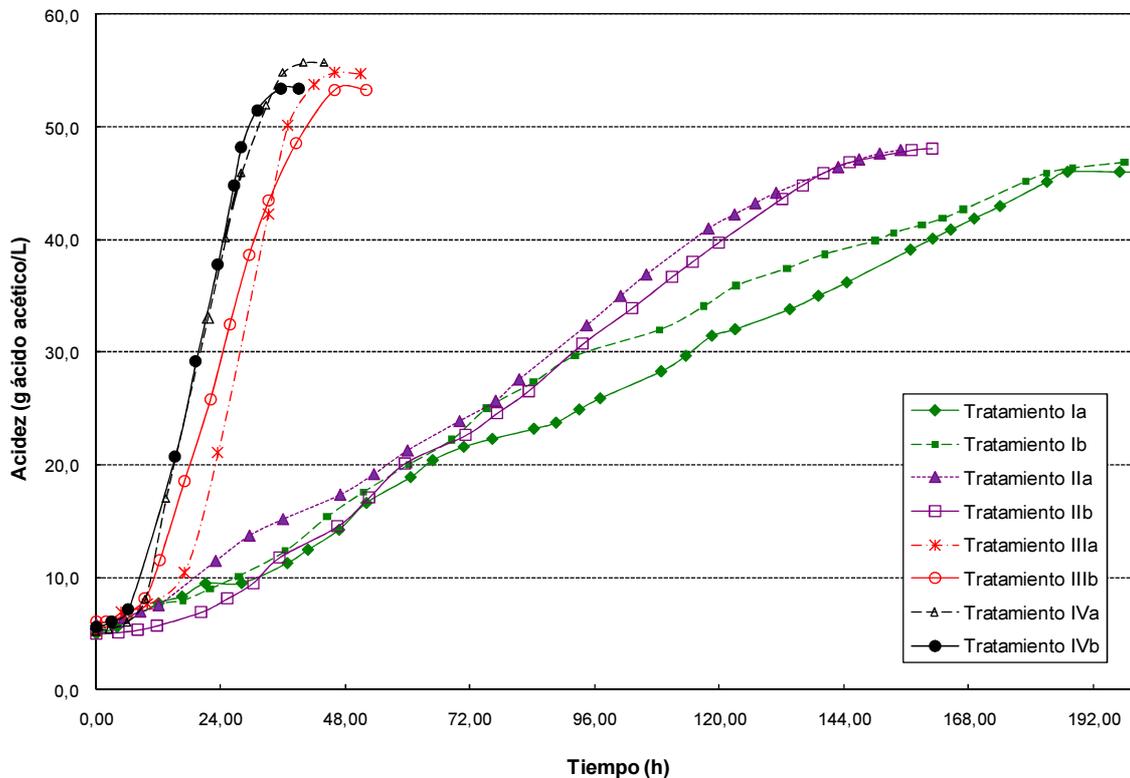


Figura 2.3. Evolución de la acidez total durante la biooxidación de un sustrato alcohólico de naranjas utilizando *Acetobacter* sp. en cultivo batch. Tratamiento Ia y Ib: 0,3 vvm/200 rpm. Tratamiento IIa y IIb: 0,6 vvm/200 rpm. Tratamiento IIIa y IIIb: 0,3 vvm/400 rpm. Tratamiento IVa y IVb: 0,6 vvm/400 rpm.

Un comportamiento similar se pudo verificar respecto del rendimiento GK, donde los tratamientos realizados a 400 rpm exhibieron un mayor valor de esa variable respuesta respecto de aquellos cuya velocidad de agitación fue de 200 rpm.

De particular interés resultan los tiempos de proceso de estos ensayos, dada la importancia que estos tienen en un sistema productivo. Según se indica en la tabla 2.4, ambos ensayos efectuados a 400 rpm concluyeron en un período notablemente inferior que aquellos en los que la Vag fue de 200 rpm.

2.3.2.1. Velocidad de acetificación

El análisis de varianza para velocidad de acetificación indicó que los factores V_{ag} y Q_a así como su interacción (V_{ag} - Q_a), tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre esa variable respuesta ($p < 0,05$).

Se observó un importante incremento en r_A a medida que se aumentó la V_{ag} para ambos niveles de Q_a , si bien la mayor pendiente correspondió a $Q_a = 1,2$ L/min (Figura 2.4).

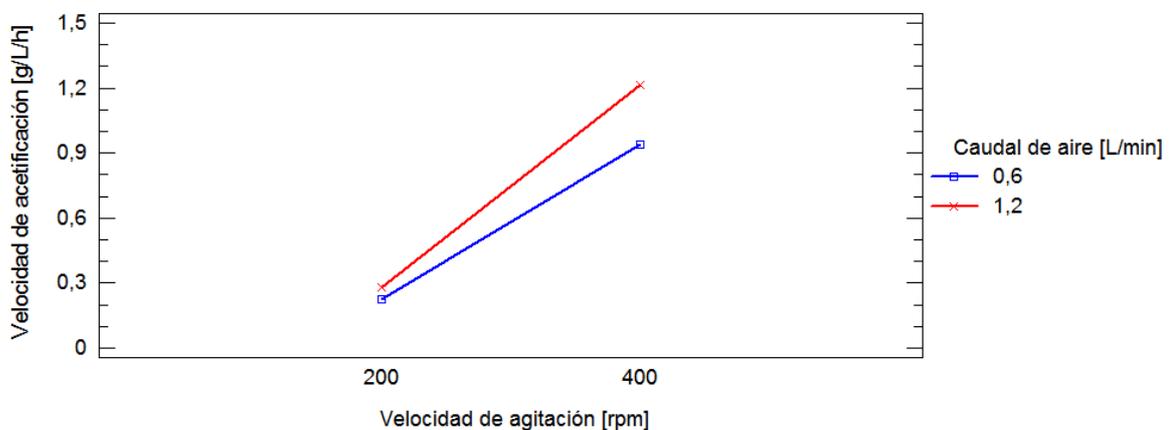


Figura 2.4. Interacciones entre velocidad de agitación y caudal de aire sobre la velocidad de acetificación, durante la bioxidación de un sustrato alcohólico de naranja utilizando *Acetobacter* sp. en cultivo batch.

Retomando la teoría de la transferencia de materia gas-líquido y el consumo de oxígeno en cultivos celulares descrita en la Introducción de este capítulo y, observando la Figura 2.5 en la que se muestran las curvas de crecimiento microbiano, resulta factible pensar que el importante aumento en la r_A producido en los tratamientos III respecto del I y en el IV respecto del II (realizados con igual Q_a) podría deberse a que el aumento en la velocidad del rodete del agitador produjo una disminución en el tamaño de las burbujas. Así, cuanto mayor fue el área interfacial por unidad de volumen de las burbujas, se vio mejorado el k_{La} , por lo que resultó mayor la velocidad de transferencia de oxígeno desde la fase gaseosa a la fase líquida (de Ory et al., 2004; García-

García, Santos-Dueñas, Jiménez-Ot, Jiménez-Hornero, & Bonilla-Venceslada, 2009). De esta manera se lograron poblaciones bacterianas suficientemente elevadas como para incrementar la velocidad de bioconversión de vino en vinagre.

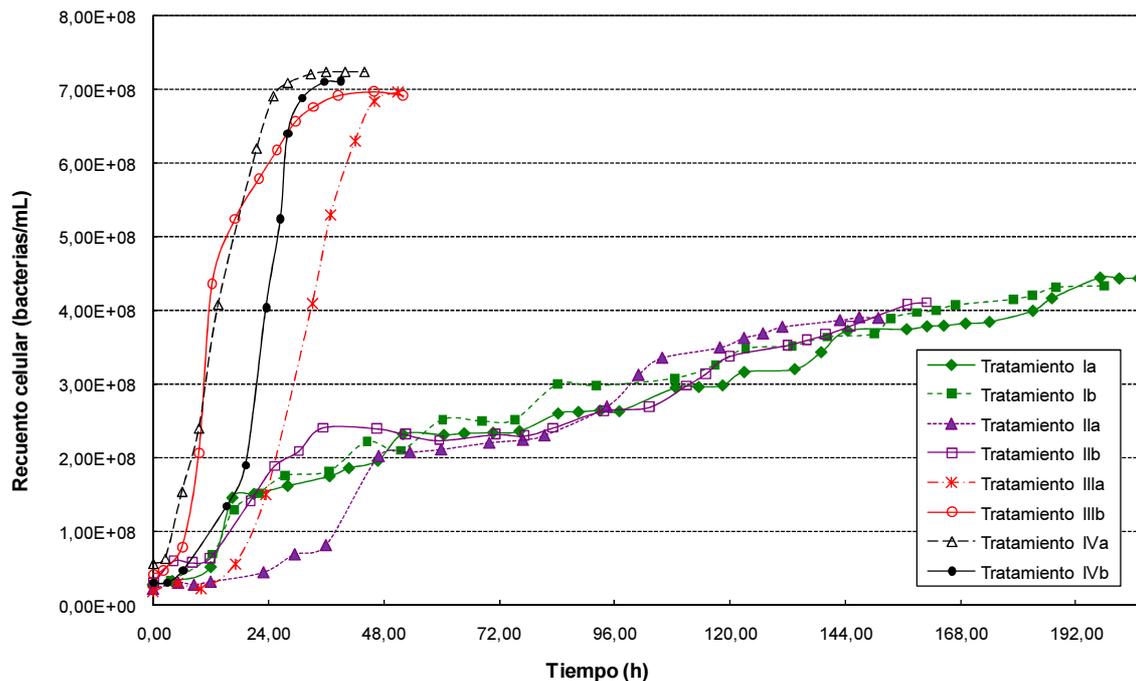


Figura 2.5. Evolución de los recuentos celulares durante la biooxidación de un sustrato alcohólico de naranja utilizando *Acetobacter* sp. en cultivo batch. Tratamiento Ia y Ib: 0,3 vvm/200 rpm. Tratamiento IIa y IIb: 0,6 vvm/200 rpm. Tratamiento IIIa y IIIb: 0,3 vvm/400 rpm. Tratamiento IVa y IVb: 0,6 vvm/400 rpm.

Los recuentos iniciales de *Acetobacter* sp. en todos los tratamientos fueron de $3,20 \times 10^7 \pm 1,19 \times 10^7$ bacterias/mL. Mientras que en I y II la población bacteriana alcanzó valores de $4,39 \times 10^8 \pm 7,78 \times 10^6$ y $4,01 \times 10^8 \pm 1,48 \times 10^7$ bacterias/mL respectivamente al finalizar cada ensayo, el tratamiento III alcanzó recuentos de $6,97 \times 10^8 \pm 7,07 \times 10^5$ bacterias/mL y el tratamiento IV, $7,18 \times 10^8 \pm 9,19 \times 10^6$ bacterias/mL, por lo que los recuentos aumentaron entre un

60 y 80 % cuando el tamaño de las burbujas en el sistema de fermentación fue menor. Esto quedó evidenciado, como se mencionó previamente, en la reducción de los tiempos de fermentación desde 8 y 6 días (I y II respectivamente) a un promedio inferior a los 2 días (III y IV).

Es evidente entonces que cuanto mayor fue la velocidad de agitación, mayor fue la velocidad de bioconversión de vino en vinagre. Este efecto también ha sido observado por otros investigadores como Fregapane et al. (1999) y Levonen-Muñoz & Cabezudo (1981) entre otros. Además, según lo informado por Tesfaye et al. (2000) para un sistema semicontinuo, la velocidad de agitación juega un rol muy importante para lograr una mejor velocidad de acetificación.

Sin embargo, analizando los pares de tratamientos realizados con igual V_{ag} , es decir aquellos en que se evaluó el incremento en Q_a , no se observó un aumento en r_A . Esto podría atribuirse a que en condiciones de operación típicas de los fermentadores, un aumento en la velocidad del agitador mejora el valor del coeficiente volumétrico de transferencia de materia (k_{La}), mientras que un aumento en el caudal de gas produce generalmente un efecto muy pequeño sobre k_{La} (Doran, 1998). De este modo, si el k_{La} no se modifica sustancialmente, R_{O_2} no varía, y no se logran poblaciones bacterianas más elevadas, con lo que la velocidad de conversión de vino en vinagre (r_A) tampoco varía (Nieto, 1991). Una situación similar fue reportada por Schlepütz et al. (2013) quienes observaron bajas velocidades de formación de ácido acético cuanto más grandes fueron las burbujas de aire como consecuencia de las menores velocidades de transferencia de oxígeno.

2.3.2.2. Rendimiento GK

El análisis de varianza indicó que sólo la V_{ag} tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre el rendimiento GK, no así Q_a ni la interacción entre los factores tal como se aprecia en la figura 2.6, demostrado por las líneas prácticamente paralelas.

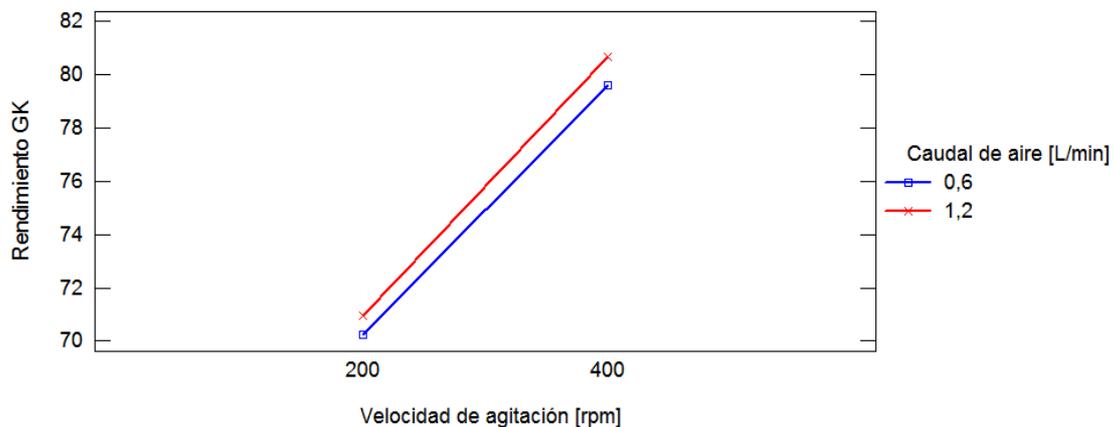


Figura 2.6. Interacciones entre velocidad de agitación y caudal de aire sobre el rendimiento GK durante la bioxidación de un sustrato alcohólico de naranja, utilizando *Acetobacter* sp. en cultivo batch.

Del mismo modo que en el análisis de r_A , se consideró que un aumento en la agitación del sistema podría haber provocado un aumento en la velocidad de transferencia de oxígeno al medio lo que favoreció el crecimiento microbiano y la transformación de etanol en ácido acético. Esto se logró en un período comprendido entre 41,5-51,5 horas (Tabla 2.4). Sin embargo, en los tratamientos efectuados a menor V_{ag} (I y II) se observa que el estado estacionario en la producción de ácido acético se alcanzó a las 201,50 y 158 horas respectivamente, por lo que se estima que la lentitud del proceso pudo haber provocado la evaporación de sus componentes volátiles (etanol, acetaldehído o ácido acético) y con ello, los menores R_{GK} .

En estudios realizados para la obtención de vinagre de jengibre en sistema estático a temperaturas de 20 y 27°C, se observó una disminución en los valores de rendimiento GK, más pronunciada a medida que se prolongaba el tiempo de fermentación y fue atribuido a la evaporación de los ácidos volátiles (Leonel et al., 2015).

En la figura 2.7 se esquematizan los valores de rendimientos GK obtenidos en los tratamientos y sus réplicas.

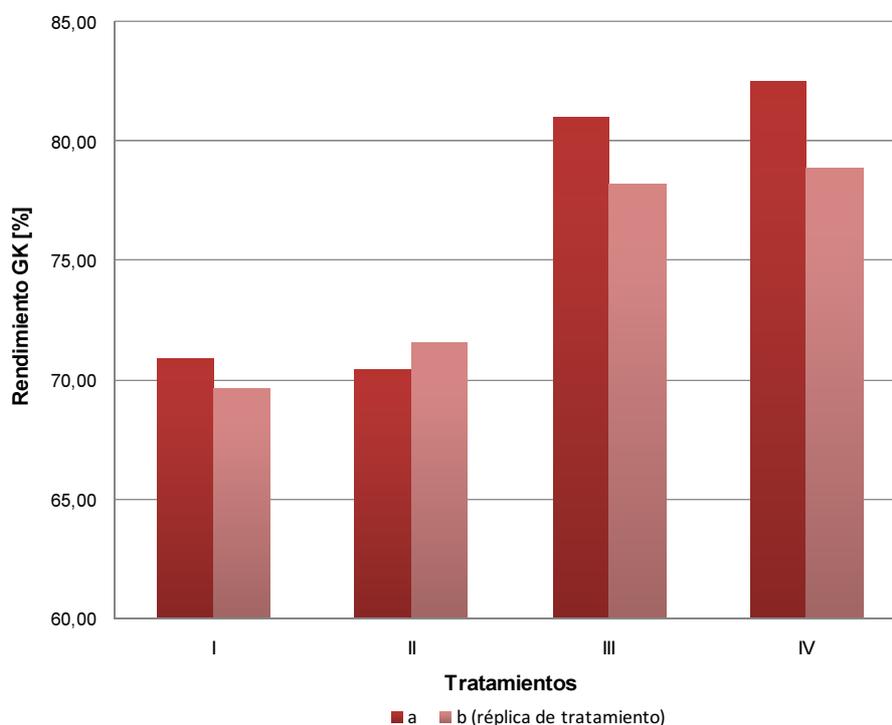


Figura 2.7. Rendimiento GK de vinagres de naranja obtenidos en cultivo batch con *Acetobacter* sp. para cada tratamiento y su réplica. Tratamiento Ia y Ib: 0,3 vvm/200 rpm. Tratamiento IIa y IIb: 0,6 vvm/200 rpm. Tratamiento IIIa y IIIb: 0,3 vvm/400 rpm. Tratamiento IVa y IVb: 0,6 vvm/400 rpm.

2.3.3. Determinación de las mejores condiciones de proceso.

De acuerdo a lo establecido en la metodología, luego del análisis factorial se realizó un diseño central compuesto, con el que se ensayaron distintas combinaciones de los factores V_{ag} y Q_a y donde las respuestas evaluadas fueron r_A y R_{GK} .

En este caso, los niveles de los factores se seleccionaron considerando los resultados obtenidos del diseño factorial. Teniendo en cuenta que el tiempo total de los procesos desarrollados a 200 rpm fue muy prolongado y con bajos rendimientos de producto, para el análisis mediante MSR, se decidió aumentar

CAPITULO 2. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema discontinuo.

los niveles del factor V_{ag} a 400 rpm y 800 rpm, mientras que se mantuvieron aquellos establecidos para Q_a .

Si bien los ensayos se realizaron en forma aleatoria, a continuación se muestran los resultados de manera ordenada para facilitar la lectura (Tabla 2.5). Se observa un comportamiento similar al observado en el apartado previo, donde a las mayores V_{ag} , tanto r_A como R_{GK} son mayores.

Tabla 2.5. Respuestas obtenidas en el diseño experimental (MSR) de la acetificación batch de un sustrato alcohólico de naranjas con *Acetobacter* sp.

Velocidad de agitación [rpm]	Caudal de aire [L/min]	Velocidad de acetificación [g/L/h]	Rendimiento GK [%]
317	0,90 (0,45 vvm)	0,64	67,76
400	0,60 (0,30 vvm)	0,95	79,20
400	1,20 (0,60 vvm)	1,30	77,90
600	0,48 (0,24 vvm)	1,33	82,53
600	0,90 (0,45 vvm)	2,48	81,53
600	0,90 (0,45 vvm)	2,32	90,07
600	0,90 (0,45 vvm)	1,98	90,23
600	0,90 (0,45 vvm)	2,56	90,54
600	1,32 (0,66 vvm)	1,89	82,48
800	0,60 (0,30 vvm)	2,08	89,34
800	1,20 (0,60 vvm)	1,61	77,83
883	0,90 (0,45 vvm)	1,99	83,86

A continuación, el diseño experimental se analizó con la MSR y se verificó la idoneidad del modelo propuesto, según se detalló en la metodología.

2.3.3.1. Velocidad de acetificación

La ecuación de r_A obtenida con la MSR fue la siguiente:

$$r_A = - 8,77 + 0,02 \times V_{ag} + 9,47 \times Q_a - 1,26 \cdot 10^{-5} \times V_{ag}^2 - 3,42 \cdot 10^{-3} \times V_{ag} \times Q_a - 3,97 \times Q_a^2 \quad (2.11)$$

El análisis de varianza indicó que el factor velocidad de agitación, en sus componentes lineal (V_{ag}) y cuadrática (V_{ag}^2) y la componente cuadrática del caudal de aire (Q_a^2), tuvieron efecto significativo sobre r_A ($p < 0,05$), mientras que la componente lineal del caudal de aire (Q_a) no tuvo influencia significativa en la región experimental ensayada. En la ecuación 2.11 se expresan todos los términos correspondientes a los factores, hayan resultado significativos o no.

Dado que el p-valor para la falta de ajuste fue mayor que 0,05 y el estadístico R^2 resultó 91,80 %, este modelo parecería ser adecuado para describir la variabilidad de r_A en función de la V_{ag} y de Q_a .

A partir de la ecuación 2.11 se estudió la influencia de los factores sobre la variable respuesta. Para ello se elaboraron gráficos de superficies de respuesta. Se puede observar el incremento de r_A con el aumento de V_{ag} hasta valores entre 600 y 700 rpm, para luego disminuir lentamente (Figura 2.8). Incrementos en Q_a hasta aproximadamente 0,8-1,0 L/min (0,4-0,5 vvm) provocó un aumento de r_A , mientras que cuando se continuó aumentando Q_a por encima del valor mencionado, la variable respuesta disminuyó.

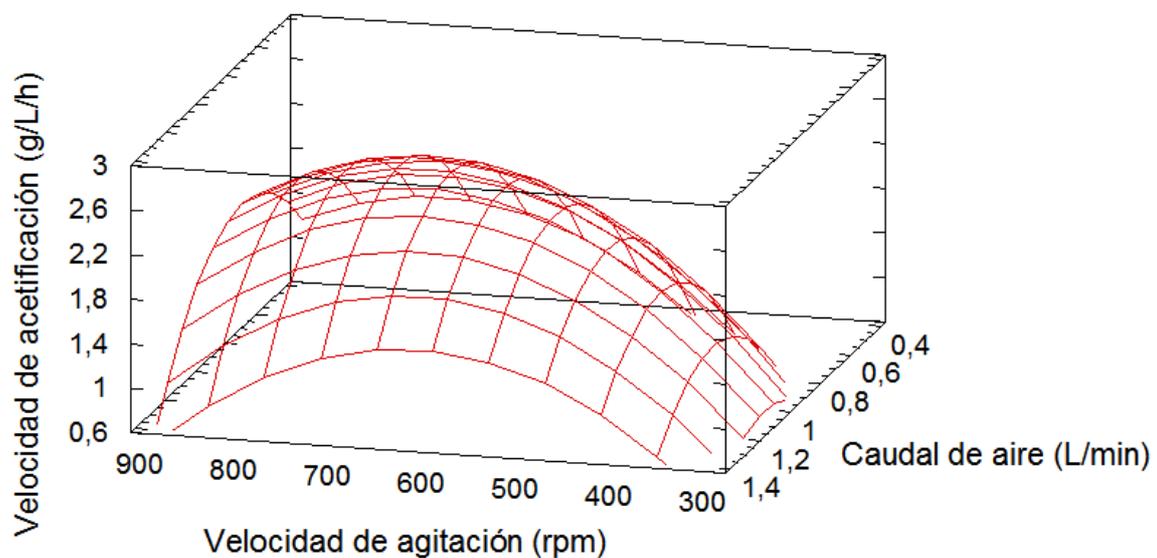


Figura 2.8. Superficie de respuesta estimada para velocidad de acetificación durante la producción de vinagre de naranja.

Este comportamiento puede asociarse a un efecto de inhibición del oxígeno suministrado sobre la velocidad de crecimiento específico de las BAA debido a que contribuye al stress oxidativo y al daño proteico intracelular (Cabiscol, Tamarit, & Ros, 2000; Garrido-Vidal et al., 2003).

Garrido-Vidal et al. (2003) informaron una situación similar en un sistema continuo de acetificación, donde en un intervalo de caudal de aire de 0,42-0,5 vvm ($25-30 \text{ h}^{-1}$) se presentó un máximo en la velocidad específica de crecimiento microbiano a 644,4 rpm, sugiriendo algún tipo de inhibición en la producción de ácido acético. También Rubio-Fernández et al. (2004) y Park et al. (1989) encontraron que altas concentraciones de oxígeno disuelto podían inhibir el crecimiento de las bacterias acéticas.

Con el fin de determinar los niveles de los factores que maximizaron r_A , se utilizó la función Optimización de Respuestas del software STATGRAPHICS Centurión XV. A este punto le correspondió una velocidad de acetificación de 2,42 g/L/h y la combinación de factores que se identificó como más adecuada

fue: 683 rpm y 0,90 L/min (0,45 vvm). Para una mejor localización de este punto se presenta la figura 2.9.

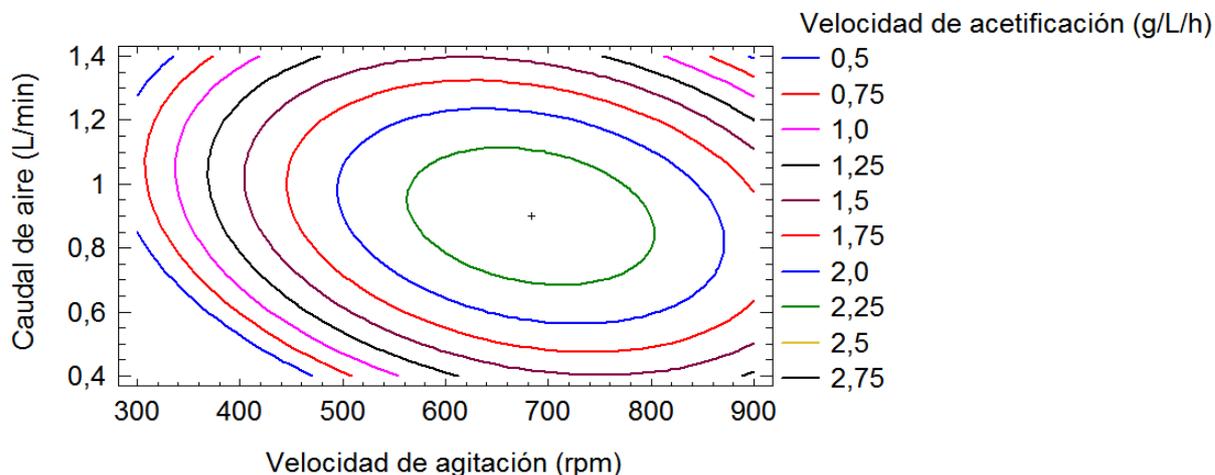


Figura 2.9. Región de la superficie de respuesta donde se maximiza la velocidad de acetificación para vinagre de naranja.

Como se puede observar estos valores presentan una similitud con aquellos obtenidos por Garrido-Vidal et al. (2003) durante el estudio de variables de proceso involucradas en la acetificación en sistema continuo de un vino blanco de La Rioja (España) según se mencionó en el apartado anterior.

2.3.3.2. Rendimiento GK

La ecuación obtenida para el rendimiento GK mediante MSR fue la siguiente:

$$R_{GK} = -14,18 + 0,23 \times V_{ag} + 66,48 \times Q_a - 1,42 \cdot 10^{-4} \times V_{ag}^2 - 0,04 \times V_{ag} \times Q_a - 25,74 \times Q_a^2 \quad (2.12)$$

El análisis de varianza indicó que el factor velocidad de agitación, en su componente cuadrática (V_{ag}^2), tuvo un efecto significativo en el rendimiento GK ($p < 0,05$), mientras que Q_a no presentó influencia significativa en la región

experimental ensayada. En la ecuación 2.12 se expresan todos los términos correspondientes a los factores, hayan resultado significativos o no.

Dado que el p-valor para la falta de ajuste fue mayor que 0,05 y el estadístico R^2 resultó 79,01 %, este modelo parecería ser adecuado para la descripción de la variabilidad de los datos de R_{GK} en función de la velocidad de agitación y el caudal de aire.

A partir de la ecuación 2.12, se estudió la influencia de los factores sobre la variable respuesta, para lo que se elaboraron gráficos de superficies de respuesta. Se observa un mayor valor de R_{GK} hacia valores superiores de V_{ag} e inferiores de Q_a , mientras que los menores rendimientos se hallan, en general, a bajas V_{ag} en todo el intervalo de Q_a ensayado (Figura 2.10).

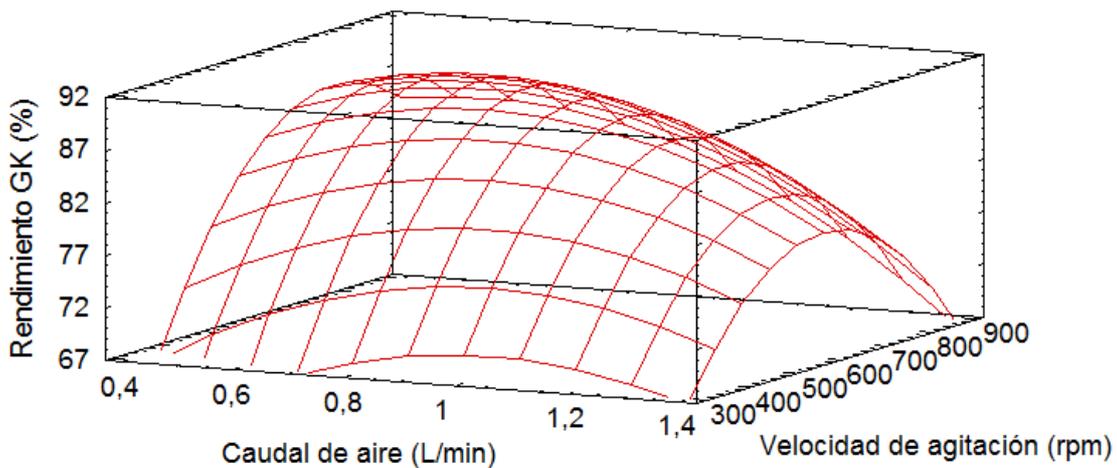


Figura 2.10. Superficie de respuesta estimada para rendimiento GK durante la producción de vinagre de naranja.

Mediante la función de optimización de respuestas, se determinaron los niveles de los factores experimentales estudiados que maximizaron el rendimiento GK. La combinación de factores que se identificó como más

adecuada fue: 701 rpm y 0,71 L/min (0,36 vvm), para los cuales correspondió un R_{GK} de 89,63 %.

En la figura 2.11 se representa la combinación de los niveles de los factores, que maximizó el rendimiento GK sobre la región indicada.

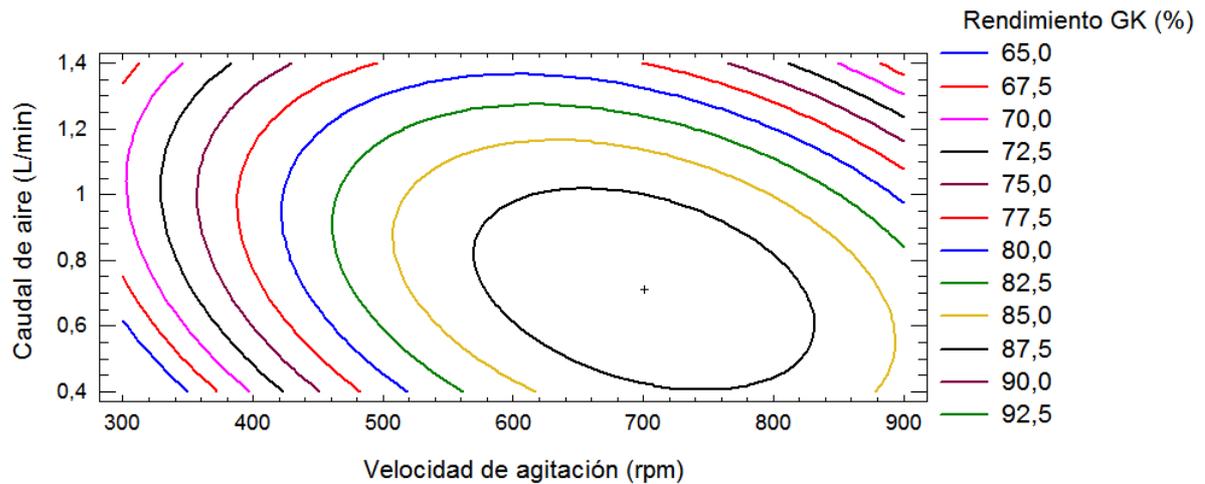


Figura 2.11. Región de la superficie de respuesta donde se maximiza el rendimiento GK para vinagre de naranja.

2.3.3.3. Combinación de factores que optimizan ambas respuestas.

Por último, se determinó la combinación de los factores experimentales que simultáneamente optimizó ambas respuestas analizadas, mediante la función “deseabilidad” del software estadístico utilizado. La combinación de factores que hizo máxima esa función (0,99) fue: 700 rpm y 0,71 L/min (0,36 vvm) y en estas condiciones correspondió una $r_A=2,28$ g/L/h y un $R_{GK}=89,63$ %. Para una mejor visualización, se representa la gráfica de contornos superpuestos en la Figura 2.12.

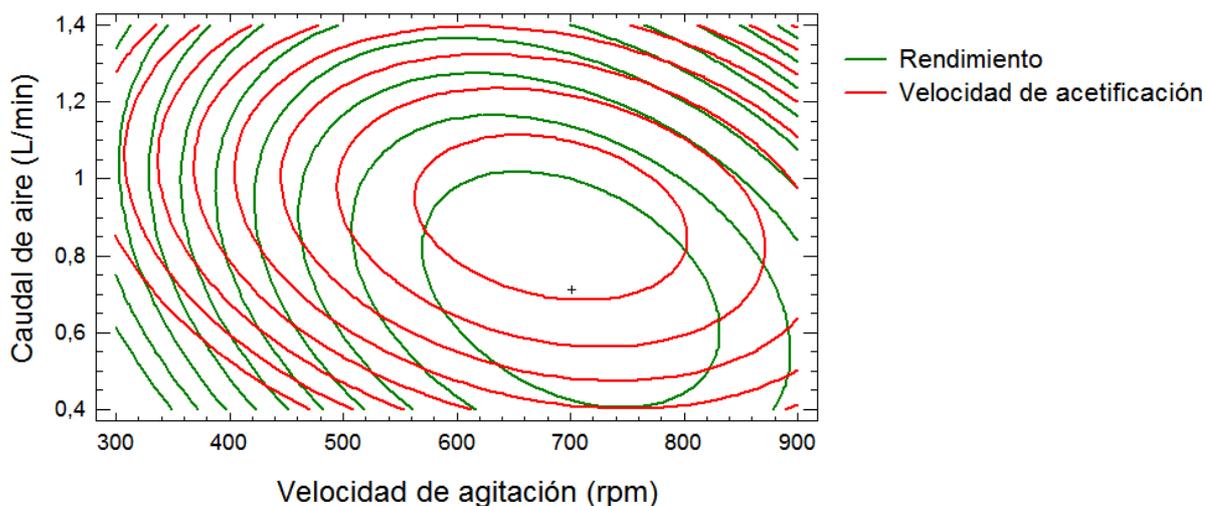


Figura 2.12. Región de la superficie de respuesta donde se maximizan ambas repuestas para vinagre de naranja (gráfico de contornos superpuestos).

2.3.4. Desarrollo del proceso de acetificación optimizado.

Se desarrollaron tres procesos oxidativos a 30 °C, de acuerdo a la combinación de factores de V_{ag} y Q_a que mejoraron ambas respuestas evaluadas en este proceso, es decir, a 700 rpm y 0,71 L/min de aire (0,36 vvm). Como en todos los ensayos realizados, las condiciones iniciales del sustrato fueron las indicadas en el apartado 2.2.3.2. La velocidad de acetificación global calculada fue de $2,29 \pm 0,17$ g/L/h y el rendimiento GK del vinagre de naranjas, $88,19 \pm 5,00$ %, ambos valores muy próximos a los predichos de acuerdo al modelo (2,28 g/L/h y 89,63 %, respectivamente).

Durante el transcurso de la biofermentación en esas condiciones, se observó una fase lag de aproximadamente 3-4 horas (Figura 2.13). La fase de crecimiento exponencial, representada por el logaritmo natural del recuento bacteriano ($\ln RC$), y el aumento en la acidez total, indicativo del incremento en la producción de ácido acético, ambos en función del tiempo, mantuvieron un comportamiento relativamente paralelo, típico de un metabolito asociado al crecimiento.

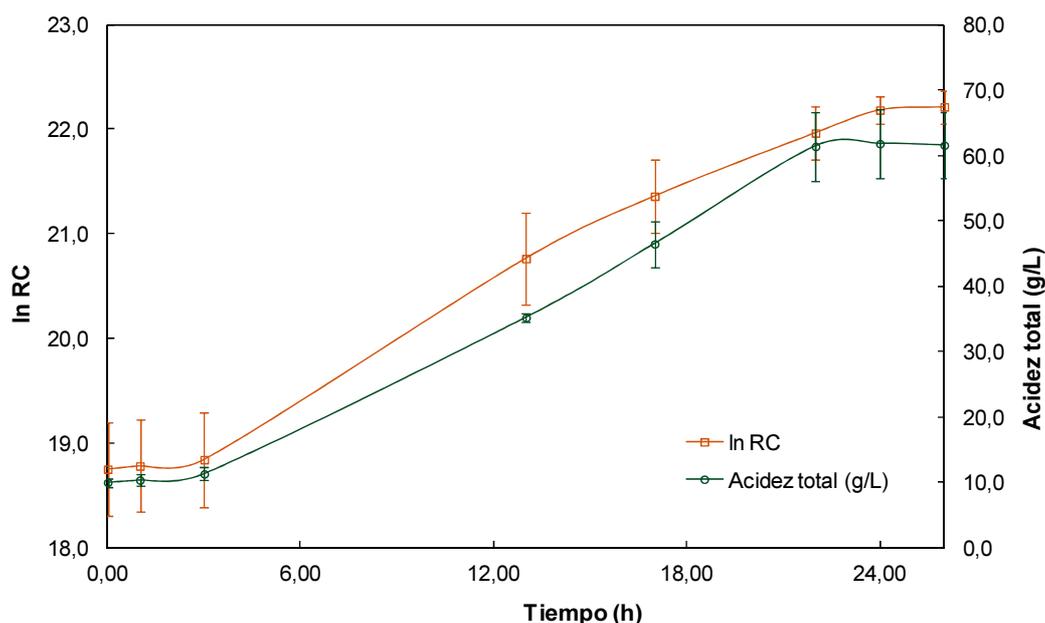


Figura 2.13. Acetificación de sustrato alcohólico de naranjas en sistema discontinuo según parámetros optimizados (700 rpm/0,36 vvm): media de acidez total (g/L ácido acético) y media de ln RC (ln de recuento bacteriano) en función del tiempo de proceso.

Los vinagres obtenidos en estos ensayos se envasaron en botellas de vidrio, se almacenaron en ambiente de laboratorio a temperaturas entre 20-25 °C y fueron utilizados luego, para su caracterización (Capítulo 4).

2.3.5. Determinación de parámetros cinéticos

2.3.5.1. Relación entre velocidad de crecimiento bacteriano y velocidad de acetificación.

Mediante la representación gráfica de los datos de peso seco de biomasa vs. densidad óptica a 540 nm (Figura 2.14) se determinó una ecuación (2.13) de tipo polinómico ($R^2=0,966$) para el cálculo de las concentraciones iniciales y finales de biomasa (X) en cada ensayo.

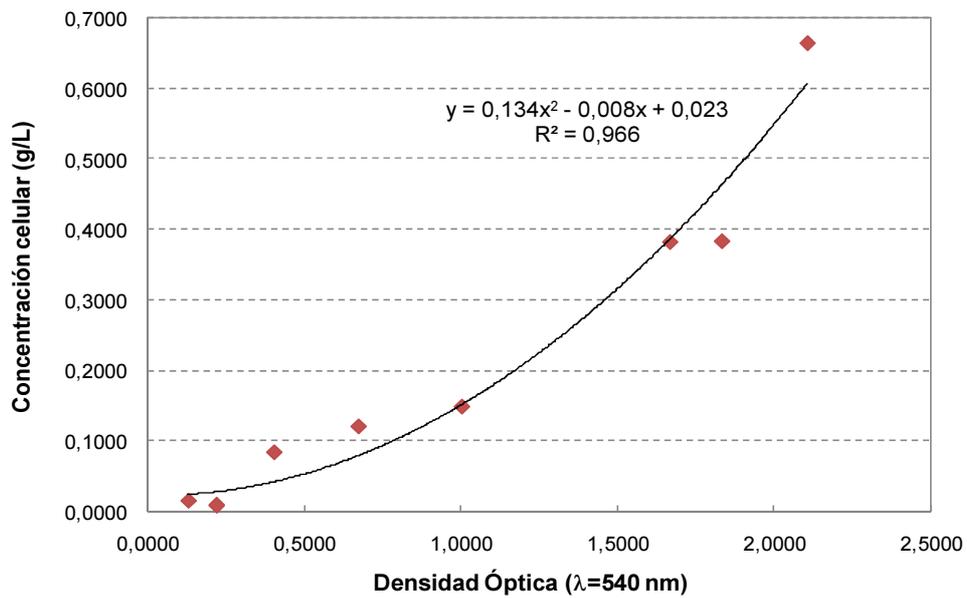


Figura 2.14. Concentración celular (X) vs. densidad óptica (DO) a $\lambda=540$ nm, durante la acetificación de un sustrato alcohólico de naranjas con *Acetobacter* sp.

$$X = 0,134 DO_{540}^2 - 0,008 DO_{540} + 0,023 \quad (2.13)$$

Con estos datos, a partir de la expresión (2.7), se determinó la velocidad de crecimiento celular, r_X (Tabla 2.6).

Tabla 2.6. Parámetros cinéticos de la acetificación de un sustrato alcohólico de naranjas, según diseño de MSR.

Vag [rpm]	Qa [L/min]	r_A [g/L/h]	r_X [g/L/h]	μ_M [h ⁻¹]
600	0,90 (0,45 vvm)	2,48	0,052	0,192
400	1,20 (0,60 vvm)	1,30	0,008	0,089
600	0,90 (0,45 vvm)	2,32	0,047	0,168
600	1,32 (0,66 vvm)	1,89	0,047	0,171
600	0,90 (0,45 vvm)	1,98	0,045	0,181
800	1,20 (0,60 vvm)	1,61	0,029	0,150
400	0,60 (0,30 vvm)	0,95	0,005	0,053
800	0,60 (0,30 vvm)	2,08	0,032	0,097
600	0,48 (0,24 vvm)	1,33	0,013	0,104
317	0,90 (0,45 vvm)	0,64	0,005	0,068
883	0,90 (0,45 vvm)	1,99	0,040	0,191
600	0,90 (0,45 vvm)	2,56	0,040	0,171

Vag: velocidad de agitación; Qa: caudal de aire; r_A: velocidad de acetificación; r_X: velocidad de crecimiento microbiano; μ_M: velocidad específica máxima de crecimiento bacteriano.

El análisis de regresión simple entre la velocidad de crecimiento microbiano (r_X) y la velocidad de acetificación (r_A) indicó que existe una elevada correlación lineal entre ambas variables (r=0,91). El p-valor del ANOVA fue de 0,0001, por lo que hubo una relación estadísticamente significativa entre r_A y r_X con un nivel de confianza del 95,0% y el estadístico R² indicó que el modelo así ajustado explica el 81,97% de la variabilidad en r_A. En la figura 2.15 se muestra el gráfico del modelo ajustado.

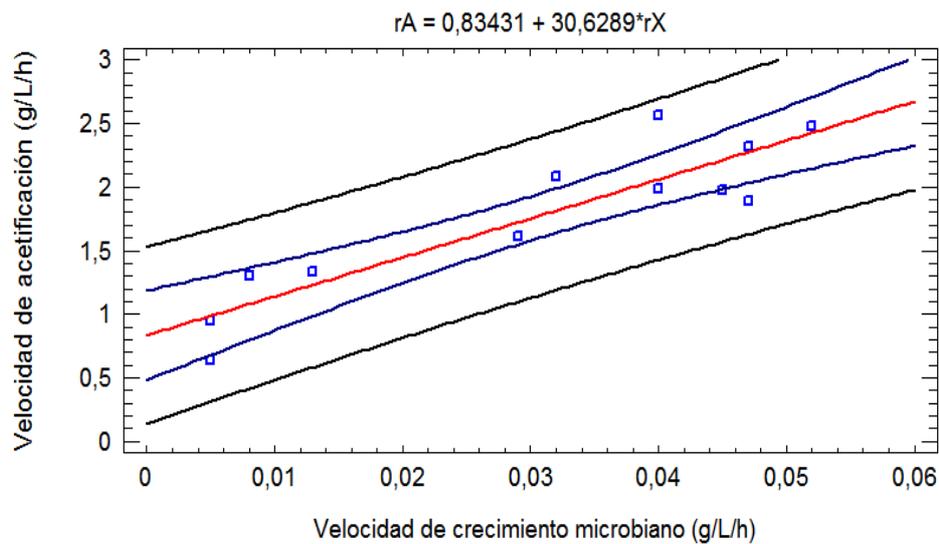


Figura 2.15. Velocidad de crecimiento microbiano (r_X) vs. velocidad de acetificación (r_A) para acetificación de un sustrato alcohólico de naranjas.

La ecuación del modelo ajustado (2.14) resultó:

$$r_A = 0,83431 + 30,6289 \times r_X \quad (2.14)$$

De esta manera se puede afirmar que un aumento en la velocidad de crecimiento bacteriano provocó un incremento de la velocidad de acetificación, resultados que coinciden con lo informado por Garrido-Vidal et al. (2003).

2.3.5.2. Velocidad específica máxima de crecimiento bacteriano (μ_M)

Los resultados de μ_M se presentaron en la Tabla 2.6. Allí puede notarse que los menores valores se obtuvieron a las velocidades de agitación más bajas (317 y 400 rpm).

En una experiencia realizada por Levonen-Muñoz & Cabezudo (1981) en un sistema batch también se calcularon las μ_M siguiendo la ecuación 2.10. El estudio se realizó con una *Acetobacter aceti* inoculada en un medio de

cultivo sintético, y se determinaron las μ_M en diferentes condiciones en las que, manteniendo constante la temperatura en 30 °C y el caudal de aire en 0,75 vvm, se varió la velocidad de agitación entre 400 y 550 rpm. Para la menor V_{ag} , obtuvieron una μ_M de 0,048 h⁻¹, mientras que a 550 rpm, la μ_M resultó ser 0,172 h⁻¹.

A pesar de las diferencias en la composición de los medios de cultivo y de la especie de *Acetobacter* (desconocida en la presente investigación), los valores de μ_M hallados durante los ensayos con vinagre de naranja resultaron relativamente similares a los anteriores, comparando condiciones de agitación y aireación semejantes ($\mu_M=0,053$ h⁻¹ para 400 rpm/0,3 vvm; $\mu_M=0,089$ h⁻¹ para 400 rpm/0,6 vvm; μ_M entre 0,168-0,192 h⁻¹ para 600 rpm/0,45 vvm).

En otro trabajo en el que se evaluó la velocidad específica máxima de crecimiento bacteriano en función de la temperatura de fermentación, se informó una $\mu_M=0,0944\pm 0,04$ h⁻¹ a 30 °C, en las siguientes condiciones de proceso: fermentador de columna de burbujas, escala laboratorio, caudal de aire de 0,2 vvm, con *Acetobacter aceti* inoculada sobre un vino de Jerez (de Ory et al., 1998). Estos investigadores emplearon ecuaciones que incluían simultáneamente varios factores que afectan la μ además del efecto de la temperatura. A pesar de que en el presente trabajo no se utilizaron esas ecuaciones, tal como se explicó en la metodología de este capítulo, la μ_M obtenida para vinagre de naranja en similares condiciones (0,24 vvm), fue de 0,104 h⁻¹.

2.4. Conclusiones

El análisis del diseño factorial indicó que ambos factores analizados, V_{ag} y Q_a , así como su interacción presentaron influencia estadísticamente significativa en la velocidad de acetificación r_A . Una mayor velocidad de agitación produjo un incremento en el área interfacial debido al mayor número de burbujas pequeñas. Como consecuencia, el k_La pudo haber aumentado y con ello, la velocidad de transferencia de oxígeno al cultivo. Este aumento, a su

vez, permitió el incremento de los recuentos celulares en el tiempo y, por ende de r_A , lo cual quedó evidenciado por la reducción en los tiempos de proceso.

En relación al rendimiento GK, el análisis de varianza del diseño factorial indicó que la velocidad de agitación ejerció un efecto estadísticamente significativo sobre esta variable respuesta. Probablemente, la extensa duración de los procesos biooxidativos realizados a 200 rpm, haya influido en la pérdida de componentes volátiles con la consiguiente disminución del rendimiento respecto de los tratamientos efectuados a 400 rpm.

A partir del análisis del diseño experimental utilizando MSR, se comprobó nuevamente la importante influencia de V_{ag} para las dos respuestas en cuestión. De especial importancia resultó el efecto de inhibición del oxígeno a elevadas concentraciones, situación que debería tenerse en cuenta a la hora del diseño de un sistema de fermentación, ya que la aireación es uno de los mayores consumidores de energía del proceso.

El diseño estadístico indicó que los valores máximos de velocidad de acetificación y rendimiento GK (2,28 g/L/h y 89,63 %, respectivamente) se podrían obtener cuando $V_{ag}=701$ rpm y $Q_a=0,36$ vvm. El proceso de acetificación desarrollado según esos parámetros, presentó valores muy similares a los predichos: $r_A=2,29\pm 0,17$ g/L/h y $R_{GK}=88,19\pm 5,00$ %.

Se determinó una elevada correlación lineal entre r_A y r_X , por lo que se puede afirmar que un aumento en la velocidad de crecimiento bacteriano induce un incremento de la velocidad de acetificación.

Los valores de velocidad específica máxima de crecimiento μ_M , hallados en los vinagres de naranja resultaron relativamente similares a los reportados en la bibliografía para vinagres de otras procedencias, teniendo en cuenta condiciones de agitación y aireación semejantes a las empleadas en esta investigación.

2.5. Bibliografía

- Aleixandre Benavent, J. L., & García Esparza, M. J. (1996). *Prácticas de procesos de elaboración y conservación de alimentos*. Valencia: Servicio de Publicaciones, Universidad Politécnica de Valencia.
- Box, G. E., Hunter, J. S., & Hunter, W. G. (2008). *Estadística para Investigadores. Diseño, innovación y descubrimiento*. (2° ed.). Barcelona, España: Editorial Reverté S.A.
- Cabiscol, E., Tamarit, J., & Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*, 3, 3–8.
- de Ory, I., Romero, L. E., & Cantero, D. (1998). Modelling the kinetics of growth of *Acetobacter aceti* in discontinuous culture: influence of the temperature of operation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, 189–193.
- de Ory, I., Romero, L. E., & Cantero, D. (2002). Optimum starting-up protocol of a pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering*, 52(1), 31–37.
- de Ory, I., Romero, L. E., & Cantero, D. (2004). Operation in semi-continuous with a closed pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering*, 63(1), 39–45.
- Doran, P. M. (1998). *Principios de ingeniería de los bioprocesos*. Huesca, España: Editorial Acribia S.A.
- Ertola, R., Yantorno, O., & Mignone, C. (1994). *Microbiología Industrial. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos*. Washington D.C.: Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos.
- Ferreira, J. M., Swarnakar, R., & Silva, F. L. H. (2005). Effect of nutrient sources on bench scale vinegar production using response surface methodology 1, 73–77.

CAPITULO 2. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema discontinuo.

- Ferreira, M. M. (2006). *Estudio del proceso biotecnológico para la elaboración de una bebida alcohólica a partir de jugo de naranjas*. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Fregapane, G., Nieto, J., & Salvador, M. D. (1999). Wine vinegar production using a noncommercial 100-Litre bubble column dynamic sparger. *Biotechnology and Bioengineering*, 1–6.
- García-García, I., Santos-Dueñas, I. M., Jiménez-Ot, C., Jiménez-Hornero, J. E., & Bonilla-Venceslada, J. L. (2009). Vinegar Engineering. En: L. Solieri & P. Giudici (Eds.), *Vinegars of the world* (pp. 97–120). Milan: Springer-Verlag Italia S.r.l.
- Garrido-Vidal, D., Pizarro, C., & González-Sáiz, J. M. (2003). Study of process variables in industrial acetic fermentation by a continuous pilot fermentor and response surfaces. *Biotechnology Progress*, 19(5), 1468–1479.
- Guillamón, J. M., & Mas, A. (2011). Acetic Acid Bacteria. En: A. V. Carrascosa, R. Muñoz, & R. Gonzalez (Eds.), *Molecular Wine Microbiology* (1° ed., pp. 227–255). Academic Press, Elsevier.
- Gutiérrez Pulido, H., & Vara Salazar, H. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. (2a ed.). México: McGraw Hill.
- Horiuchi, J., Tada, K., Kobayashi, M., Kanno, T., & Ebie, K. (2004). Biological approach for effective utilization of worthless onions-vinegar production and composting. *Resources, Conservation and Recycling*, 40(2), 97–109.
- International Organisation of Vine and Wine. Compendium of international methods of wine and must analysis, O.I.V. (International organisation of vine and wine) (2009). Francia.
- Joyeux, A., Lafon-Lafourcade, S., & Ribereau-Gayon, P. (1984). Evolution of acetic acid bacteria during fermentation and storage of wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 48(1), 153–156.
- Krusong, W., Yaiyen, S., & Pornpukdeewatana, S. (2014). Impact of high initial concentrations of acetic acid and ethanol on acetification rate in an

CAPITULO 2. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema discontinuo.

internal Venturi injector bioreactor. *Journal of Applied Microbiology*, 118(3), 629–640.

Leonel, M., Suman, P. A., & García, E. L. (2015). Production of ginger vinegar. *Ciência E Agrotecnologia*, 39(2), 183–190.

Levonen-Muñoz, E., & Cabezudo, M. (1981). Influence of oxygen transfer rate on vinegar production by *Acetobacter aceti* in submerged fermentation. *Biotechnol Letters*, 3(1), 27–32.

Lisdiyanti, P., Katsura, K., Potacharoen, W., Navarro, R. R., Yamada, Y., Uchimura, T., & Komagata, K. (2003). Diversity of acetic acid bacteria in Indonesia, Thailand, and the Philippines. *Microbiology and Culture Collections*, 19(2), 91–99.

Nanba, A., Tamura, A., & Nagai, S. (1984). Synergistic effects of acetic acid and ethanol on the growth of *Acetobacter* sp. *Journal of Fermentation Technology*, 62, 501–505.

Nieto, F. J. (1991). Algunos aspectos de la tecnología de la fermentación acética. En: C. Llaguno Marchena & M. C. Polo (Eds.), *El Vinagre de Vino* (pp. 69–103). Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Ormaechea Landa, A. R. (1991). Proceso industrial de elaboración de vinagre. In C. Llaguno Marchena & M. C. Polo (Eds.), *El Vinagre de Vino* (pp. 49–68). Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Ough, C. S. (1996). *Tratado Básico de Enología*. Editorial Acribia S.A.

Park, Y. S., Ohtake, H., Fukaya, M., Okumura, H., Toda, Kawamura, Y., & Kiyoshi. (1989). Effects of dissolved oxygen and acetic acid concentrations on acetic acid production in continuous culture of *Acetobacter aceti*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 68(2), 96–101.

Raspor, P., & Goranovic, D. (2008). Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(2), 101–124.

CAPITULO 2. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema discontinuo.

- Romero, L. E., Gomez, J. M., Caro, I., & Cantero, D. (1994). A kinetic model for growth of *Acetobacter aceti* in submerged culture. *Chemical Engineering Journal*, 54(1).
- Rubio-Fernández, H., Salvador, M. D., & Fregapane, G. (2004). Influence of fermentation oxygen partial pressure on semicontinuous acetification for wine vinegar production. *European Food Research and Technology*, 219(4), 393–397.
- Schlepütz, T., Gerhards, J. P., & Büchs, J. (2013). Ensuring constant oxygen supply during inoculation is essential to obtain reproducible results with obligatory aerobic acetic acid bacteria in vinegar production. *Process Biochemistry*, 48(3), 398–405.
- Silva, M. E., Torres Neto, A. B., Silva, W. B., Silva, F. L. H., & Swarnakar, R. (2007). Cashew wine vinegar production: alcoholic and acetic fermentation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 24(02), 163–169.
- Tesfaye, W., García-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2000). Set up and optimization of a laboratory scale fermentor for the production of wine vinegar. *Journal of the Institute of Brewing*, 106(4), 215–219.
- Valero, E., Berlanga, T. M., Roldán, P. M., Jiménez, C., García, I., & Mauricio, J. C. (2005). Free amino acids and volatile compounds in vinegars obtained from different types of substrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(4), 603–608.
- Yamada, Y., Hosono, R., Lisdyanti, P., Widyastuti, Y., Saono, S., Uchimura, T., & Komagata, K. (1999). Identification of acetic acid bacteria isolated from Indonesian sources, especially of isolates classified in the genus *Gluconobacter*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 45(1), 23–28.

Capítulo 3:

Acetificación de
sustrato alcohólico
de naranja en
sistema
semicontinuo.

3.1. Introducción

En la actualidad, la elaboración de vinagres a nivel industrial se realiza principalmente en cultivo sumergido semicontinuo tal como se señaló en el apartado I.3.2. de la Introducción general. En este sistema, una fracción de producto final se descarga periódicamente y el volumen remanente de vinagre se utiliza como cultivo iniciador del siguiente ciclo oxidativo. Luego, es completado con vino fresco hasta obtener el volumen de trabajo inicial (Arnold et al. 2002; Tesfaye et al. 2002; de Ory et al. 2004; García-García et al. 2007). Así, este sistema podría definirse como de “sucesivos ciclos discontinuos de acetificación” (Kocher, Dhillon, & Joshi, 2014).

El sustrato alcohólico utilizado para reponer, es agregado lentamente, en pequeñas porciones hasta obtener el volumen final de trabajo. Este procedimiento resulta en cambios temporales en las propiedades del medio de cultivo donde crecen las bacterias del ácido acético. Dependiendo del tiempo en el que el reactor es descargado, del volumen descargado y de la forma en la que es recargado, entre otros factores, el medio de cultivo puede experimentar cambios más o menos abruptos que pueden alterar la concentración y la actividad de la población bacteriana que contiene (Wendu Tesfaye, Morales, García-Parrilla, & Troncoso, 2003; García-García et al., 2007) . Esto es un factor esencial a tener en cuenta ya que mayores proporciones descargadas requieren ciclos más largos debido a que la proporción no descargada está relacionada con la densidad celular remanente en el fermentador (Wendu Tesfaye et al., 2003). El porcentaje de carga/descarga o proporción de carga (C/D) es variable en cada proceso pero lo más común es la remoción del 40 % (Ormaechea Landa, 1991; Fregapane, Nieto, & Salvador, 1999; W. Krusong, Yaiyen, & Pornpukdeewatana, 2014; Warawut Krusong, Pornpukdeewatana, Kerdpiboon, & Tantratian, 2014) al 50 % del volumen total (Wendu Tesfaye, García-Parrilla, & Troncoso, 2000; de Ory et al., 2004; García-García et al., 2007).

CAPITULO 3. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema semicontinuo.

En este capítulo se estudió la elaboración de vinagre de naranja en sistema semicontinuo y se evaluó el efecto de la proporción de carga sobre la velocidad de acetificación y rendimiento GK.

3.2. Materiales y Métodos

3.2.1. Preparación del cultivo iniciador de *Acetobacter* sp.

El medio empleado para la preparación del inóculo fue vino de naranja diluido al 6% v/v de alcohol con una solución de minerales y fuente nitrogenada de la siguiente composición: 0,8 g/L de KH_2PO_4 ; 0,35 g/L de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$; 1,5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. De esta forma se pretendió comenzar la adaptación del cultivo al medio alcohólico en la etapa previa a su ingreso al biorreactor. Una vez inoculado al 10 % con la cepa de *Acetobacter* sp., se incubó a 30 °C con inyección de aire hasta lograr una concentración celular entre 3 y 5×10^8 bacterias/mL.

El control de esta etapa se realizó tomando una muestra del sustrato luego de la inoculación y otra al finalizar el período de incubación y se determinaron los siguientes parámetros fisicoquímicos: pH, acidez total, densidad óptica (DO), recuento celular (RC), cuyas técnicas fueron descriptas en el apartado 2.2.5 del Capítulo 2.

3.2.2. Acondicionamiento del sustrato alcohólico para la fermentación acética.

La preparación del sustrato alcohólico para su posterior acetificación se realizó análogamente a la descripta en el apartado 2.2.2.3.1 del capítulo 2, para el sistema discontinuo.

Adicionalmente se preparó la solución de nutrientes en volumen necesario según el porcentaje de recarga correspondiente y luego se esterilizó a 121 °C durante 15 min en autoclave tipo Chamberland VZ (Argentina). Una

CAPITULO 3. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema semicontinuo.

vez que la solución recuperó la temperatura ambiente, se incorporó el volumen de vino de naranja necesario para obtener un vino de naranjas con una graduación alcohólica del 6 % v/v.

3.2.3. Equipo de acetificación

El proceso de acetificación del vino de naranja en sistema semicontinuo se realizó en biorreactor marca New Brünswick Cientific Co., Modelo Bioflo 2000 (New Jersey, USA), descrito en el apartado 2.2.2.3 del capítulo 2.

Puesto que el equipo no cuenta con el accesorio necesario para realizar la recarga de sustrato alcohólico durante el proceso, se adaptó un dosificador que se conecta al mismo mediante una manguera de silicona, ambos estériles. El flujo de alimentación se regula mediante una válvula de goteo o dosificador de flujo regulable (Figura 3.1.).



Figura 3.1. Equipo de acetificación en sistema semicontinuo.

3.2.4. Desarrollo del proceso de acetificación en sistema semicontinuo.

Según se pudo establecer en los ensayos de acetificación en sistema batch (Capítulo 2), las mejores condiciones para la obtención de un vinagre de naranja se lograron a velocidades de agitación de 700 rpm y 0,71 L/min de aire (0,36 vvm), por lo que estos parámetros constituyeron las variables operativas del proceso semicontinuo.

Debido a la escasa capacidad útil (2 L) del biorreactor disponible en el laboratorio y con la finalidad de obtener mayor volumen de vinagre en el menor tiempo se decidió efectuar los ensayos en sistema semicontinuo comparando dos niveles de proporción de carga (C/D): 40 % (800 mL) y 60 % (1200 mL). Las respuestas analizadas en cada caso fueron la velocidad de acetificación (r_A) y el rendimiento GK (R_{GK}), según fueron definidos en el apartado 2.2.3.1 del Capítulo 2.

El ensayo consistió en el desarrollo de dos ciclos de acetificación. El primero de ellos se dio por finalizado cuando la acidez total alcanzó valores entre 40-50 g/L. Este intervalo se fijó teniendo en cuenta la investigación de Nanba et al. (1984) quienes demostraron que, durante la obtención de vinagres mediante fermentación con *Acetobacter* sp., el crecimiento bacteriano se vio totalmente inhibido entre esos valores de acidez y para un amplio rango de concentraciones de etanol (5-75 g/L ó 0,76-9,45 % v/v).

En esta instancia se realizó la descarga, lo más rápidamente posible, de 800 mL ó 1200 mL de vinagre según el nivel de C/D evaluado en cada caso. Una vez concluida, se inició el agregado de sustrato fresco (vino diluido 6 % v/v de etanol, 10 g/L ácido acético y nutrientes) en igual volumen que vinagre retirado previamente (Figura 3.2). Esta nueva adición se realizó en forma lenta y progresiva para evitar repentinas modificaciones de las condiciones ambientales para la biomasa, como la concentración de etanol y ácido acético, nutrientes, temperatura, pH. De lo contrario, podría aparecer una nueva fase lag y por consiguiente un período no productivo (Bu'Lock & Kristiansen, 1991;

CAPITULO 3. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema semicontinuo.

de Ory et al., 2004). Teniendo en cuenta las observaciones realizadas por Tesfaye et al. (2000; 2003) durante la acetificación de 3400 mL de un vino blanco en escala laboratorio, la carga del sustrato se realizó a razón de 14 mL/min ya que este autor comprobó que a esta velocidad se mejoraba la r_A .

Concluida la recarga, se tomó una muestra del fermentador para establecer las condiciones iniciales del segundo ciclo oxidativo. Para ello se analizaron pH, acidez total, densidad óptica, recuento celular y concentración de etanol (apartado 2.2.5. de Técnicas analíticas). Este nuevo ciclo se continuó hasta que se observó el inicio de una fase estacionaria en la producción de ácido, alrededor de 60 g/L de ácido acético.

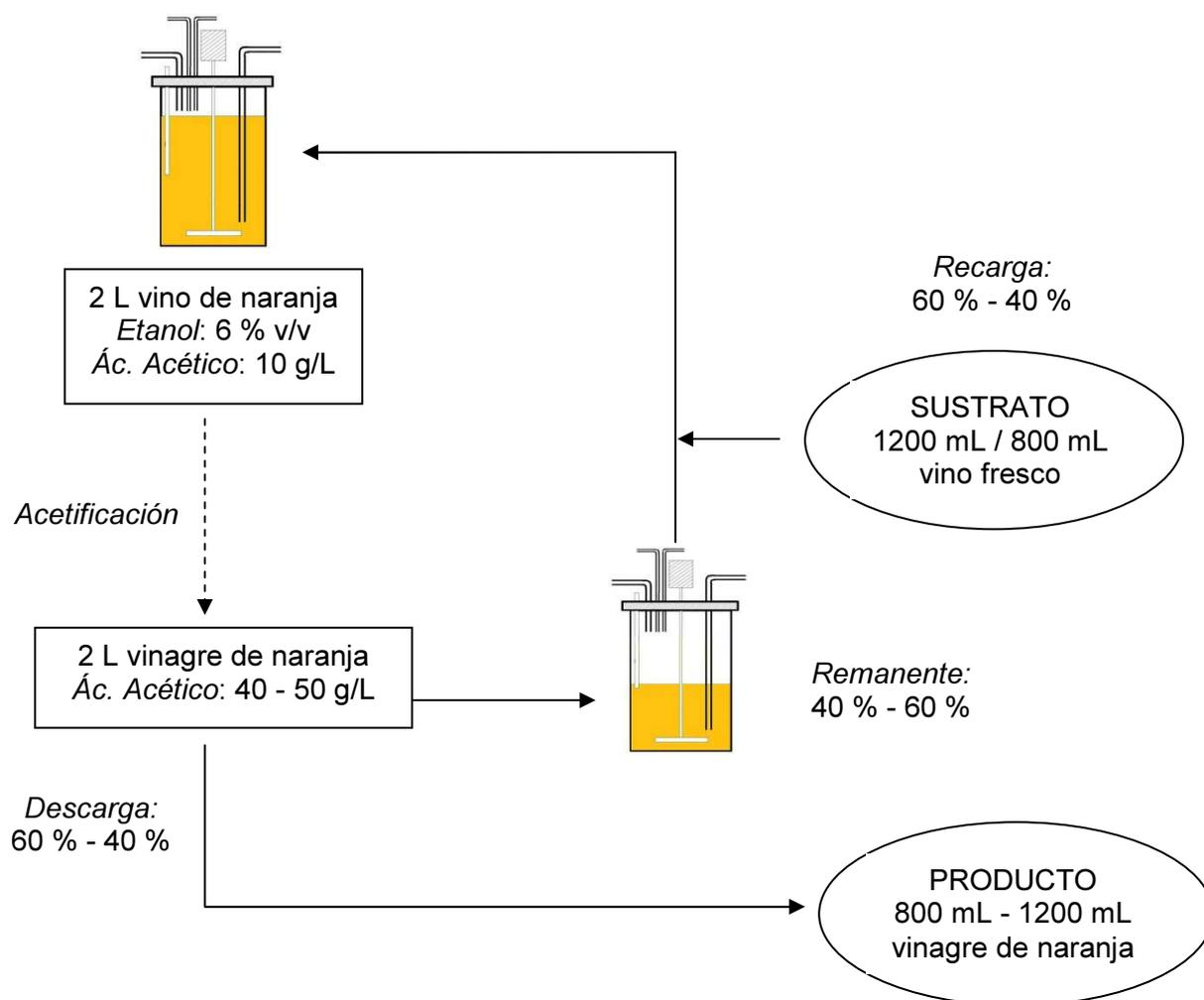


Figura 3.2. Esquema de elaboración de vinagre de naranja en sistema semicontinuo.

CAPITULO 3. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema semicontinuo.

Las condiciones iniciales del sustrato, en todos los tratamientos, fueron: pH: $3,03 \pm 0,15$, volumen del sustrato: 2 L, concentración de alcohol: $6,0 \pm 0,4$ % v/v y concentración de ácido acético: $9,99 \pm 0,91$ g/L.

El monitoreo del proceso se realizó a través de muestras tomadas del fermentador cada 4-6 horas, mediante determinaciones de pH, acidez total, densidad óptica y recuento celular. La concentración de etanol se determinó al inicio y al final de cada ciclo. Con los valores de DO y acidez total en los distintos tiempos se graficó crecimiento microbiano y evolución de la acetificación.

3.2.5. Tratamiento estadístico

Cada nivel del factor C/D se ensayó por duplicado y el análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante análisis de varianza, mediante el programa estadístico Statgraphics Centurion XV Corporate. Se consideró que hubo diferencias estadísticas significativas si el p-valor del ANOVA fue menor que 0,05. En este caso, la comparación de las medias de los ensayos se realizó mediante contraste múltiple de rangos utilizando el test de Fisher (LSD) para un nivel de confianza del 95 %.

3.3. Resultados y Discusión

Una primera observación de las curvas de crecimiento de *Acetobacter* sp. y de producción de ácido acético (Figuras 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6) durante el primer ciclo del ensayo, evidencian el comportamiento característico de un cultivo en sistema batch.

Las BAA presentaron una fase de latencia de 3-6 horas. Esta fase representa un periodo de transición para las bacterias cuando son transferidos a una nueva condición. Es el período en el que las bacterias individuales están madurando y no tienen aún la posibilidad de dividirse. Durante la fase de

CAPITULO 3. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema semicontinuo.

adaptación, se produce la síntesis de ARN, enzimas y otras moléculas, para lo cual consumen energía. La duración de esta fase depende de varios factores, entre ellos la concentración inicial de etanol y ácido acético y la historia previa del cultivo (de Ory et al., 2004; Ndoye, Lebecque, Destain, Guiro, & Thonart, 2007).

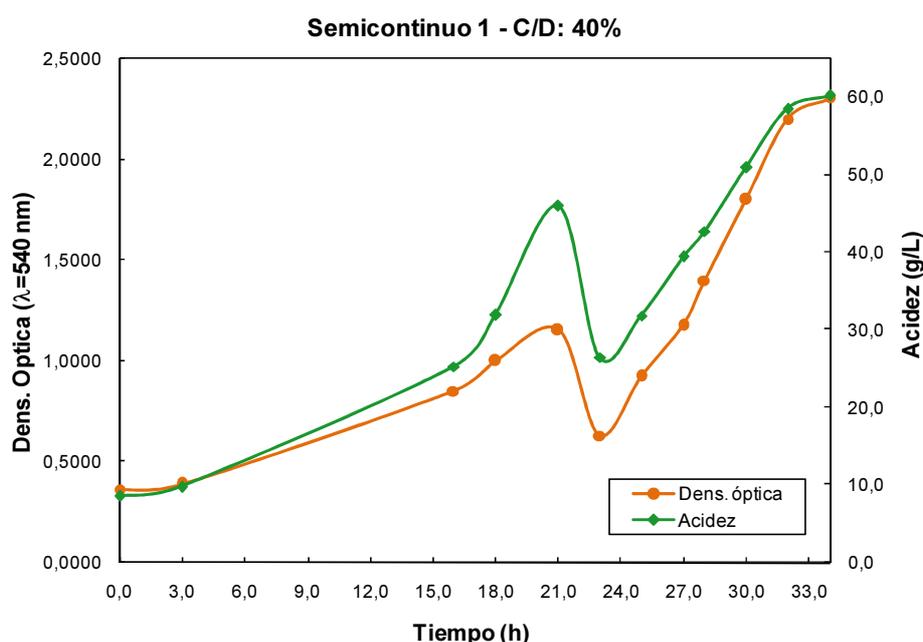


Figura 3.3. Evolución del crecimiento microbiano y la acidez total para la acetificación de vino de naranja en proceso semicontinuo con 40 % de carga/descarga (C/D).

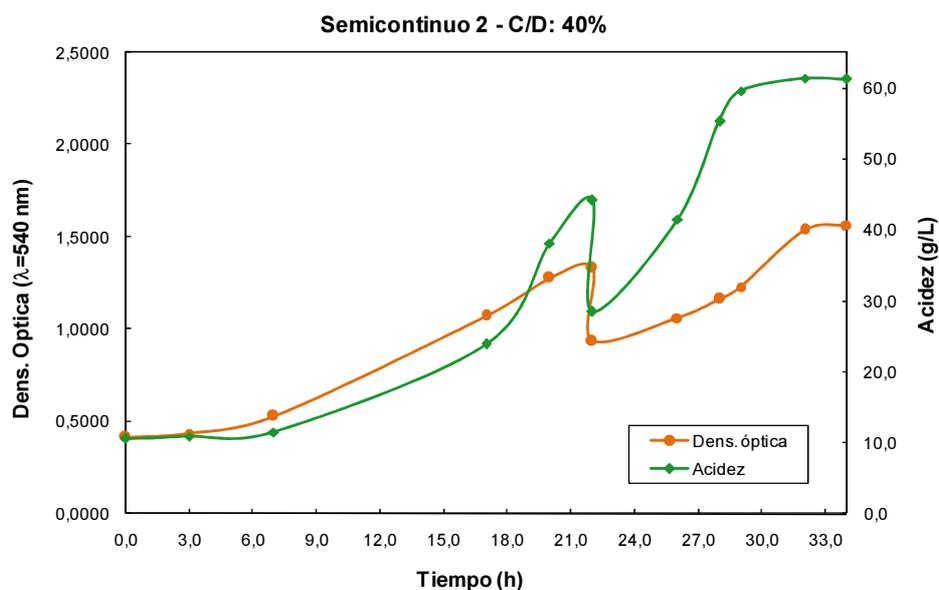


Figura 3.4. Evolución del crecimiento microbiano y la acidez total para la acetificación de vino de naranja en proceso semicontinuo con 40 % de carga/descarga (C/D), (réplica).

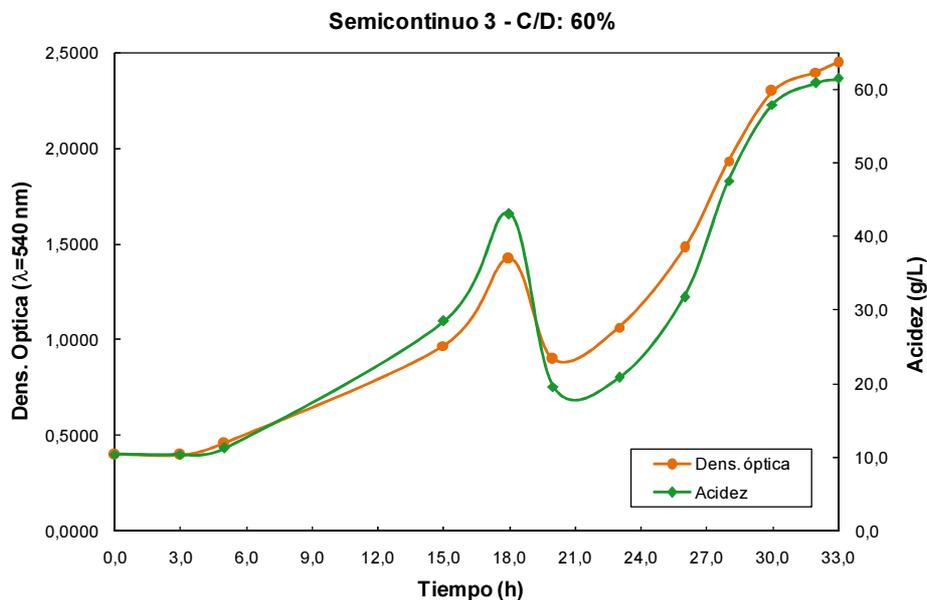


Figura 3.5. Evolución del crecimiento microbiano y la acidez total para la acetificación de vino de naranja en proceso semicontinuo con 60 % de carga/descarga (C/D).

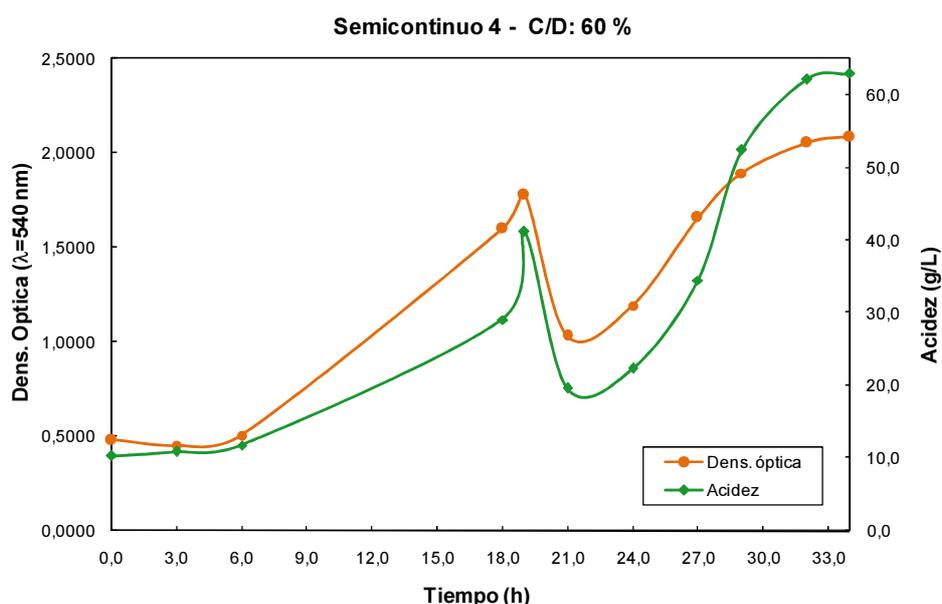


Figura 3.6. Evolución del crecimiento microbiano y la acidez total para la acetificación de vino de naranja en proceso semicontinuo con 60 % de carga/descarga (C/D), (réplica).

Una vez superada la fase lag, puede observarse el inicio de la fase de crecimiento exponencial y, en forma prácticamente paralela, el aumento en la producción de ácido acético, indicativo de que este metabolito está asociado al crecimiento (Levonen-Muñoz & Cabezudo, 1981; Bar, Gainer, & Kirwan, 1987; Hill & Daugulis, 1999; Garrido-Vidal, Pizarro, & González-Sáiz, 2003) o sea, que se produce durante la trofofase.

Hasta el momento en que se alcanzó la concentración establecida para la descarga de vinagre (40-50 g/L de ácido acético), la duración del primer ciclo fue de 18-22 horas y la r_A alcanzada fue de $1,6 \pm 0,2$ g/L/h para C/D = 40 % y $1,7 \pm 0,2$ g/L/h para C/D = 60 % (Tabla 3.1). Es razonable que estos valores no hayan presentado diferencias estadísticas significativas ya que no existía variación alguna en ambos procesos durante este primer ciclo. De la misma manera, los R_{GK} tampoco presentaron diferencias estadísticas significativas ($90,8 \pm 2,6$ % y $89,3 \pm 6,2$ % para C/D = 40 % y 60 %, respectivamente).

CAPITULO 3. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema semicontinuo.

Tabla 3.1. Velocidad de acetificación y rendimiento GK en cada ciclo de acetificación de un sustrato alcohólico de naranja, en sistema semicontinuo con diferentes proporciones de carga/descarga (C/D).

	<i>Proporción de carga (C/D)</i>	
	40 %	60 %
r_{A1} [g/L/h]	1,6±0,2 ^a	1,7±0,2 ^a
r_{A2} [g/L/h]	4,0±0,8 ^b	3,7±0,4 ^b
$R_{GK,1}$ [%]	90,8±2,6 ^a	89,3±6,2 ^a
$R_{GK,2}$ [%]	92,5±0,7 ^a	89,6±5,2 ^a

r_{A1} : velocidad de acetificación en 1° ciclo; r_{A2} : velocidad de acetificación en 2° ciclo; $R_{GK,1}$: rendimiento GK en 1° ciclo; $R_{GK,2}$: rendimiento GK en 2° ciclo. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los distintos niveles de C/D ($p < 0,05$). Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias de cada ciclo.

Durante el segundo ciclo, caracterizado por una elevada población de BAA en fase de crecimiento exponencial, el período de adaptación a las nuevas condiciones ambientales fue menor que para la primera fase. En efecto, no se logró apreciar una fase lag bien definida (Figuras 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6) posiblemente debido a la adaptación gradual de las BAA a las elevadas concentraciones de ácido acético alcanzadas durante el primer ciclo (de Ory et al., 2004; W. Krusong et al., 2014; Warawut Krusong et al., 2014). Otro factor que podría haber influido fue la elevada concentración celular existente aún luego de la dilución con sustrato alcohólico (1×10^9 - 5×10^9 bacterias/mL).

En trabajos a escala piloto desarrollados por Ndoye et al. (2007) en los que se utilizó un medio de cultivo con nutrientes esenciales para las BAA como sustrato alcohólico, observaron que luego de las sucesivas recargas, éstas crecían sin observarse una fase lag. No obstante, algunos investigadores (de Ory, Romero, & Cantero, 2002; de Ory et al., 2004) informaron sobre la

CAPITULO 3. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema semicontinuo.

existencia de una fase de retardo luego de las recargas realizadas durante la acetificación en semicontinuo con vino de Jerez, aunque la concentración celular del orden de 5×10^8 bacterias/mL, fue bastante inferior a la de la presente investigación. Evidentemente, también se debe considerar el origen del sustrato a acetificar.

Los resultados de r_A durante el segundo ciclo (Tabla 3.1) indicaron que ésta fue 2,5 veces superior a las del primer ciclo para una C/D del 40 % y 2,2 veces superior para una C/D del 60 %. Ésta es una tendencia generalizada en la fermentación semicontinua, en la cual es necesario el desarrollo de, por lo menos, dos ciclos para obtener mayores velocidades de acetificación (de Ory et al., 2004; Wendu Tesfaye et al., 2003). Este comportamiento puede explicarse en términos de la adaptación celular del cultivo a las condiciones ambientales reinantes en el medio: en cultivos mixtos sobreviven las cepas mejor adaptadas predominando las rutas metabólicas para la síntesis de nuevas enzimas y, en cultivos puros, aumentan su habilidad para la fermentación y, por lo tanto, la velocidad de acetificación (de Ory et al., 2004; Ndoye et al., 2007).

A los fines de facilitar el análisis, se presentan las curvas de evolución de acidez total en todos los tratamientos versus tiempo, en un mismo gráfico (Figura 3.7). Allí se puede apreciar claramente las diferencias en la duración de cada ciclo: mientras el primero se desarrolló en 18-22 horas, el segundo se concretó en 10-13 horas.

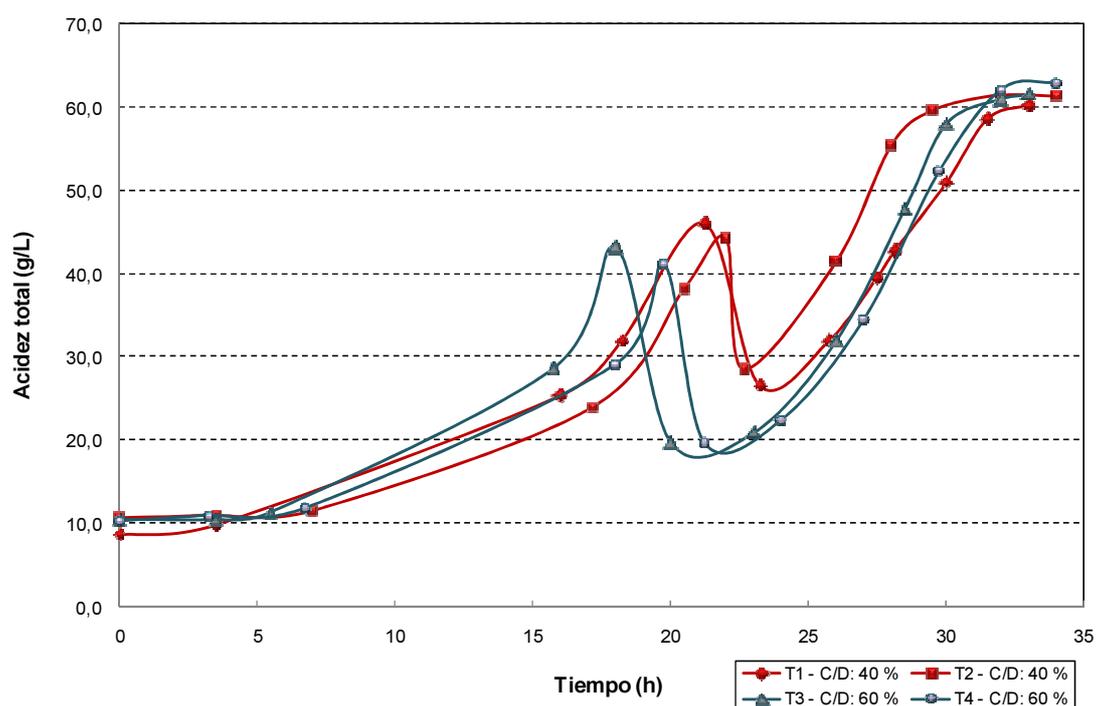


Figura 3.7. Evolución de la acidez total durante la acetificación de un sustrato alcohólico de naranja en proceso semicontinuo. T1: tratamiento con 40 % de carga/descarga (C/D); T2: réplica de tratamiento con C/D: 40 %; T3: tratamiento con C/D: 60 %; T4: réplica de tratamiento con C/D: 60 %.

El importante incremento de r_A durante el segundo ciclo respalda el hecho de que las cepas de *Acetobacter* adaptadas al nuevo ambiente pudieron contrarrestar el efecto inhibitorio producido por valores de acidez mayores a 40 g/L, según había sido informado por varios investigadores (Nanba et al., 1984; de Ory et al., 2004). En el presente trabajo de tesis se observó una producción exponencial de acidez total hasta valores de $61,48 \pm 1,11$ g/L en coincidencia con el comienzo de la fase estacionaria de crecimiento ocurrida a las 30-32 horas de iniciado el proceso, cuando no se registraron aumentos sucesivos en la densidad celular. Este comportamiento probablemente fue consecuencia del agotamiento del sustrato alcohólico ya que la concentración final en todos los casos fue de $0,152 \pm 0,055$ % v/v. De todas maneras el crecimiento exponencial ocurrido aún a las concentraciones de acidez mencionadas, indicaron una

CAPITULO 3. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema semicontinuo.

elevada resistencia a este compuesto, aunque serán necesarios mayores estudios para establecer los límites de tolerancia. Warawut Krusong et al. (2014) informaron resultados similares durante la acetificación de vino de maíz con *Acetobacter aceti* WK que pudo tolerar elevadas concentraciones de ácido, mayores a 65 g/L.

En una experiencia realizada por Kruppa & Vortmeyer (1999) durante un proceso semicontinuo de cuatro ciclos observaron que si el sustrato contenía un nutriente limitante, una vez que éste se agotaba y por ende se detenía el crecimiento, la producción celular de ácido acético no se veía afectada por esta limitación y continuaba en fase exponencial. Sin embargo, al aumentar la concentración del nutriente limitante, la biomasa aumenta continuamente hasta el final de la fermentación.

El análisis de varianza realizado sobre la velocidad de acetificación y el rendimiento GK correspondientes al segundo ciclo, indicó que no hubo diferencias estadísticas significativas para los niveles de proporción de carga evaluados, 40 % y 60 % ($p > 0,05$).

Un comportamiento similar fue informado durante la acetificación de un vino de Jerez con *Acetobacter aceti* en sistema sumergido semicontinuo en el que se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de etanol en la alimentación para diferentes porcentajes de descarga. La menor concentración de etanol analizada fue de 60 g/L, levemente superior a la utilizada en esta investigación (48 g/L) y se comprobó que la r_A promedio no sufrió modificaciones significativas para los distintos contenidos de etanol, aunque se observó un leve máximo a 75 g/L. Sin embargo, las concentraciones descargadas de ácido acético mostraron un comportamiento irregular: la alimentación con 60 g/L de etanol produjo valores prácticamente constantes de ácido acético para cualquier volumen descargado, y la razón fue atribuida a que a esa concentración alcohólica la conversión es total para todos los niveles de C/D. Para descargas de vinagre a concentraciones de 40 g/L de ácido acético, la r_A fue próxima a 4,5 g/L/h cuando la proporción de carga fue de 40 % y de 4,0 g/L/h si C/D fue de 60 % (Macias, Caro, & Cantero, 1997). Estos valores son muy cercanos a los obtenidos en la presente investigación ($4,0 \pm 0,8$

CAPITULO 3. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema semicontinuo.

g/L/h y $3,7 \pm 0,4$ g/L/h, respectivamente). Si bien el rendimiento GK no fue informado en ese trabajo, probablemente también debe haber permanecido constante puesto que, como se mencionó, la concentración de ácido acético en la salida también se mantuvo constante.

Existe una amplia variación en las proporciones de volúmenes (C/D) consideradas óptimas en términos de aumentar la r_A , reportados en la bibliografía. Así, en un trabajo publicado por Tesfaye et al. (2000) se aplicó un diseño factorial para determinar bajo qué condiciones de velocidad de agitación, volumen de trabajo y proporción de carga se obtenía el mejor rendimiento en producto y la mayor velocidad de acetificación. Encontraron que, con una proporción de carga 1:1, es decir del 50 %, se obtenían mejores rendimientos que utilizando proporciones 2:1 (67 % de descarga) si bien las velocidades de agitación ensayadas (250 y 450 rpm) fueron diferentes a las empleadas en esta experiencia.

En trabajos de acetificación con sustratos a base de vino de maíz en los que se empleó esponja vegetal (*Luffa cylindrica*) como material de soporte para las BAA, se comprobó que el equipo utilizado para la fermentación acética influyó sobre la C/D. Así, mientras en reactor de tanque agitado, la C/D adecuada fue de 30 %, en air lift, 40 % y en air lift con recirculación de mosto, 50 % (Warawut Krusong & Vichitraka, 2011).

3.4. Conclusiones

Los resultados obtenidos demostraron que la especie de *Acetobacter* utilizada en las experiencias fue capaz de tolerar elevados niveles de acidez, alrededor de 60 g/L expresado como ácido acético.

La adaptación lograda a condiciones ambientales severas, como en este caso la elevada acidez, permitió prácticamente duplicar la r_A que normalmente se obtendría en un sistema discontinuo, en las mismas condiciones operativas (Capítulo 2). Si bien sólo se han desarrollado dos ciclos oxidativos, queda pendiente continuar evaluando el nivel de tolerancia a la

CAPITULO 3. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema semicontinuo.

acidez en un proceso de acetificación con mayor número de ciclos y aumento gradual en la concentración de alcohol, lo que mejoraría su futuro uso en la industria.

En las condiciones analizadas, con una descarga/carga del 60 % no se vieron significativamente afectados la velocidad de acetificación y el rendimiento GK respecto de una descarga del 40 %. Por este motivo y con el objeto de desarrollar una fermentación económicamente eficiente y obtener mayor volumen de producto, se puede establecer a priori, una proporción de carga/descarga de 60% para cada ciclo de un proceso semicontinuo.

3.5. Bibliografía

- Arnold, S., Becker, T., Delgado, A., Emde, F., & Enenkel, A. (2002). Optimizing high strength acetic acid bioprocess by cognitive methods in an unsteady state cultivation. *Journal of Biotechnology*, 97(2), 133–145.
- Bar, R., Gainer, J. L., & Kirwan, D. J. (1987). An unusual pattern of product inhibition: batch acetic acid fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 29(6), 796–798.
- Bu'Lock, J., & Kristiansen, B. (1991). *Biotecnología Básica*. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A.
- de Ory, I., Romero, L. E., & Cantero, D. (2002). Optimum starting-up protocol of a pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering*, 52(1), 31–37.
- de Ory, I., Romero, L. E., & Cantero, D. (2004). Operation in semi-continuous with a closed pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering*, 63(1), 39–45.
- Fregapane, G., Nieto, J., & Salvador, M. D. (1999). Wine vinegar production using a noncommercial 100-Litre bubble column dynamic sparger. *Biotechnology and Bioengineering*, 1–6.

CAPITULO 3. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema semicontinuo.

- García-García, I., Cantero-Moreno, D., Jiménez-Ot, C., Baena-Ruano, S., Jiménez-Hornero, J., Santos-Dueñas, I., ... Barja, F. (2007). Estimating the mean acetification rate via on-line monitored changes in ethanol during a semi-continuous vinegar production cycle. *Journal of Food Engineering*, 80(2), 460–464.
- Garrido-Vidal, D., Pizarro, C., & González-Sáiz, J. M. (2003). Study of process variables in industrial acetic fermentation by a continuous pilot fermentor and response surfaces. *Biotechnology Progress*, 19(5), 1468–1479.
- Hill, G. A., & Daugulis, A. J. (1999). Phenol inhibition kinetics for growth of *Acetobacter aceti* on ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 841–846.
- Kocher, G. S., Dhillon, H. K., & Joshi, N. (2014). Scale up of sugarcane vinegar production by recycling of successive fermentation batches and its organoleptic evaluation. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(3), 955–963.
- Kruppa, R. K., & Vortmeyer, D. (1999). Transient growth- and product-formation kinetics of acetic acid bacteria. *Bioprocess Engineering*, 20, 545–551.
- Krusong, W., Pornpukdeewatana, S., Kerdpiboon, S., & Tantratian, S. (2014). Prediction of influence of stepwise increment of initial acetic acid concentration in charging medium on acetification rate of semi-continuous process by artificial neural network. *LWT - Food Science and Technology*, 56(2), 383–389.
- Krusong, W., & Vichitraka, A. (2011). An air-lift acetifier with mash recycling system for corn vinegar production by adsorbed cells of *Acetobacter aceti* WK on surface of Loofa sponge. En: *2nd International Conference on Biotechnology and Food Science* (Vol. 7, pp. 86–90). Singapore.
- Krusong, W., Yaiyen, S., & Pornpukdeewatana, S. (2014). Impact of high initial concentrations of acetic acid and ethanol on acetification rate in an internal Venturi injector bioreactor. *Journal of Applied Microbiology*, 118(3), 629–640.

CAPITULO 3. Acetificación de sustrato alcohólico de naranja en sistema semicontinuo.

- Levonen-Muñoz, E., & Cabezudo, M. (1981). Influence of oxygen transfer rate on vinegar production by *Acetobacter aceti* in submerged fermentation. *Biotechnol Letters*, 3(1), 27–32.
- Macias, M., Caro, I., & Cantero, D. (1997). Optimum operating conditions in closed-system industrial acetifiers (semi-continuous operation): a study by computer simulation. *Chemical Engineering Journal*, 65, 201–207.
- Nanba, A., Tamura, A., & Nagai, S. (1984). Synergistic effects of acetic acid and ethanol on the growth of *Acetobacter* sp. *Journal of Fermentation Technology*, 62, 501–505.
- Ndoye, B., Lebecque, S., Destain, J., Guiro, A. T., & Thonart, P. (2007). A new pilot plant scale acetifier designed for vinegar production in Sub-Saharan Africa. *Process Biochemistry*, 42(11), 1561–1565.
- Ormaechea Landa, A. R. (1991). Proceso industrial de elaboración de vinagre. En: C. Llaguno Marchena & M. C. Polo (Eds.), *El Vinagre de Vino* (pp. 49–68). Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Tesfaye, W., García-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2000). Set up and optimization of a laboratory scale fermentor for the production of wine vinegar. *Journal of the Institute of Brewing*, 106(4), 215–219.
- Tesfaye, W., Morales, M. L., García-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2002). Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 12–21.
- Tesfaye, W., Morales, M. L., García-Parrilla, M. del C., & Troncoso, A. M. (2003). Optimising wine vinegar production: fermentation and ageing. *Applied Biotechnology, Food Science and Policy*, 1(2), 1–6.

Capítulo 4:

Caracterización de
vinagre de
naranjas.

4.1. Introducción

Las frutas cítricas constituyen una fuente importante de compuestos con actividad biológica, tales como ácido ascórbico (vitamina C), polifenoles y carotenoides, importantes para la nutrición humana debido a sus propiedades antioxidantes (Passaro Carvalho & Londoño-Londoño, 2012; Gui-Fang et al., 2013; Lee, 2013). La actividad antioxidante (AA) se define como la capacidad de una/s sustancia/s para inhibir la degradación oxidativa provocada principalmente por especies reactivas del oxígeno, cuya reactividad es más alta que la del oxígeno molecular. Dado que están asociadas a la aparición y desarrollo de enfermedades como cáncer, diabetes, desórdenes neurodegenerativos, aterosclerosis y envejecimiento, se ha incrementado la concienciación de los consumidores y ha llevado a buscar alternativas para incorporar en la ingesta diaria algunos componentes beneficiosos para la salud. Esta situación ha promovido la aparición en el mercado de una amplia gama de productos como los suplementos nutricionales y alimentos funcionales o frutas con mayor contenido de componentes bioactivos (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1997; Passaro Carvalho & Londoño-Londoño, 2012).

Aunque la vitamina C se considera el antioxidante más abundante en los cítricos, varios investigadores han comprobado una elevada contribución de fenoles totales, entre ellos flavonoides, a la AA en estas frutas (Gorinstein, Huang, Leontowicz, H., Leontowicz, M., Yamamoto, Soliva-Fortuny, R. S., Martín-Belloso, & Martínez Ayala, A. L., Trakhtenberg, 2006; Escobedo-Avellaneda, Gutiérrez-Urbe, Valdez-Fragoso, Torres, & Welti-Chanes, 2014).

La composición fenólica de los jugos de naranja está constituida por ácidos fenólicos, mayoritariamente ácido ferúlico y gálico, y por flavanonas, de las cuales la hesperidina es el componente en mayor proporción (Kelebek, Selli, Canbas, & Cabaroglu, 2009). Estos compuestos se pueden oxidar a quinonas, ya sea por el oxígeno molecular, o bien por medio de las enzimas polifenoloxidasas (PPO), muy comunes en tejidos vegetales (Damodaran, Parkin, & Fennema, 2010). Sin embargo, no todos los compuestos fenólicos

presentan la misma AA, sino que ésta depende de su estructura química (Verzelloni, Tagliazucchi, & Conte, 2007; Escobedo-Avellaneda et al., 2014).

El ácido ascórbico es el componente ácido más importante de los cítricos. Su concentración (20-100 mg/100mL jugo) puede ser muy variable dependiendo de la variedad o especie. A pesar de su importante función como cofactor enzimático y antioxidante, los seres humanos no pueden sintetizarlo ni almacenarlo en el cuerpo (Bernardi, Marocco, Caruso, & Licciardello, 2014), de allí la importancia de suministrarlo en la dieta. Sin embargo, además de los numerosos beneficios, se debe considerar también su facilidad para ser degradado por el calor y la exposición al aire y luz (Passaro Carvalho & Londoño-Londoño, 2012; Bernardi et al., 2014).

Los carotenoides son un grupo numeroso de pigmentos naturales que proporcionan el color amarillo, naranja y rojo a las plantas, y cumplen además importantes funciones en la fotosíntesis. Las frutas cítricas son una excelente fuente de carotenoides para los seres humanos y animales. Recientemente se ha sugerido que estos compuestos no sólo son precursores de la vitamina A sino que también juegan un rol importante en la capacidad antioxidante (Liu, Li, & Chen, 2014). Debido a su naturaleza altamente insaturada, tienen tendencia a oxidarse rápidamente. El factor más importante en la oxidación de los carotenoides es la presencia de oxígeno o de reactivos fuertemente oxidantes. La temperatura no sólo acelera la degradación, sino que también los vuelve más susceptibles frente a la descomposición (Damodaran et al., 2010).

El contenido en compuestos antioxidantes de las frutas y, por tanto, la actividad antioxidante asociada, pueden resultar afectados por factores fisiológicos como la maduración, como así también por factores tecnológicos como las condiciones de procesado y conservación post-cosecha (Connor, Luby, Hancock, Berkheimer, & Hanson, 2002; Sdiri, Salvador, Farhat, Navarro, & Besada, 2014).

Aunque el vinagre sea considerado un producto ácido que se preserva a sí mismo, durante su almacenamiento en botellas puede sufrir cambios físico-químicos y organolépticos debido a la evolución, oxidación y envejecimiento de ciertos compuestos específicos. La presencia de oxígeno normalmente

desencadena una serie de reacciones químicas y enzimáticas. Estos cambios dependen del tipo de vinagre, de la materia prima, del proceso de elaboración y de las condiciones de almacenaje (Casale, Sáiz Abajo, González Sáiz, Pizarro, & Forina, 2006).

Por otra parte, el estudio de la composición química del vinagre es de fundamental importancia ya que está relacionado con la materia prima usada, con la tecnología para su obtención y con la existencia o no de un proceso de maduración en barriles de madera, donde su composición fenólica juega un rol importante (Tesfaye, Morales, García-Parrilla, & Troncoso, 2002).

El Código Alimentario Argentino (2014) define los vinagres no vínicos bajo las denominaciones que corresponden a su origen, dentro de los cuales se ubican los vinagres de frutas. En el Artículo 1335 (Res. 80,13.1.82) se especifica que estos deben ser “obtenidos por fermentación alcohólica y subsiguiente fermentación acética de infusiones, maceraciones y/o cocimientos de frutas frescas azucaradas (no pasas) o fermentación alcohólica completa seguida de fermentación acética del jugo azucarado obtenido por expresión de fruta fresca (no jugos concentrados), uvas, manzanas, peras, ciruelas, ananás, limones,... utilizados en forma separada o en mezclas. Deberá tener caracteres organolépticos propios, relacionados a las materias primas que le dan origen”. Si bien son numerosas las especificaciones de calidad reglamentadas para vinagres de vino, alcohol, sidra, miel, malta, cereal y cerveza (Art. 1335), para vinagres de otra procedencia sólo se hace referencia a la acidez total cuyo valor, expresado como ácido acético, debe ser “no menor a 4 % p/v” (Art. 1336).

Asimismo, el Real Decreto 661/2012, del 13 de abril de 2012, estableció la norma de calidad para la elaboración y la comercialización de los vinagres dentro del territorio español. En el Artículo 3 del mencionado decreto se definió este producto como “el líquido apto para el consumo humano resultante de la doble fermentación alcohólica y acética de productos de origen agrario” y, específicamente los vinagres de frutas o vinagres de bayas, como “el producto obtenido a partir de frutas o de bayas de fruta mediante fermentación alcohólica y acética” (Agencia Estatal BOLETÍN OFICIAL DEL

ESTADO, 2012). En este caso se plantea una situación similar a la anterior en la que los estándares para vinagres de vino están más detallados y, para vinagres de otra procedencia sólo se fijan un “mínimo de 50 g/L” para acidez total y un “máximo de 0,5 % v/v” de etanol residual (Art. 8).

Considerando las escasas especificaciones existentes para vinagres de frutas y sumado al hecho de tratarse de un producto nuevo, se hace necesaria su caracterización a efectos de establecer parámetros de control de calidad en vistas a una posible comercialización. Para ello se evaluaron algunos parámetros normalmente utilizados para vinagres comerciales y su evolución al finalizar el período de maduración, que en este caso se fijó en 6 meses.

El amplio reconocimiento científico de que un mayor consumo de alimentos ricos en antioxidantes redundaría en claros beneficios para la salud de la población, ha llevado a que los consumidores se interesen cada vez más en conocer cuál es la riqueza antioxidante de los productos que consumen. En el marco de lo anteriormente mencionado, en el presente trabajo de tesis se abordó especialmente el análisis de las modificaciones registradas en las concentraciones de ácido ascórbico, fenoles totales, carotenoides y actividad antioxidante durante todo el proceso de elaboración de vinagre de naranjas. Asimismo, se realizó su caracterización teniendo en cuenta los estándares especificados en las legislaciones argentina y española.

4.2. Materiales y Métodos

4.2.1. Evaluación de componentes antioxidantes.

Se evaluaron las concentraciones de los principales componentes antioxidantes, ácido ascórbico, fenoles totales (FT) y carotenoides totales, y se determinó la actividad antioxidante (AA) mediante los métodos ABTS y DPPH, según las técnicas analíticas descritas en el apartado 4.2.3. Conviene aclarar en este punto que es recomendado combinar más de un método para evaluar, de manera correcta la AA de una muestra, puesto que ésta viene determinada no sólo por el modo de acción concreto de cada componente, sino por

interacciones sinérgicas entre ellos (Sánchez-Moreno, 2002; Sakanaka & Ishihara, 2008).

Con el objeto de analizar la influencia de las etapas de acetificación y maduración sobre las características de calidad mencionadas en el párrafo anterior, se tomaron muestras en las siguientes etapas del proceso de obtención de vinagre de naranjas: sustrato alcohólico destinado a acetificación (SNA), vinagre joven o recién obtenido (Vn0) y vinagre de naranja al cabo de un período de maduración de 6 meses (Vn6), según se indica en la Figura 4.1.

Una vez obtenidos, los vinagres se envasaron en botellas de vidrio de 250 mL y se almacenaron en ambiente de laboratorio a temperaturas entre 20-25 °C, simulando condiciones de comercialización o de alacena, una vez adquirido por el consumidor.

4.2.2. Caracterización del vinagre de naranja

Las muestras utilizadas para la caracterización del vinagre de naranja fueron obtenidas de una serie de tres procesos (réplicas) desarrollados a 30 °C, 700 rpm y caudal de aire de 0,71 L/min (condiciones de máxima velocidad de acetificación y rendimiento GK, según fueron determinadas en el Capítulo 2, apartado 2.3.3.3.). Las condiciones del sustrato alcohólico se mantuvieron como en todos los ensayos de acetificación realizados en este trabajo de investigación.

Teniendo en cuenta las escasas especificaciones reglamentadas para vinagres de procedencia frutal, los parámetros fisicoquímicos analizados en el vinagre de naranjas para su caracterización se basaron en los estándares de calidad especificados para vinagre de vino. En esta instancia, se determinó acidez total, acidez fija, acidez volátil, pH, extracto seco, cenizas totales, densidad, azúcares reductores totales y etanol residual (apartado 4.2.3. de “Técnicas analíticas”), en las siguientes etapas: vinagre joven (Vn0) y vinagre envejecido o madurado (Vn6).

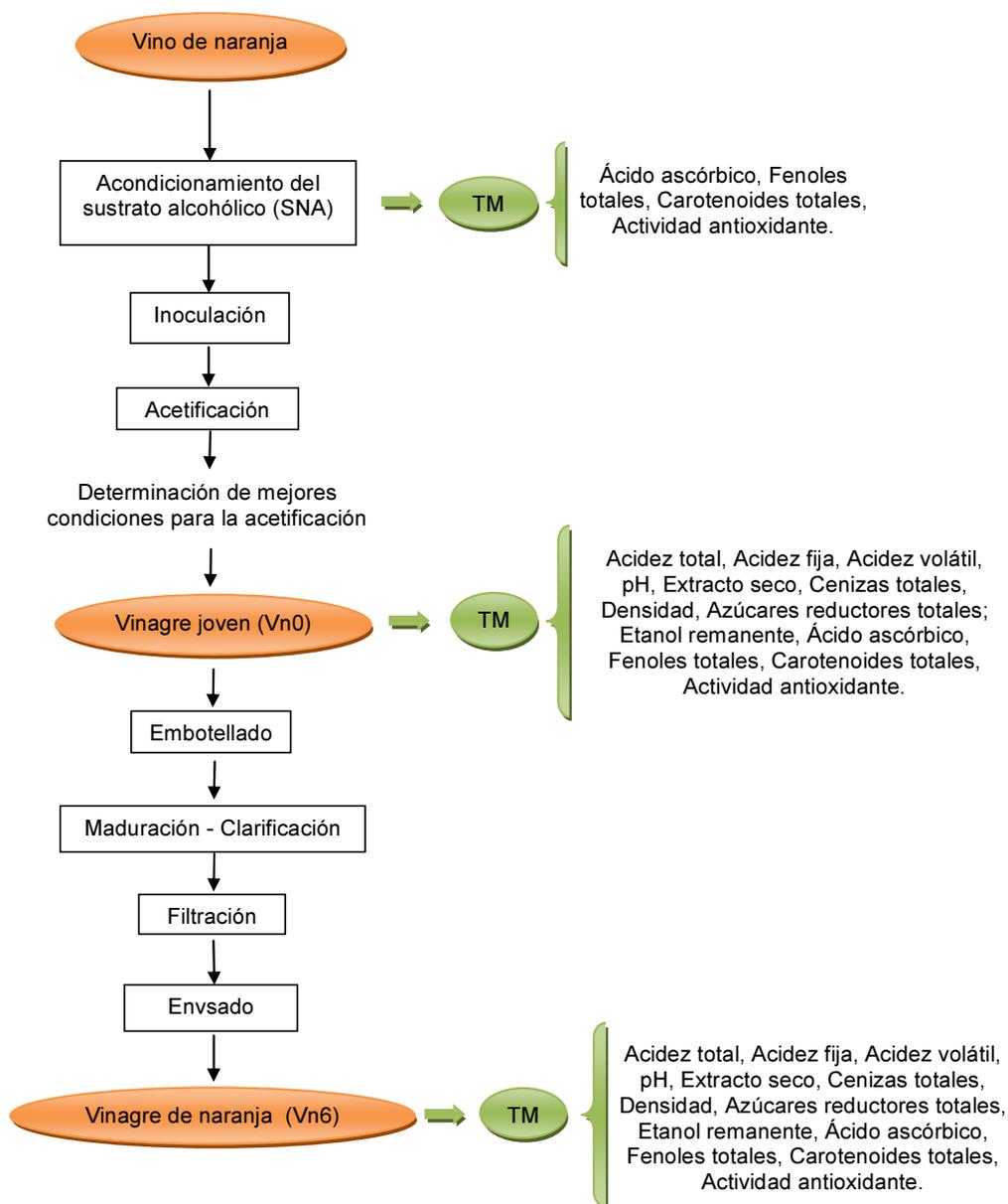


Figura 4.1. Esquema de toma de muestras (TM) para la caracterización del vinagre de naranjas.

4.2.3. Técnicas analíticas

Acidez total: mediante titulación con solución de hidróxido de sodio (NaOH) y fenolftaleína como indicador (AOAC, 2005, 18th Ed., Official Method

930.35). El resultado se expresó como g de ácido acético por 100 mL de vinagre (se asumió que toda la acidez del medio se debe a este ácido).

Acidez fija: se basa en la evaporación a sequedad, en repetidas veces, de una muestra de vinagre previamente filtrado (AOAC, 2005, 18th Ed., Official Method 930.35). El resultado se expresó en g de ácido acético por 100 mL de vinagre.

Acidez volátil: se define convencionalmente como la diferencia entre los valores de su acidez total y fija, expresadas ambas en g de ácido acético por 100 mL de vinagre (AOAC, 2005, 18th Ed., Official Method 930.35).

pH: método potenciométrico, con peachímetro BOECO modelo BT-500 (Germany) (AOAC, 2005, 18th Ed., Official Method 930.35).

Extracto seco: el método oficial para vinagres se basa en la evaporación de la muestra de vinagre en baño de agua en ebullición y posterior desecación en estufa a 100-105 °C durante 2,5 horas. El resultado se expresó como % (p/v) de vinagre (AOAC, 2005, 18th Ed., Official Method 930.35).

Cenizas totales: la técnica incluye sucesivas evaporaciones, incineración a 500 - 550 °C y redisoluciones repetidas tres veces del residuo de evaporación de un volumen de vinagre. El resultado se expresó en % (p/v) de vinagre (AOAC, 2005, 18th Ed., Official Method 930.35).

Densidad: mediante densímetro peso específico a 15 °C 1,000/1,500: 0,005, expresada en g/mL de vinagre.

Azúcares reductores totales: mediante técnica volumétrica de Lane-Eynon (AOAC, 1995, 16th Ed., Official Method 923.09), previa hidrólisis ácida de la muestra. Los resultados se expresaron como g por 100 mL de vinagre.

Concentración de etanol residual: método enzimático (Boehringer Mannheim/R-Biopharm, Cat. N° 10176290035). El resultado se expresó como % (v/v) de vinagre.

Ácido ascórbico: se determinó por cromatografía líquida HPLC en cromatógrafo Hewlett Packard series 1100, con fase reversa y detector UV. Fase móvil KH₂PO₄ 2%, pH: 2,4. Velocidad de flujo: 0,5 mL/min. Temperatura:

25 °C. Volumen de inyección: 20 µL. $\lambda=214\text{nm}$. Columna Hipersil (fase estacionaria): Hewlett Packard, Hipersil BDS C 18 3 µm, 100 × 4,0 mm. (25 cm × 4,5 cm). Guarda columna: Hewlett Packard, ODS-Hipersil C 18,5 µm, 20 × 2,1 m. El resultado se expresó en g de ácido ascórbico por L de muestra (SNA, vinagres).

Fenoles totales: se empleó el método basado en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (Saura-Calixto, 1998). Este reactivo consiste en una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos presentes en la muestra, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). Para la cuantificación se mezcló un volumen de muestra con otro del reactivo y se agregó solución de carbonato de sodio al 20% y agua ultra pura. Luego de agitar esta mezcla, se incubó a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) durante 30 minutos en la oscuridad. Por último, se midió la absorbancia de estas muestras a 760 nm en espectrofotómetro UV-visible SHIMADZU, modelo UV 1603 (Japan). Todas las lecturas se realizaron contra un blanco compuesto de agua ultra pura, solución de carbonato de sodio al 20% y Reactivo de Folin-Ciocalteu (Zapata, 2014).

Se utilizó ácido gálico como fenol de referencia, por lo que los resultados se expresaron como mg de equivalente de ácido gálico (GAE)/100 mL de muestra (SNA, vinagres).

Carotenoides totales: se utilizó el método colorimétrico descrito por Casas, Mallent, & Montoro (1976). Los carotenoides fueron extraídos de las muestras con una mezcla de alcohol isopropílico y hexano. Luego, en el extracto alcohólico se determinó la absorbancia a 450 nm (longitud de onda de máxima absorción del β -caroteno), en espectrofotómetro UV-visible SHIMADZU, modelo UV 1603 (Japan). Los resultados se expresaron como mg de β -caroteno por 100 mL de vinagre, previa construcción de una curva de calibración obtenida con la droga pura (SIGMA, Type IV) y blanco de hexano-acetona.

Actividad antioxidante: la actividad antioxidante de las muestras se determinó por dos métodos: ABTS y DPPH. Se utilizó ácido L-ascórbico como

antioxidante de referencia y los resultados se expresaron como mg de equivalente de ácido ascórbico (EAA)/100 mL de muestra (SNA, vinagres).

Método del radical ABTS^{•+}: el radical ABTS^{•+} se obtiene tras la reacción de 2,2' azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico), ABTS, con persulfato potásico (2,45 mM, concentración final) incubados en la oscuridad durante 12 h. Una vez formado el radical ABTS^{•+} se efectuó una dilución con buffer fosfato a pH 7,4 hasta obtener un valor de absorbancia de 0,70 a 734 nm (longitud de onda de máxima absorción) (Re et al., 1999). Durante la reacción con antioxidantes (fenoles, vitamina C u otros) pasa a su forma neutra e incolora y puede observarse espectrofotométricamente (Zapata, 2014).

La determinación de la actividad antioxidante de las muestras se realizó mezclando un volumen de éstas con otro de solución diluida de radical ABTS^{•+}, se agitó durante 30 segundos a 1600 rpm e incubó a temperatura ambiente (25±1 °C) y en oscuridad durante 20 minutos. Luego se midió la absorbancia a 734 nm en espectrofotómetro UV-visible SHIMADZU, modelo UV 1603 (Japan). El control se preparó de la misma forma, pero en vez de muestra se utilizó un volumen de agua ultra pura.

Se construyó una curva de calibrado con cinco puntos de concentraciones conocidas de soluciones patrón de ácido ascórbico, tratadas como se explicó en el párrafo anterior.

Método del radical DPPH[•]: esta técnica se basa en la reducción de la absorbancia a 517 nm del radical DPPH[•] o 2,2-difenil-1-picril hidrazilo por la acción de antioxidantes. Este radical es de color violeta intenso y se vuelve incoloro o amarillo pálido cuando reacciona con antioxidantes que lo neutralizan (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995).

En primer lugar se preparó una solución madre de DPPH[•] en una concentración de 200 mg/L y se conservó en refrigeración a 4±1 °C en envase de vidrio color caramelo y envuelto en papel de aluminio hasta el momento de ser utilizado. Para las determinaciones analíticas, se realizó una dilución 1/10 de esa solución empleando metanol calidad HPLC como solvente (Brand-Williams et al., 1995). Las medidas de la actividad antioxidante de las muestras

se realizaron mezclando un volumen de la muestra con otro de solución diluida de DPPH. Luego de agitar durante 30 segundos a 1600 rpm se incubó a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) y en oscuridad durante 30 minutos. Luego se midió la absorbancia a 517 nm en espectrofotómetro UV-visible SHIMADZU, modelo UV 1603 (Japan). El control se preparó de la misma forma pero en vez de muestra, se utilizó un volumen de agua ultra pura. Con estos datos, se calculó la diferencia de absorbancia (absorbancia del control menos absorbancia de la muestra) a los 30 minutos de iniciada la reacción, entre el radical y los antioxidantes presentes en la muestra (Zapata, 2014).

Se construyó una curva de calibrado con cuatro puntos de concentraciones conocidas de soluciones patrón de ácido ascórbico, tratadas como se explicó en el párrafo anterior.

4.2.4. Tratamiento estadístico

Cada una de las determinaciones analíticas se efectuó por triplicado. Se analizaron los resultados mediante análisis de varianza y, cuando fue necesario ($p < 0,05$), se aplicó el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. En todos los casos se utilizó un nivel de confianza del 95 %.

Para evaluar la relación entre los diferentes componentes antioxidantes analizados y la actividad antioxidante, se obtuvieron los coeficientes de correlación (r). Se consideró que hubo una correlación significativa entre dos variables cuando $p < 0,05$.

Todos los análisis estadísticos de los datos se realizaron con el programa Statgraphics Centurión XV Corporate.

4.3. Resultados y Discusión

4.3.1. Evaluación de componentes antioxidantes.

En general, tanto los componentes antioxidantes evaluados como la AA disminuyeron a lo largo del proceso de elaboración de vinagre (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Concentración de componentes antioxidantes presentes en distintas etapas del proceso de obtención de vinagre de naranjas.

	Sustrato alcohólico de naranjas para acetificar (SNA)	Vinagre joven (Vn0)	Vinagre luego de maduración durante 6 meses (Vn6)
Ácido ascórbico (g/L)	0,124±0,005 ^a	0,063±0,006 ^b	0,045±0,002 ^c
Fenoles totales (mg GAE/100 mL)	123,63±9,17 ^a	56,53±0,99 ^b	54,14±2,81 ^b
Carotenoides totales (mg/100 mL)	0,024±0,002 ^a	0,013±0,002 ^b	0,015±0,002 ^b
ABTS (mg EAA/100 mL)	85,48±2,27 ^a	70,63±0,94 ^b	50,61±0,88 ^c
DPPH (mg EAA/100 mL)	53,24±4,51 ^a	46,75±2,37 ^b	24,10±1,61 ^c

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre las medias de los productos de cada etapa analizada.

4.3.1.1. Ácido ascórbico

La concentración de ácido ascórbico disminuyó a lo largo de todo el proceso de obtención de vinagre de naranja. Durante el proceso de acetificación de SNA, se registró el mayor descenso (49,2 %) en su concentración, probablemente a causa del continuo suministro de oxígeno al sistema ya que, tal como se mencionó en la Introducción, la vitamina C es fácilmente degradada por contacto con el aire (Passaro Carvalho & Londoño-Londoño, 2012; Bernardi et al., 2014).

Durante la etapa de maduración se registró una pérdida del 29 % entre Vn0 y Vn6. Aunque no se hallaron referencias de comportamientos durante la maduración de vinagres en matrices similares al vinagre de naranja, se podría interpretar que ese descenso pudo atribuirse a la autooxidación del ácido ascórbico que, aunque lentamente, se verifica aún en condiciones totalmente anaeróbicas (Bruchmann, 1980). Además, las reacciones químicas en la que interviene este compuesto, como las de pardeamiento, son influenciadas por el tiempo y temperatura de almacenamiento (Rodríguez, Sadler, Sims, & Braddock, 1991).

4.3.1.2. Fenoles totales (FT)

El contenido de FT disminuyó un 54,3 % durante el proceso de acetificación. Este comportamiento también fue corroborado durante la acetificación de sidra, vinos tintos y blancos, en los que se registraron reducciones de 40 %, 13 % y 8 % respectivamente, y se atribuyó a la fuerte degradación o transformación fenólica presente en esa etapa. Las diferentes proporciones de FT en cada caso, se relacionaron con las distintas composiciones individuales de FT, como la presencia de fenoles poliméricos que son oxidados con mayor lentitud que los monoméricos (Andlauer, Stumpf, & Fu, 2000).

Durante la etapa de maduración, Vn0 no experimentó modificación alguna en la concentración de FT. Es importante mencionar que las referencias bibliográficas a estudios de maduración o envejecimiento de vinagres en botellas son muy escasas, ya que en su mayoría aquellos se realizan en barriles de madera de roble o con el agregado de virutas de esta madera, debido a la mayor extracción de FT producida a partir de ellas (Palacios, Valcárcel, Caro, & Pérez, 2002; Morales, Benitez, & Troncoso, 2004; Tesfaye, Morales, Benítez, García-Parrilla, & Troncoso, 2004; Durán Guerrero et al., 2011; Chen, Gui, Shi, Zhang, & Chen, 2013; Cerezo, Alvarez-Fernández, Antonia, M Hornedo-Ortega, Troncoso, & García-Parrilla, 2014). En un trabajo de investigación (Llabé Pino, 2008) en el que se evaluó la variación de los componentes fenólicos en vinagres de manzana y de uva, *Chardonnay*,

Cabernet Sauvignon y *Moscatel*, almacenados en botellas de vidrio, se informó una reducción de los ácidos hidroxibenzoicos y sus derivados, y de los ácidos hidroxicinámicos y sus derivados, para todos los vinagres, a temperaturas de conservación de 15 °C, al cabo de un año. Sin embargo, además de las reacciones de degradación detectaron otras de formación de nuevos componentes como las de pardeamiento, especialmente durante la maduración. Por esta razón, para interpretar las causas de las modificaciones observadas en el contenido de FT sería importante contar con el perfil fenólico individual en cada fase de análisis.

4.3.1.3. Carotenoides totales

El contenido de carotenoides disminuyó un 46 % durante la etapa biooxidativa como era previsible, dada la susceptibilidad de estos componentes al contacto con el aire (Damodaran et al., 2010), y la particularidad, en este proceso, de un permanente suministro de aquél al sistema. Sin embargo, durante la maduración no se observaron cambios en su concentración.

Es importante mencionar la baja concentración de carotenoides totales en el sustrato alcohólico SNA ($0,024 \pm 0,002$ mg/100 mL), en comparación con el cuantificado en la fruta de origen (1,170 mg/100 mL). Esto se debió a que, durante la vinificación, fueron arrastrados con la fase sólida (borra) que se deposita en los primeros estadios del proceso, y separados luego del trasiego (Ferreyra, 2006).

4.3.1.4. Actividad antioxidante (AA)

La actividad antioxidante disminuyó un 40,8 % a lo largo de todo el proceso de acuerdo al método ABTS, y un 54,7 % según el método DPPH.

Durante la etapa de acetificación, la AA se redujo un 17,4 % según ABTS y 12,2 % según DPPH. Un valor similar, del orden de 16,8 %, medido con esta última metodología, fue publicado para un proceso de acetificación de un vino tinto. Los autores atribuyeron esta reducción a modificaciones en la

composición química debidas al proceso biooxidativo (Cerezo, Cuevas, Winterhalter, Garcia-Parrilla, & Troncoso, 2010).

En la fase de maduración (Vn0 a Vn6), la reducción de la actividad antioxidante determinada con el método ABTS fue del 28,4 %, mientras que con el método DPPH, fue del 48,5 %. Seguramente, estas tendencias tengan relación con la disminución registrada en la concentración de ácido ascórbico.

Varias son las publicaciones que señalan que la AA en vinagres es menor que en vinos tintos. Esto fue justificado señalando que la acetificación del vino podía disminuir el contenido de fenoles con alta AA y/o conducir a la formación de nuevos compuestos fenólicos con menor AA que aquellos originalmente presentes en el sustrato alcohólico (Alonso, Guillén, & Barroso, 2003; Pellegrini et al., 2003; Dávalos, Bartolomé, & Gómez-Cordovés, 2005).

Se obtuvo una correlación significativa entre las concentraciones de ácido ascórbico y fenoles totales y la actividad antioxidante, no así entre ésta y los carotenoides totales (Tabla 4.2), lo que estaría indicando que estos componentes no contribuyeron a la AA de los vinagres de naranja.

Tabla 4.2. Coeficientes de correlación (r) entre componentes antioxidantes y actividad antioxidante (ABTS y DPPH), en vinagres de naranja ($p < 0,05$).

	ABTS	DPPH
Ácido ascórbico	0,92	0,81
Fenoles totales	0,82	0,67
Carotenoides totales	Sin correlación	Sin correlación
ABTS	---	0,97

Estos resultados coinciden con los publicados para jugos de naranja, que señalan que el ácido ascórbico es uno de los componentes que más contribuye a la AA (Miller & Rice-Evans, 1997; Gardner, White, McPhail, & Duthie, 2000; Arena, Fallico, & Maccarone, 2001); mientras que los

carotenoides totales presentan una contribución insignificante (Gardner, White, McPhail, & Duthie, 2000).

4.3.2. Caracterización del vinagre de naranjas.

Para el análisis de las características del vinagre de naranjas se han presentado, en la Tabla 4.3., las especificaciones de las legislaciones argentina y española, para vinagres de frutas y de vino.

Tabla 4.3. Especificaciones del Código Alimentario Argentino (C.A.A.) y Código Alimentario Español (C.A.E.) para vinagres de procedencia frutal y de origen vínico.

	<i>Vinagres de frutas</i>		<i>Vinagres de vino</i>	
	C.A.A.	C.A.E.	C.A.A.	C.A.E.
Acidez total	No menor de 4,0 % p/v	Mín. 50 g/L	No menor de 5,0 % p/v	Mín. 60 g/L
Acidez volátil	----	----	No menor de 85 % p/v de la acidez total	----
Extracto seco	----	----	0,75 – 2,0 % p/v	Mín. de 1,2 g/L y grado de ácido acético
Cenizas totales	----	----	No menor de 0,1 % p/v	----
Densidad (a 15 °C, g/mL)	----	----	1,015-1,020	----
Azúcares reductores totales	----	----	Máx. de 0,4 % p/v, expresadas en dextrosa	----
Etanol residual	----	Máx. de 0,5 % v/v	Máximo equivalente a 1/10 de la acidez total, expresada en volumen	Máx. de 1,5 % v/v

CAPITULO 4. Caracterización de vinagre de naranjas.

Los parámetros de acidez total y etanol durante las etapas Vn0 y Vn6 (Tabla 4.4) se enmarcaron dentro de los estándares reglamentados en las normas argentina y española para vinagres de frutas (Tabla 4.3). El resto de los parámetros, evaluado con respecto a las especificaciones para vinagres de vino, también cumplimentó las normas de calidad de ambas reglamentaciones (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Parámetros fisicoquímicos de vinagre de naranja recién obtenido (Vn0) y al cabo de 6 meses de maduración (Vn6).

	Vn0	Vn6
Acidez Total (% p/v)	5,58±0,06 ^a	5,95±0,04 ^b
Acidez Fija (% p/v)	0,54±0,00 ^a	0,53±0,01 ^a
Acidez Volátil (% p/v)	5,04±0,06 ^a	5,41±0,05 ^b
pH	2,76±0,03 ^a	2,61±0,04 ^b
Densidad (a 15 °C, g/mL)	1,015±0,000 ^a	1,015±0,000 ^a
Extracto seco (% p/v)	1,18±0,05 ^a	1,14±0,02 ^a
Cenizas Totales (% p/v)	0,34±0,03 ^a	0,33±0,01 ^a
Azúcares reductores totales (% p/v)	0,21±0,03 ^a	0,19±0,07 ^a
Etanol residual (% v/v)	0,389±0,016 ^a	0,081±0,022 ^b

Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las medias de los productos.

En general, se observa que sólo los parámetros analíticos relacionados con la actividad metabólica de las BAA (acidez total, acidez volátil, pH y etanol residual) han presentado diferencias estadísticamente significativas durante la etapa de maduración.

4.3.2.1. Acidez

El ácido acético es el principal componente de los vinagres cualquiera sea el sustrato alcohólico del que procedan. El estudio de la acidez total y fija permite conocer la naturaleza de los componentes ácidos del vinagre, es decir si solamente existen ácidos volátiles o si, además, hay presencia de ácidos fijos. De hecho, la acidez fija nula detectada en vinagres de alcohol se justifica por su procedencia de un sustrato destilado (Acosta Artiles, Hardisson de la Torre, & Romero, 1993).

La acidez volátil (AV) determinada en los vinagres de naranja ($5,04 \pm 0,06$ % p/v) correspondió al 90 % p/v de la total. Estos elevados valores de AV permitieron concluir que la acidez de los vinagres se debió casi exclusivamente al metabolismo oxidativo de las BAA, mientras que la participación de otros ácidos resultó de menor importancia.

En un estudio en el que se caracterizaron vinagres de distintas materias primas de origen, comercializados en Brasil, se informaron valores de AV de $2,74 \pm 0,07$ %, muy inferiores a los exigidos en la legislación de ese país, en el que se estipula “un mínimo de 4,00 % de ácido acético” (Peixoto Marques, Spinosa, Fernandes, & de Souza Castro, Carlos Frederico Caliarí, 2010), e incluso menores a los obtenidos en esta tesis.

Luego del período de maduración de 6 meses, la acidez total aumentó un 6,6 %. No se registraron cambios significativos en la acidez fija, aunque el incremento en AV indicó que las BAA continuaron con el proceso metabólico del etanol remanente y su transformación en ácido acético. Este comportamiento se ha justificado en varias oportunidades por el hecho que estas bacterias no mueren necesariamente con la ausencia de oxígeno. Específicamente, *Acetobacter* puede ingresar en un estado “viable pero no cultivable” bajo privación de oxígeno (Fugelsang & Edwards, 2007).

4.3.2.2. pH

Tanto la acidez como el pH influyen directamente en las características sensoriales de los vinagres (Peixoto Marques et al., 2010). Si bien el pH no es un parámetro que esté especificado en la reglamentación de análisis para vinagres, su determinación reviste importancia como indicador de posibles adulteraciones con ácidos minerales. Por lo general, se han considerado valores normales para vinagres de vino españoles, aquellos comprendidos entre 2,8 y 3,3, con lo cual aquellos inferiores a 2,8 eran considerados sospechosos (Acosta Artiles, Hardisson de la Torre, et al., 1993). No obstante, otras referencias bibliográficas informaron valores de pH en general menores (2,62-2,91) para muestras de vinagres de vino tinto, vino blanco, alcohol y arroz (Aguiar, de Alencar Nascimento, Ferretti, & Gonçalves, 2005).

Los vinagres de naranja del presente estudio registraron valores de pH inferiores a los informados por Peixoto Marques et al. (2010) para vinagres de naranja comercializados en Brasil ($3,40 \pm 0,025$), posiblemente relacionados con la menor acidez total informada en los últimos.

Evidentemente este parámetro resulta influido por la procedencia de la materia prima de origen, así como de su composición en ácidos.

Luego del período de maduración, Vn6 mostró una ligera disminución del pH respecto de Vn0, relacionada con la continuidad en la producción de ácido acético durante esta etapa.

4.3.2.3. Densidad

La densidad a 15 °C registrada en Vn0 fue de $1,015 \pm 0,000$ g/mL, coincidente con el límite inferior indicado para vinagres de vino (Tabla 4.3). Luego del período de maduración, no se observó variación de este parámetro.

4.3.2.4. Extracto seco

El contenido en extracto seco representa la materia orgánica y mineral resultante de la evaporación del agua y sustancias volátiles presentes en la muestra de vinagre. El método de cultivo sumergido genera vinagres relativamente turbios debido a la suspensión de bacterias acéticas y de sólidos de la materia prima (Peixoto Marques et al., 2010).

El contenido en extracto seco del vinagre de naranja en Vn0 fue de $1,18 \pm 0,05$ % p/v, valor inferior al publicado para vinagre de naranja ($38,3 \pm 0,683$ g/L) por Peixoto Marques et al. (2010), probablemente debido a que la materia prima de origen fue un vino de naranja clarificado.

Luego del período de maduración, Vn6 no tuvo variaciones en el contenido de extracto seco. Este comportamiento también fue observado en un estudio realizado con vinagres de manzana, *Cabernet Sauvignon*, *Chardonnay* y *Moscatel*, almacenados en botellas de vidrio a temperaturas entre 15 y 33 °C. Al cabo de un año, en cambio, se verificó un aumento en el contenido de extracto seco, en las muestras de vinagre de manzana y *Cabernet Sauvignon* (Llabé Pino, 2008).

4.3.2.5. Cenizas

Esta determinación permite cuantificar las sales minerales contenidas en una muestra después de la incineración del residuo de evaporación de un volumen conocido de vinagre, realizada de manera que se puedan obtener todos los cationes en forma de carbonatos y otras sales minerales anhidras. Las reglamentaciones fijan los límites con el objeto de detectar posibles adulteraciones en los vinagres. Así, valores muy bajos podrían indicar un producto muy diluido y reconstituido con ácido acético. Por el contrario, valores muy altos podrían indicar el agregado de sustancias no volátiles como la glicerina, para aumentar el extracto seco y con ello las cenizas (Llaguno Marchena & Polo, 1991).

El vinagre de naranja en Vn0 presentó $0,34\pm 0,03$ % p/v de cenizas. Este contenido resultó similar al informado por Peixoto Marques et al. (2010) para el vinagre de naranja comercializado en Brasil ($3,65\pm 0,008$ g/L). Si bien el Real Decreto 661/2012 no fija límites para este parámetro, durante un tiempo se consideró que la relación extracto seco/cenizas debía estar comprendida entre 3 y 8 para vinagres de vino genuinos (Llaguno Marchena & Polo, 1991), intervalo en el que también entra el vinagre de naranja (relación extracto seco/cenizas=3,5).

Después del período de maduración, Vn6 ($0,33\pm 0,01$ % p/v) no mostró diferencias estadísticas significativas respecto de Vn0.

4.3.2.6. Azúcares reductores totales

El contenido de azúcares reductores totales en Vn0 no experimentó modificaciones durante su almacenamiento (Tabla 4.4). Este comportamiento estaría demostrando la dificultad de las BAA para metabolizar estos compuestos durante este período, caracterizado por la baja disponibilidad de oxígeno, a diferencia de lo ocurrido con el etanol. Por otra parte, también indicaría la ausencia de pardeamiento no enzimático, por lo menos debido a la reacción de Maillard que ocurre entre los azúcares reductores y aminoácidos (Llabé Pino, 2008).

4.3.2.7. Etanol remanente

En la fabricación industrial de vinagre se intenta lograr el mayor rendimiento en la transformación de etanol a ácido acético. Es deseable que existan pequeñas cantidades de alcohol residual ya que eso repercute favorablemente en el *flavor* del vinagre producido por formación del bouquet, principalmente si existiere almacenamiento posterior (Acosta Artilles, Romero, & Hardisson de la Torre, 1993). Además, si se agotara por completo el etanol, las bacterias acéticas podrían consumir el ácido acético formado, originando

productos de baja calidad (Llaguno Marchena & Polo, 1991; Acosta Artilles, Romero, et al., 1993).

Mientras que en los vinagres obtenidos en los sistemas modernos de acetificación industrial queda una baja concentración de etanol final, en los métodos lentos no es posible ni deseable utilizar todo el contenido alcohólico disponible, ya que durante su envejecimiento, el etanol residual (2-3 % v/v) se va combinando lentamente con el ácido acético para la producción de ésteres (Llaguno Marchena & Polo, 1991).

Teniendo en consideración el incremento registrado en la acidez total, es razonable pensar que la disminución de la concentración de etanol entre Vn0 y Vn6 se debió a la continuidad de la actividad biológica de las BAA, oxidando el alcohol residual a ácido acético, y/o a su combinación con ácido acético para la formación de ésteres (Palacios et al., 2002).

4.4. Conclusiones

Los componentes bioactivos analizados, así como su actividad antioxidante asociada, disminuyeron a lo largo de todo el proceso, mientras que las concentraciones de FT y carotenoides permanecieron constantes durante la etapa de maduración. La mayor reducción se produjo durante la acetificación, posiblemente a causa de la oxidación de los componentes, debido al continuo suministro de aire al sistema.

La mayor contribución a la actividad antioxidante se debió a la concentración de ácido ascórbico y compuestos fenólicos.

La caracterización del vinagre de naranjas se encuadró dentro de los estándares de calidad especificados para vinagres de frutas en las legislaciones argentina y española, incluso después de un período de maduración de 6 meses.

4.5. Bibliografía

- Acosta Artilles, A., Hardisson de la Torre, A., & Romero, C. A. (1993). Caracterización físico-química de distintos tipos de vinagre. I: Acidez, extracto seco y cenizas. *Revista de Tecnología e Higiene de Los Alimentos*, 245, 99–104.
- Acosta Artilles, A., Romero, C. A., & Hardisson de la Torre, A. (1993). Caracterización físico-química de distintos tipos de vinagre. II: Determinación de algunos parámetros de naturaleza volátil. *Revista de Tecnología e Higiene de Los Alimentos*, 245, 105–108.
- Agencia Estatal BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO. Real Decreto 661/2012, de 13 de abril, por el que se establece la norma de calidad para la elaboración y la comercialización de los vinagres. (2012). España. Disponible en: <http://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2012-5529>
- Aguiar, A., de Alencar Nascimento, R. A., Ferretti, L. P., & Gonçalves, A. R. (2005). Determinação de ácidos orgânicos e etanol em vinagres comerciais. *Brazilian Journal of Food Technology*, 51–56.
- Andlauer, W., Stumpf, C., & Fu, P. (2000). Influence of the acetification process on phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3533–3536.
- Arena, E., Fallico, B., & Maccarone, E. (2001). Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chemistry*, 74(4), 423–427.
- Bernardi, J., Marocco, A., Caruso, P., & Licciardello, C. (2014). Molecular characterization of citrus cultivars: insight from recent studies. En: K. Hayat (Ed.), *Citrus. Molecular Phylogeny, Antioxidant Properties and Medicinal Uses*. New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 22, 25–30.

- Bruchmann, E.-E. (1980). *Bioquímica técnica: química alimentaria, de las fermentaciones y agrícola*. Zaragoza, España.: Editorial Acribia S.A.
- Casale, M., Sáiz Abajo, M. J., González Sáiz, J. M., Pizarro, C., & Forina, M. (2006). Study of the aging and oxidation processes of vinegar samples from different origins during storage by near-infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 557(1-2), 360–366.
- Casas, A., Mallent, D., & Montoro, R. (1976). Evaluación rápida del contenido en carotenoides totales del zumo de naranja. *Instituto de Agroquímica Y Tecnología de Alimentos*, 16(4), 503–508.
- Cerezo, A. B., Alvarez-Fernández, M. Antonia Hornedo-Ortega, R., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2014). Phenolic composition of vinegars over an accelerated aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 4369–4376.
- Cerezo, A. B., Cuevas, E., Winterhalter, P., Garcia-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2010). Anthocyanin composition in *Cabernet Sauvignon* red wine vinegar obtained by submerged acetification. *Food Research International*, 43(6), 1577–1584.
- Chen, T., Gui, Q., Shi, J. J., Zhang, X. Y., & Chen, F. S. (2013). Analysis of variation of main components during aging process of Shanxi Aged Vinegar. *Acetic Acid Bacteria*, 2(1s).
- Código Alimentario Argentino. Capítulo XVI. Correctivos y Coadyuvantes. Actualizado 01/2014. (2014).
- Connor, A. M., Luby, J. J., Hancock, J. F., Berkheimer, S., & Hanson, E. J. (2002). Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 893–898.
- Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O. R. (2010). *Fennema. Química de los alimentos*. (S. Damodaran, K. L. Parkin, & O. R. Fennema, Eds.) (3° edición.). Zaragoza, España.: Editorial Acribia S.A.

- Dávalos, A., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2005). Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. *Food Chemistry*, 93(2), 325–330.
- Durán Guerrero, E., Mejías, R. C., Marín, R. N., Bejarano, M. J. R., Dodero, M. C. R., & Barroso, C. G. (2011). Accelerated aging of a Sherry wine vinegar on an industrial scale employing microoxygenation and oak chips. *European Food Research and Technology*, 232(2), 241–254.
- Escobedo-Avellaneda, Z., Gutiérrez-Urbe, J., Valdez-Fragoso, A., Torres, J. A., & Welti-Chanes, J. (2014). Phytochemicals and antioxidant activity of juice, flavedo, albedo and comminuted orange. *Journal of Functional Foods*, 6(1), 470–481.
- Ferreira, M. M. (2006). *Estudio del proceso biotecnológico para la elaboración de una bebida alcohólica a partir de jugo de naranjas*. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Fugelsang, K., & Edwards, C. (2007). *Wine Microbiology. Practical Applications and Procedures* (2° edition.). Springer.
- Gardner, P. T., White, T. A. C., McPhail, D. B., & Duthie, G. G. (2000). The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*, 68(4), 471–474.
- Gorinstein, S., Huang, D., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Yamamoto, K., Soliva-Fortuny, R. S., Martín-Belloso, O., & Martínez Ayala, A. L., Trakhtenberg, S. (2006). Determination of naringin and hesperidin in citrus fruit by high-performance liquid chromatography. The antioxidant potential of citrus fruit. *Acta Chromatographica*, 17, 108–124.
- Gui-Fang, D., Xi, L., Xiang-Rong, X., Li-Li, G., Jie-Feng, X., & Hua-Bin, L. (2013). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. *Journal of Functional Foods*, 5, 260–266.
- Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A., & Cabaroğlu, T. (2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*, 91(2), 187–192.

- Lee, C. Y. (2013). Challenges in providing credible scientific evidence of health benefits of dietary polyphenols. *Journal of Functional Foods*, 5, 524–526.
- Liu, X., Li, J., & Chen, J. (2014). Advances in study of carotenoids in citrus fruit. En: K. Hayat (Ed.), *Citrus: Molecular Phylogeny, Antioxidant Properties and Medicinal Uses* (pp. 51–72). China: Nova Science Publishers.
- Llabé Pino, M. A. (2008). *Tratamientos postfermentativos del vinagre: conservación en botella, envejecimiento acelerado y eliminación del plomo*. Universidad Rovira i Virgili.
- Llaguno Marchena, C., & Polo, M. C. (1991). La composición química de los vinagres vínicos. En: C. Llaguno Marchena & M. C. Polo (Eds.), *El Vinagre de Vino* (pp. 105–132). Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Miller, N. J., & Rice-Evans, C. A. (1997). The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry*, 60(3), 331–337.
- Morales, M. L., Benitez, B., & Troncoso, A. M. (2004). Accelerated aging of wine vinegars with oak chips: evaluation of wood flavour compounds. *Food Chemistry*, 88(2), 305–315.
- Palacios, V., Valcárcel, M., Caro, I., & Pérez, L. (2002). Chemical and biochemical transformations during the industrial process of sherry vinegar aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(15), 4221–4225.
- Passaro Carvalho, C. P., & Londoño-Londoño, J. A. (2012). Industrialización de cítricos y valor agregado. En: L. F. Giraldo Garcés & C. P. Passaro Carvalho (Eds.), *Cítricos: Cultivo, Poscosecha e Industrialización* (pp. 307–342). Itagüí, Colombia.
- Peixoto Marques, F. P., Spinosa, W., Fernandes, K. F., de Souza Castro, C. F. & Caliari, M. (2010). Padrões de identidade e qualidade de fermentados acéticos comerciais de frutas e vegetais. *Food Science and Technology (Campinas)*, 30(1).

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152–159.
- Rodriguez, M., Sadler, G. D., Sims, C. A., & Braddock, R. J. (1991). Chemical changes during storage of an alcoholic juice beverage. *Journal of Food Science*, 56(2), 475–479.
- Sakanaka, S., & Ishihara, Y. (2008). Comparison of antioxidant properties of persimmon vinegar and some other commercial vinegars in radical-scavenging assays and on lipid oxidation in tuna homogenates. *Food Chemistry*, 107(2), 739–744.
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121–137.
- Saura-Calixto, F. (1998). Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4303–4306.
- Sdiri, S., Salvador, A., Farhat, I., Navarro, P., & Besada, C. (2014). Influence of postharvest handling on antioxidant compounds of Citrus fruits. En: K. Hayat (Ed.), *Citrus: Molecular Phylogeny, Antioxidant Properties and Medicinal Uses* (pp. 73–94). New York.
- Tesfaye, W., Morales, M. L., Benítez, B., García-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2004). Evolution of wine vinegar composition during accelerated aging with oak chips. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 239–245.
- Tesfaye, W., Morales, M. L., García-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2002). Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 12–21.

Verzelloni, E., Tagliazucchi, D., & Conte, a. (2007). Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. *Food Chemistry*, 105(2), 564–571.

Zapata, L. M. (2014). *Obtención de extracto de antocianinas a partir de arándanos para ser utilizado como antioxidante y colorante en la industria alimentaria*. Universitat Politècnica de València.

TERCERA

PARTE:

VINAGRE DE

ARANDANOS

Capítulo 5:

Acetificación de
sustrato alcohólico
de arándanos en
sistema
discontinuo.

5.1. Introducción

Los arándanos son frutos pertenecientes a la familia de las Ericáceas, del género *Vaccinium*. Tiene un sabor dulce y ligeramente ácido a la vez, con un 15% de azúcares aproximadamente en estado maduro (Zapata, 2014).

A diferencia de los cítricos, los arándanos maduros tienen una vida poscosecha muy corta. Tal es así que, a temperaturas de almacenamiento entre -0,5 y 0°C y 90-95% de humedad relativa (Kader, 2002; Nunes, 2008), su vida útil es de aproximadamente un mes. Esta condición, sumado a los elevados descartes que se han generado por diferentes motivos según se mencionó previamente (Introducción I.8), hizo necesario plantearse alternativas de industrialización para estas bayas.

Los arándanos son reconocidos por sus potenciales efectos beneficiosos para la salud, como la prevención de enfermedades cardiovasculares, neuronales, cáncer y diabetes, entre otras (Faria et al., 2005; Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández, Páez-Hernández, Rodríguez, & Galán-Vidal, 2009; Moldovan, David, Chisbora, & Cimpoi, 2012). Esto es debido a su alta concentración en antioxidantes naturales tales como ácido ascórbico, compuestos fenólicos y antocianinas (Sapers, Burgher, Phillips, & Jones, 1984; Prior et al., 1998; Nunes, 2008). En comparación con otras frutas y vegetales, tienen una capacidad antioxidante muy alta (Prior et al., 1998). De hecho, el Departamento de Agricultura de USA (USDA) lo describió como el fruto con el mayor valor antioxidante entre más de 40 frutas y vegetales evaluados (Arándanos Argentinos, 2012).

Su composición nutricional demuestra que se trata de un fruto con bajas calorías, bajo contenido en grasas y sodio, sin colesterol y ricos en fibras dietéticas y minerales como potasio, manganeso y magnesio (Tabla 5.1).

De acuerdo a lo previamente expuesto y teniendo en cuenta la elevada concentración de azúcares fermentables presente en estos frutos (10-15 %) se

consideró factible la obtención de vinagre de arándanos como alternativa a su industrialización.

Tabla 5.1. Composición nutricional del arándano (Pritts & Hancock, 1992; Nunes, 2008).

Constituyente	Cantidad por 100 g	Constituyente	Cantidad por 100 g
Agua	82-85 g	Zinc	0,11 mg
Calorías	55 kcal	Cobre	0,06 mg
Proteínas	0,7 g	Manganeso	0,27 mg
Grasas	0,37 g	Ácido ascórbico	13 mg
Carbohidratos	14 g	Tiamina	0,05 mg
Fibras	1,3 g	Riboflavina	0,05 mg
Calcio	6 mg	Niacina	0,35 mg
Hierro	0,16 mg	Ácido pantoténico	0,09 mg
Magnesio	4,7 mg	Vitamina B6	0,03 mg
Fósforo	10 mg	Ácido fólico	6,2 mg
Potasio	86 mg	Vitamina A	97 IU
Sodio	6 mg		

Tal como se realizó para la acetificación de sustrato alcohólico de naranja, en este capítulo se evaluó la influencia de factores externos como, caudal de aire (Q_a) y velocidad de agitación (V_{ag}) y se determinaron las condiciones experimentales que lograron la mayor velocidad de acetificación (r_A) del sustrato alcohólico de arándanos y el mayor rendimiento (R_{GK}) en sistema sumergido discontinuo. Adicionalmente, se analizaron los parámetros cinéticos involucrados en el proceso.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Proceso general de obtención de vinagre de arándanos

5.2.1.1. Fermentación alcohólica

La materia prima utilizada para la obtención de vinagre de arándanos fueron arándanos maduros pertenecientes al género *Vaccinium corymbosum* (Highbush o arándano alto) suministrados por productores del departamento Concordia.

Durante la primera etapa del proceso se desarrolló la fermentación alcohólica con el fin de obtener el sustrato adecuado para el posterior proceso de acetificación (Figura 5.1). Los arándanos se lavaron, escurrieron y trituraron con una miniprocadora de mano marca BRAUN, modelo MR 400 Plus (España), a fin de obtener una mezcla homogénea. Con el objeto de caracterizar la materia prima de origen, se procedió a la toma de muestras y se realizaron las siguientes determinaciones fisicoquímicas, por triplicado: pH, acidez total, azúcares reductores directos y totales y sólidos solubles (ver apartado 5.2.4. de “Técnicas analíticas”). En esta oportunidad también se determinaron antocianinas totales, fenoles totales y actividad antioxidante, sin embargo puesto que su análisis abarcó desde la materia prima hasta el período de maduración del vinagre, se consideró conveniente su tratamiento en un capítulo posterior (Capítulo 7: “Caracterización del vinagre de arándanos”).

La mezcla de arándanos triturados fue a continuación pesada y se agregó agua en una proporción fruto/agua de 1:2 kg/kg para evitar su gelificación. Se adicionó 0,5 g/L de fosfato diamónico ($\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$) como fuente de nitrógeno y 0,2 g/L de metabisulfito de potasio (KHSO_3) para disminuir la flora microbiana contaminante que pudiera tener efectos nocivos sobre la calidad del producto. Por último, se corrigió el contenido de sólidos solubles mediante el agregado de sacarosa comercial hasta 20-22 °Brix.

CAPITULO 5. Acetificación de sustrato alcohólico de arándanos en sistema discontinuo.

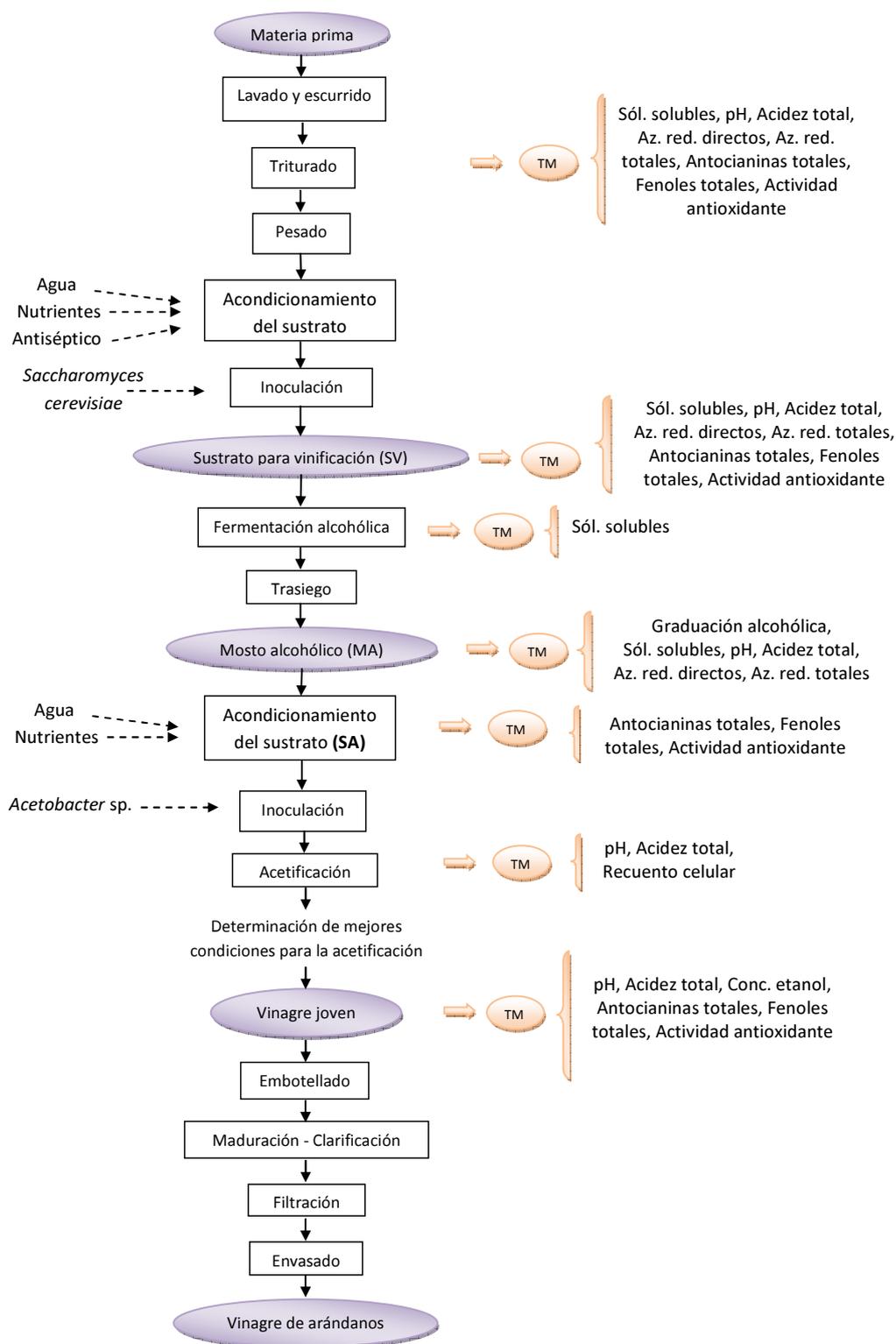


Figura 5.1. Diagrama de flujo de elaboración de vinagre de arándanos (TM: toma de muestras).

Este sustrato se inoculó con 0,4 g/L de un cultivo comercial activo de *Saccharomyces bayanus*, con lo cual se obtuvo el sustrato destinado a vinificación (SV). Se colocó en damajuanas de 10 L de capacidad para el desarrollo de la fermentación alcohólica en proceso discontinuo. La temperatura de fermentación elegida, entre 25 - 28°C (equivalente a vinificación en tinto), se seleccionó para favorecer una elevada extracción polifenólica y rápida producción de etanol (Aleixandre & Alvarez, 2003).

Del SV se tomó una muestra para cuantificar pH, acidez total, azúcares reductores directos y totales y sólidos solubles (ver apartado 5.2.4. de Técnicas analíticas). También se determinaron antocianinas totales, fenoles totales y actividad antioxidante, sin embargo, según fue aclarado con anterioridad, su tratamiento se realizará en el Capítulo 7 (“Caracterización del vinagre de arándanos”).

El avance de la fermentación alcohólica se controló midiendo diariamente la disminución de los sólidos solubles (Bamforth, 2007). Una vez que se observaron valores constantes de este parámetro, se consideró finalizada la fermentación, momento en el cual se procedió al trasiego. Paralelamente se verificó, mediante observaciones microscópicas, la ausencia de microorganismos contaminantes que hubieran podido competir por el sustrato durante la posterior acetificación. De esta manera se obtuvo el mosto alcohólico de arándanos (MA) en el que se determinó: pH, acidez total, azúcares reductores directos y totales, sólidos solubles y graduación alcohólica, (apartado 5.2.4. de “Técnicas analíticas”).

5.2.1.2. Acetificación del sustrato alcohólico de arándanos

Previo a la fermentación acética, MA se debió diluir hasta 6 % v/v etanol, ya que la graduación alcohólica obtenida fue de $12,9 \pm 0,1$ % v/v y a esta concentración, especialmente en sistemas batch, se podría dificultar el comienzo de la fermentación debido al efecto inhibitor del etanol sobre las bacterias acéticas (de Ory, Romero, & Cantero, 2002; Garrido-Vidal, Pizarro, & González-Sáiz, 2003). La dilución del mosto alcohólico de arándanos se realizó

con una solución acuosa de minerales y fuente nitrogenada de la siguiente composición: 0,8 g/L de KH_2PO_4 ; 0,35 g/L de K_2HPO_4 . 3 H_2O ; 1,5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (apartado 2.2.2.1), previamente esterilizada por calor húmedo a 121 °C durante 15 min, en autoclave VZ tipo Chamberland (Argentina).

El proceso de acetificación se desarrolló utilizando los cultivos de *Acetobacter* sp. aislados en el laboratorio (Capítulo 1, apartado 1.4.) y siguiendo el procedimiento efectuado para vinagre de naranja. Para ello, se descongelaron algunos criotubos conteniendo estas BAA, se inocularon en caldo RAE (1a, 2e) para su revitalización y crecimiento y se incubaron durante 48-72 horas a $30\pm 1^\circ\text{C}$ en estufa para cultivo bacteriológico FAETA (Argentina).

El cultivo obtenido en la etapa anterior se propagó mediante su inoculación al 10 % en 300 mL de una mezcla de MA diluido al 6 % v/v etanol y 10 g/L de ácido acético glacial. Este sistema se incubó a $30\pm 1^\circ\text{C}$ con inyección de aire hasta que se alcanzó una concentración bacteriana aproximada entre $3\text{-}5\times 10^8$ bacterias/mL (cultivo iniciador). Vale aclarar en este punto que, una vez que se obtuvo el primer vinagre de arándanos, la mezcla mencionada se realizó utilizando éste y no ácido acético glacial, en volumen necesario para lograr la concentración requerida.

El cultivo iniciador así obtenido se utilizó como inóculo del sustrato destinado a acetificar (SA), compuesto por MA diluido al 6 % v/v etanol y adicionado de un vinagre de arándanos previamente obtenido, en volumen suficiente para alcanzar una acidez total de 10 g/L de ácido acético. El proceso biooxidativo discontinuo de SA se realizó en el biorreactor de escala laboratorio (Figura 5.2) marca NEW BRÜNSWICK CIENTIFIC Co., modelo Bioflo 2000 (New Jersey, USA) descrito en el capítulo 2, apartado 2.2.2.3.



Figura 5.2. Biorreactor New Brünswick Cientific Co., Modelo Bioflo 2000, utilizado en las experiencias de acetificación de sustrato alcohólico de arándanos.

Las condiciones iniciales del sustrato, fijadas en cada tratamiento, fueron: volumen del sustrato: 2 L, concentración de alcohol: $5,9\pm 0,6$ % v/v, pH: $2,97\pm 0,07$ y acidez total (expresada como ácido acético): $10,8\pm 1,2$ g/L. La temperatura se mantuvo constante en 30 ± 1 °C durante todo el proceso.

La monitorización del proceso se realizó a través de muestras tomadas del fermentador cada 4-6 h, mediante determinaciones de pH, acidez total y recuento celular (apartado 5.2.4. de “Técnicas analíticas”). En este caso no fue posible la medida de la densidad óptica del cultivo ya que la coloración violeta/parda del sustrato impidió la determinación de la absorbancia a 540 nm en espectrofotómetro.

Se graficaron las curvas de cada parámetro en función del tiempo y, cuando se observó que la acidez total permanecía constante después de la etapa exponencial de crecimiento microbiano, se dio por finalizado el proceso

para evitar el consumo del ácido acético por parte de las BAA, debido al agotamiento del sustrato alcohólico (Introducción, apartado I.4.1).

Por último, se determinó la concentración de etanol remanente (apartado 5.2.4. de "Técnicas analíticas") en el producto obtenido (vinagre joven) en cada uno de los ensayos.

5.2.1.3. Envasado. Maduración. Clarificación. Filtración.

Los vinagres recién obtenidos (jóvenes) se envasaron en botellas de vidrio color caramelo ya que las antocianinas presentes en su composición son muy sensibles a la degradación por efecto de la luz, entre otros factores (Rein, 2005). Se almacenaron en lugar fresco, seco y oscuro para su maduración (o envejecimiento) y se dejaron clarificar espontáneamente. Sin embargo, en los casos en que persistía cierta turbidez (observada a simple vista), se agregó una suspensión de bentonita al 5% y posteriormente se filtró con filtro de 3 μm de porosidad a fin de obtener un producto límpido y transparente. Los vinagres clarificados se envasaron nuevamente en botellas de vidrio color caramelo, para continuar con la etapa de maduración.

5.2.2. Diseño experimental.

Con el fin de estudiar la influencia de los factores experimentales en la obtención de vinagre de arándanos, se realizó un diseño de experimentos a partir del cual se generó una superficie de respuesta por cada variable respuesta analizada. Nuevamente, las respuestas estudiadas fueron la velocidad de acetificación (r_A) y el rendimiento GK (R_{GK}), descritas en el capítulo 2, apartado 2.2.3.1., y los factores experimentales considerados fueron la velocidad de agitación (V_{ag}) y el caudal de aire (Q_a). El rango de análisis de cada factor se eligió en coincidencia con el utilizado en el estudio del vinagre de naranja, es decir, 400-800 rpm para V_{ag} y, 0,6-1,2 L/min (0,3-0,6 vvm) para Q_a . A continuación, se elaboró un diseño central compuesto, donde los puntos axiales del mismo se determinaron según la ecuación $(2^k)^{1/4}$, con k = número de

factores. En la tabla 5.2 se muestran las distintas combinaciones de niveles de los factores arrojadas en forma aleatoria por el software STATGRAPHICS Centurión XV.

Tabla 5.2. Diseño experimental de la etapa de acetificación discontinua de un sustrato alcohólico de arándanos, utilizando *Acetobacter* sp.

<i>Factores originales</i>		<i>Factores codificados</i>	
Velocidad de agitación (rpm)	Caudal de aire (L/min)	Velocidad de agitación	Caudal de aire
400	0,60 (0,30 vvm)	-1	-1
400	1,20 (0,60 vvm)	-1	+1
800	0,60 (0,30 vvm)	+1	-1
800	1,20 (0,60 vvm)	+1	+1
883	0,90 (0,45 vvm)	1,414	0
317	0,90 (0,45 vvm)	-1,414	0
600	1,32 (0,66 vvm)	0	1,414
600	0,48 (0,24 vvm)	0	-1,414
600	0,90 (0,45 vvm)	0	0
600	0,90 (0,45 vvm)	0	0
600	0,90 (0,45 vvm)	0	0
600	0,90 (0,45 vvm)	0	0

Realizadas las experiencias se buscó, a través de la metodología de superficie de respuesta (MRS), la combinación de niveles de los factores que maximizaron cada respuesta en forma individual. Mientras que, para determinar la combinación de los factores experimentales cuyo resultado da los máximos en ambas repuestas simultáneamente, se empleó la función Optimización de Respuestas Múltiples (Deseabilidad).

Una vez establecidas las condiciones experimentales que permitieron obtener el vinagre de arándanos con el mayor rendimiento y en el menor tiempo de operación, se realizó el proceso oxidativo en dichas condiciones, por triplicado, y el producto final se reservó para su posterior caracterización (Capítulo 7).

5.2.3. Determinación de parámetros cinéticos.

5.2.3.1. Relación entre velocidad de crecimiento bacteriano y velocidad de acetificación.

Se evaluó la relación entre la velocidad volumétrica de crecimiento microbiano (r_x) y la velocidad de acetificación (r_A) mediante análisis de regresión simple. Como se ha mencionado en el capítulo 2, apartado 2.2.4.1., para un sistema batch, r_x se calcula como la variación de la concentración celular o biomasa (X) en función del tiempo (t), utilizando la ecuación 2.7, es decir:

$$r_x = \frac{(X_2 - X_1)}{(t_2 - t_1)}$$

Para calcular X se empleó la técnica de estimación de biomasa (apartado 5.2.4. de “Técnicas analíticas”), con la cual se obtuvieron pares de datos de peso seco de biomasa en función del recuento celular. Mediante representación gráfica se pudo establecer una ecuación para el cálculo de X .

5.2.3.2. Velocidad específica máxima de crecimiento bacteriano (μ_M).

Teniendo en cuenta las consideraciones enunciadas en el capítulo 2, apartado 2.2.4.2, para el estudio de este parámetro en el proceso de vinagre de naranja, se calculó μ_M mediante la ecuación 2.10 allí mencionada:

$$\ln X = \ln X_o + \mu_M \times t$$

Donde, X_o es la concentración de biomasa al inicio de la fase exponencial y t , el tiempo transcurrido en esta fase.

5.2.4. Técnicas analíticas

pH: método potenciométrico, con peachímetro BOECO modelo BT-500 (Germany) (AOAC, 2005, 18th Ed., Official Method 960.19).

Acidez total: mediante titulación potenciométrica con solución de hidróxido de sodio (NaOH) (AOAC, 2005, 18th Ed., Official Method 930.35). Para la caracterización de la materia prima, se expresó como g de ácido cítrico anhidro por 100 g de muestra, mientras que para SV y MA se expresó como g de ácido cítrico anhidro por 100 mL de muestra. En el caso de las muestras tomadas durante el proceso de acetificación, se expresó como g/L de ácido acético (se asume que toda la acidez del medio se debe a este ácido).

Azúcares reductores directos: técnica volumétrica de Lane-Eynon (AOAC, 1995, 16th Ed., Official Method 923.09). Los resultados se expresaron como g por 100 mL de muestra.

Azúcares reductores totales: fueron determinados con la misma técnica usada para los azúcares reductores directos, previa hidrólisis ácida de la muestra. Los resultados se expresaron como g por 100 mL de muestra.

Sólidos solubles: método refractométrico, con refractómetro termocompensable ATAGO modelo NAR 1T (Japón). Los resultados se expresaron en °Brix (corregidos por temperatura y acidez).

Graduación alcohólica: destilación del sustrato alcohólico alcalinizado con una solución de hidróxido de calcio y posterior determinación del grado alcohólico en el destilado por areometría, expresado como % v/v (International Organisation of Vine and Wine, 2009).

Recuento celular (RC): en microscopio óptico LEICA modelo DME (New York, USA), con cámara de Petroff-Hauser de 0,02 μ L. El resultado se expresó como número de bacterias/mL.

Concentración de etanol remanente: fue analizada mediante el kit enzimático de Boehringer Mannheim/R-Biopharm, Cat. N° 10176290035, expresada como % v/v.

Concentración celular (X): se determinó experimentalmente la concentración de materia seca en varias muestras tomadas durante el proceso de acetificación, con valores conocidos de recuentos celulares. Estas muestras fueron centrifugadas cuatro veces a 4000 rpm/20 min en centrífuga BOECO, modelo C-28 (Germany) y descartado el sobrenadante. Una última centrifugación del pellet obtenido, resuspendido con solución fisiológica, se realizó a 14000 rpm/15 min en centrífuga LABNET, modelo Spectrafuge 16 M (USA). Se descartó el sobrenadante y el criotubo, previamente pesado, con el sedimento, se colocó en estufa de secado DALVO Instrumentos, modelo CMR1I (Argentina), a 105 °C (Krusong, Yaiyen, & Pornpukdeewatana, 2014) hasta peso constante. Esta medida se realizó en una balanza analítica BOECO modelo BPB31 (Germany) de 210 g de capacidad y d=0,1 mg. De esta forma, se obtuvieron pares de datos de materia seca de biomasa - recuento celular. Mediante su representación gráfica se pudo establecer una ecuación para el cálculo de X. La materia seca determinada, es equivalente a la concentración celular y fue expresada como g/L de vinagre.

5.2.5. Tratamiento estadístico

5.2.5.1. Obtención de las mejores condiciones de acetificación.

La determinación de las condiciones experimentales, Vag y Qa, que maximizaron cada variable respuesta individualmente, se realizó siguiendo la metodología de superficie de respuesta aplicado a un diseño central compuesto y rotatable con software STATGRAPHICS Centurión XV (Gutiérrez Pulido & Vara Salazar, 2008). Mediante análisis de varianza (ANOVA) se analizaron los factores significativos e interacciones en cada respuesta. Se consideró que

hubo influencia estadística significativa para un factor determinado cuando $p < 0,05$.

Por otra parte, dado que en la presente investigación se analizaron dos variables respuestas, la mejor combinación de factores que maximizaron estas últimas en forma simultánea, se determinó utilizando la función Deseabilidad del mencionado software, que optimiza variables respuestas múltiples.

Los datos experimentales se ajustaron a una ecuación polinómica que describió las relaciones entre cada variable respuesta y los factores estudiados, mediante el método de regresión múltiple. Además, para una mejor visualización de los datos experimentales, se obtuvieron gráficos de superficie de respuesta y de contorno.

Se verificó la idoneidad del modelo propuesto con el diseño experimental, mediante la verificación de supuestos a través de las pruebas de Kolmogorov-Smirnov, estadístico W de Shapiro-Wilk y Chi-Cuadrado. Además, la normalidad e independencia de los residuos se comprobó mediante la prueba de Durbin Watson (Capítulo 2, apartado 2.2.6.2).

5.2.5.2. Análisis de regresión

Este análisis estadístico se utilizó para evaluar la relación entre la velocidad volumétrica de crecimiento microbiano (r_x) y la velocidad de acetificación (r_A) durante la obtención de vinagre de arándanos, tal como se efectuó para su análogo de naranjas, en el Capítulo 2.

Para establecer la bondad con que el modelo explicó la relación entre ambas variables, se evaluaron la significancia de la regresión y el coeficiente de correlación (Capítulo 2, apartado 2.2.6.3).

5.3. Resultados y Discusión

5.3.1. Caracterización de la materia prima, sustrato destinado a vinificación y mosto alcohólico de arándanos.

Los resultados de la caracterización de los arándanos triturados destinados a la obtención de vinagre de arándanos se muestran en la Tabla 5.3. Además, se presentan los datos correspondientes a su contenido en SV y en MA.

Tabla 5.3. Caracterización fisicoquímica de la materia prima y sustratos, en diferentes etapas de la producción del mosto alcohólico de arándanos.

	pH	Acidez total (% ác. cítrico)	Azúcares reductores directos (%)	Azúcares reductores totales (%)	Sólidos solubles (°Brix)	Graduación alcohólica (% v/v)
Fruta	3,24±0,01 ^a	0,5±0,0 ^b	9,0±0,7 ^b	10,2±0,7 ^b	13,1±0,1 ^b	----
SV	3,50±0,02 ^c	0,3±0,0 ^a	17,3±1,5 ^c	18,3±0,0 ^c	20,7±0,3 ^c	----
MA	3,31±0,01 ^b	0,3±0,0 ^a	0,4±0,0 ^a	0,5±0,0 ^a	6,4±0,0 ^a	12,9±0,1

SV: sustrato destinado a vinificación; MA: mosto alcohólico de arándanos. Letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las medias de los productos.

Como se puede observar en la tabla 5.3, la concentración de azúcares reductores totales en la fruta fue levemente superior a la de azúcares reductores directos, lo que permitió inferir que la sacarosa se encontraba presente en una concentración minoritaria, tal como fue informado por Wang et al. (2008). Estos investigadores determinaron que los azúcares mayoritarios en arándanos de la variedad *Vaccinium corymbosum* L. son glucosa y fructosa y su concentración representa el 10,9%. La diferencia entre este valor y el hallado en el presente trabajo (9,0±0,7%) se puede atribuir al sistema utilizado para su cuantificación, que en el primer caso fue mediante cromatografía gaseosa, como así también a distintas características agrícolas ya que los

cultivos pertenecían a la ciudad de New Jersey (EEUU).

La incorporación de agua y sacarosa para la obtención del SV, provocó un aumento del pH, disminución de acidez total y elevación de azúcares reductores directos y totales, como así también de los sólidos solubles, respecto de los existentes en la materia prima de origen.

Durante la fermentación alcohólica, se observó la disminución en la concentración de azúcares reductores directos y totales y de los sólidos solubles, debido al metabolismo fermentativo ya que las levaduras del género *Saccharomyces* utilizaron el azúcar para transformarlo en alcohol y CO₂ (Aleixandre & Alvarez, 2003). Así se obtuvo el producto fermentado (MA) con un $12,9 \pm 0,1$ % v/v etanol, que luego fue diluido hasta un 6 % v/v para obtener SA.

5.3.2. Determinación de las mejores condiciones de acetificación.

De acuerdo a la metodología propuesta, se llevaron a cabo los distintos ensayos de acetificación en el orden aleatorio arrojado por el software estadístico empleado para la confección del diseño. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.4, de forma ordenada para facilitar su lectura.

En un primer análisis de los resultados se puede notar que en los niveles extremos (-1 y +1), r_A aumentó con el incremento en el caudal de aire a bajas velocidades de agitación (1,17 g/L/h a 400 rpm y 1,20 L/min; 0,99 g/L/h a 400 rpm y 0,60 L/min), mientras que el efecto opuesto se produjo a esos caudales de aire cuando se duplicó la velocidad de agitación (1,41 g/L/h a 800 rpm y 1,20 L/min; 1,52 g/L/h a 800 rpm y 0,6 L/min). En ambos casos se observó una aparente disminución en R_{GK} cuando se incrementó el caudal de aire.

Tabla 5.4. Respuestas obtenidas en el diseño experimental (MSR) de la acetificación batch de un sustrato alcohólico de arándanos con *Acetobacter* sp.

Velocidad de agitación [rpm]	Caudal de aire [L/min]	Velocidad de acetificación [g/L/h]	Rendimiento GK [%]
317	0,90 (0,45 vvm)	0,60	87,07
400	0,60 (0,30 vvm)	0,99	83,33
400	1,20 (0,60 vvm)	1,17	73,15
600	0,48 (0,24 vvm)	1,26	83,96
600	0,90 (0,45 vvm)	1,51	81,93
600	0,90 (0,45 vvm)	1,57	87,42
600	0,90 (0,45 vvm)	1,31	82,50
600	0,90 (0,45 vvm)	1,55	82,48
600	1,32 (0,66 vvm)	1,64	80,42
800	0,60 (0,30 vvm)	1,52	86,62
800	1,20 (0,60 vvm)	1,41	79,54
883	0,90 (0,45 vvm)	1,68	86,06

El rango de valores de R_{GK} determinados varió entre 73,15 y 87,42 %, lo que indica que se produjo pérdida de componentes volátiles (etanol, acetaldehído, ácido acético) durante el proceso oxidativo (Nieto et al., 1993; Fregapane, Nieto, & Salvador, 1999; Rubio-Fernández, 2003).

El diseño experimental se analizó con la MSR y se verificó la idoneidad del modelo propuesto, según se detalló en la metodología.

5.3.2.1. Velocidad de acetificación

La ecuación de r_A obtenida con la MSR fue la siguiente:

$$r_A = -2,30 + 7,60 \cdot 10^{-3} \times V_{ag} + 2,05 \times Q_a - 4,23 \cdot 10^{-6} \times V_{ag}^2 - 1,21 \cdot 10^{-3} \times V_{ag} \times Q_a - 0,55 \times Q_a^2 \quad (5.1)$$

El análisis de varianza indicó que el factor velocidad de agitación, en sus componentes lineal (V_{ag}) y cuadrática (V_{ag}^2), tuvieron efecto significativo sobre r_A ($p < 0,05$), mientras que el caudal de aire (Q_a) presentó influencia significativa con un nivel de confianza del 90 % en la región experimental ensayada. En la ecuación 5.1 se expresan todos los términos correspondientes a los factores, hayan resultado significativos o no.

Dado que el p-valor para la falta de ajuste fue mayor que 0,05 y el estadístico R^2 resultó 84,78 %, este modelo parecería ser adecuado para describir la variabilidad de r_A en función de V_{ag} y de Q_a .

A partir de la ecuación 5.1 se estudió la influencia de los factores sobre la variable respuesta, para lo cual se elaboró un gráfico de superficie de respuesta (Figura 5.3).

En general, los mayores valores de r_A se obtuvieron a mayores niveles de Q_a para una misma V_{ag} , hasta valores cercanos a 700 rpm. Sin embargo, posteriores incrementos en este factor produjeron una disminución en r_A a niveles de Q_a mayores o iguales a 1,2 L/min, mientras que no se observó variación en r_A a menores valores de Q_a .

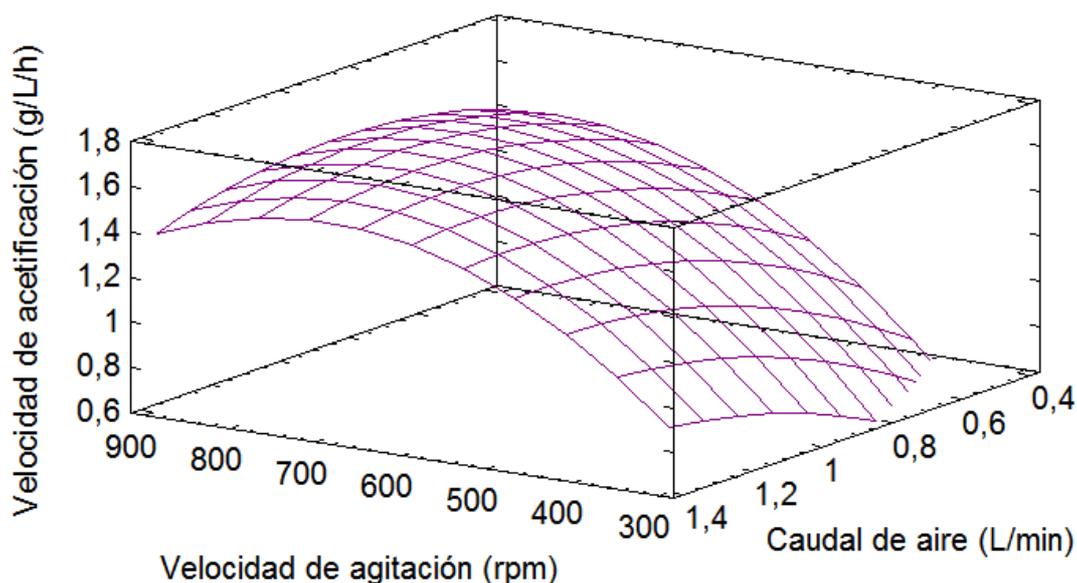


Figura 5.3. Superficie de respuesta estimada para velocidad de acetificación durante la producción de vinagre de arándanos.

Como se puede apreciar, nuevamente en este caso se lograron las mayores velocidades de acetificación cuanto más pequeñas fueron las burbujas de aire, provenientes de mayores velocidades de agitación. Tal como se mencionó previamente, de esta forma se pudo mejorar el $k_L a$ y con ello una mejor transferencia de oxígeno a las células con el consiguiente incremento en su velocidad específica de crecimiento.

La disminución en r_A a elevados niveles de los factores Q_a y V_{ag} podría deberse al efecto de inhibición sobre el crecimiento de las BAA causado por un exceso de oxígeno, según se explicó previamente para vinagre de naranja (capítulo 2, apartado 2.3.3.1.).

Para la determinación de los niveles de los factores que maximizaron la r_A , se utilizó la función Optimización de Respuestas del software estadístico. A este punto le correspondió una r_A de 1,62 g/L/h y la combinación de factores que arrojó este resultado fue: 749 rpm y 1,04 L/min (0,52 vvm). Para una mejor localización de este punto se presenta la figura 5.4.

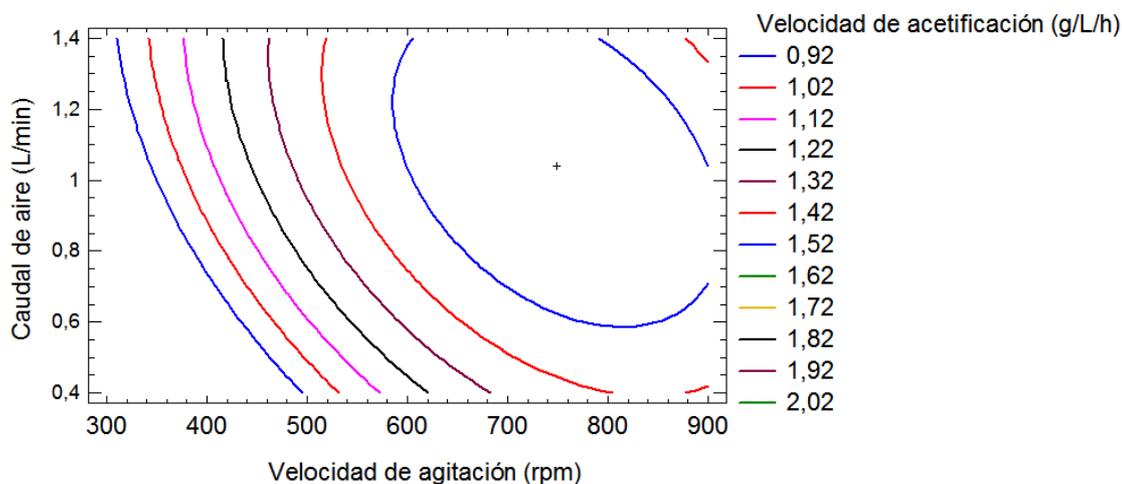


Figura 5.4. Región de la superficie de respuesta donde se maximiza la velocidad de acetificación para vinagre de arándanos.

5.3.2.2. Rendimiento GK

La ecuación obtenida para el rendimiento GK con la MSR fue la siguiente:

$$R_{GK} = 53,69 + 0,07 \times V_{ag} + 22,99 \times Q_a - 5,78 \cdot 10^{-5} \times V_{ag}^2 + 0,01 \times V_{ag} \times Q_a - 22,23 \times Q_a^2 \quad (5.2)$$

El análisis de varianza indicó que el factor V_{ag} tuvo un efecto significativo en el rendimiento GK ($p < 0,05$). En la ecuación 5.2 se expresan todos los términos correspondientes a los factores, hayan resultado significativos o no.

Dado que el p-valor para la falta de ajuste fue mayor que 0,05 y el estadístico R^2 resultó 81,11 %, este modelo parecería ser adecuado para la descripción de la variabilidad de los datos de R_{GK} en función de la velocidad de agitación y el caudal de aire.

A partir de la ecuación 5.2, se estudió la influencia de los factores sobre R_{GK} , para lo que se elaboró un gráfico de superficie de respuesta (Figura 5.5).

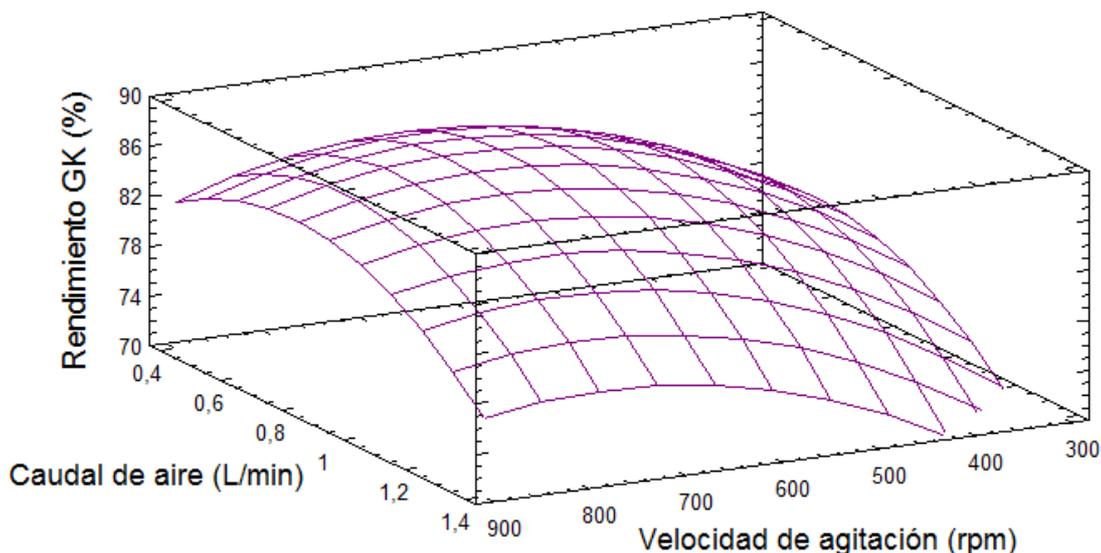


Figura 5.5. Superficie de respuesta estimada para rendimiento GK durante la producción de vinagre de arándanos.

En general se observa que los mayores rendimientos se alcanzaron cuanto menor fue el nivel de Q_a y cuanto mayor fue V_{ag} . Sin embargo, incrementos en este factor superiores a aproximadamente 700 rpm, produjeron un leve descenso en R_{GK} , probablemente debido a la evaporación de alguno de los componentes volátiles presentes en el sustrato.

A través de la función estadística de optimización de respuestas, se determinaron los niveles de los factores experimentales estudiados, 701 rpm y 0,72 L/min (0,36 vvm), como aquellos que maximizaron el rendimiento GK para los cuales correspondió un R_{GK} de 87,12 %.

En la figura 5.6 se representa la combinación de los niveles de los factores, que maximiza el rendimiento GK sobre la región indicada.

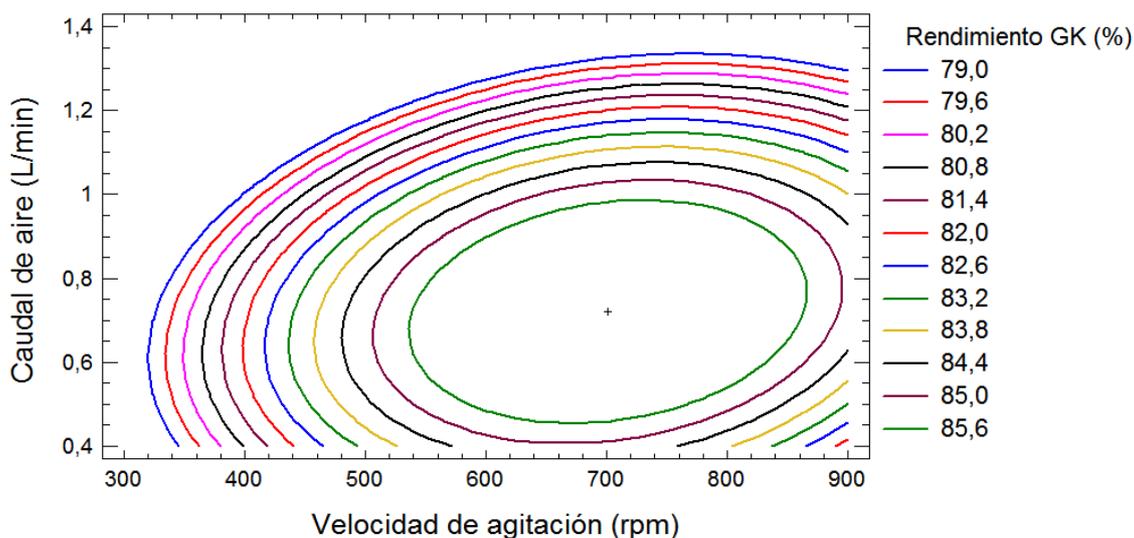


Figura 5.6. Región de la superficie de respuesta donde se maximiza el rendimiento GK para vinagre de arándanos.

5.3.2.3. Combinación de factores que optimizan ambas respuestas.

La combinación de los factores experimentales que simultáneamente optimizó ambas respuestas analizadas, se determinó mediante la función “deseabilidad” del software estadístico utilizado. La combinación de factores que hace máxima esa función (deseabilidad=0,97) fue: 677 rpm y 0,76 L/min (0,38 vvm) y en estas condiciones correspondió una $r_A = 1,53$ g/L y un $R_{GK} = 87,04$ %. Para una mejor visualización, se representa la gráfica de contornos superpuestos en la Figura 5.7.

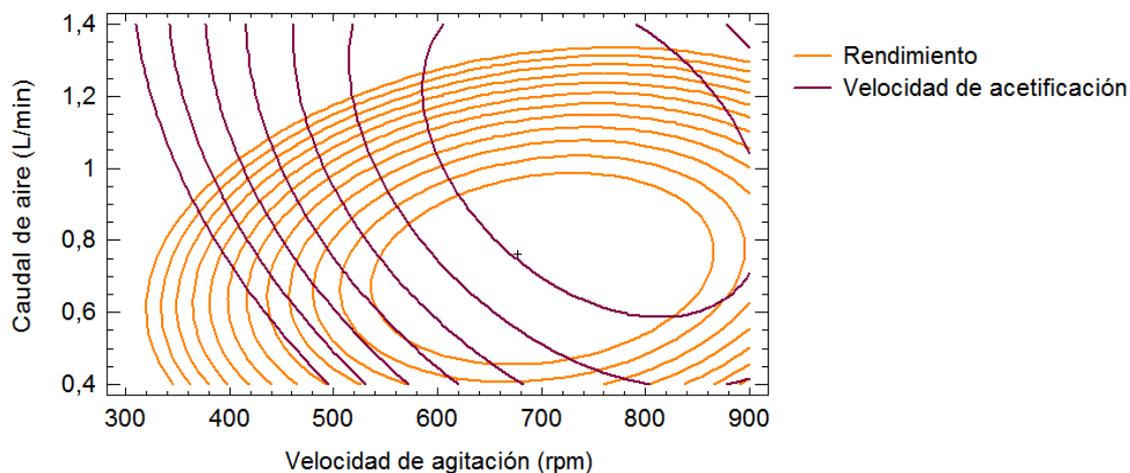


Figura 5.7. Región de la superficie de respuesta donde se maximizan ambas repuestas para vinagre de arándanos (gráfico de contornos superpuestos).

En este punto, se puede hacer notar la similitud de esta combinación de factores, con la determinada para la acetificación de mosto alcohólico de naranja: 700 rpm y 0,71 L/min (Capítulo 2, apartado 2.3.3.3). No obstante, la diferencia principal se encontró en el valor de una de las variables respuesta. Concretamente, la velocidad global de acetificación durante la elaboración de vinagre de arándanos resultó inferior a la alcanzada durante la correspondiente a vinagre de naranja (2,28 g/L/h). Teniendo en cuenta la expresión de cálculo de la velocidad de acetificación (Capítulo 1, apartado 1.2.4.) y considerando que la diferencia de acidez total final e inicial se mantuvo relativamente constante en todos los tratamientos, se deduce que el factor que afectó el valor de r_A fue el tiempo de cada tratamiento, dentro del cual se incluye la fase lag.

5.3.3. Desarrollo del proceso de acetificación optimizado.

Teniendo en cuenta las condiciones iniciales del sustrato utilizadas para cada proceso de acetificación (apartado 5.2.1.2.), se desarrollaron tres procesos oxidativos a 30 °C y de acuerdo a la combinación de factores de V_{ag}

y Q_a que mejoraron las respuestas del proceso, es decir, a 677 rpm y 0,76 L/min de aire (0,38 vvm). La velocidad de acetificación global calculada fue de $1,52 \pm 0,06$ g/L/h y el rendimiento GK del vinagre de arándanos, $85,16 \pm 2,45$ %, ambos valores muy próximos a los predichos de acuerdo al modelo (1,53 g/L/h y 87,04 %, respectivamente).

Durante el transcurso de la biofermentación en esas condiciones, se observó una fase lag de aproximadamente 9-10 horas (Figura 5.8), notablemente superior a la determinada en la acetificación con mosto alcohólico de naranja, cuya duración fue de 3-4 horas. De esta manera, los menores valores de r_A calculados son perfectamente coherentes ya que, como se ha mencionado, este parámetro está directamente afectado por la extensión de la fase lag.

La fase de crecimiento exponencial, representada por el logaritmo natural del recuento bacteriano, y el aumento en la acidez total, indicativo del incremento en la producción de ácido acético, ambos en función del tiempo (Figura 5.8), se desarrollaron en forma prácticamente paralela, característico de un metabolito asociado al crecimiento tal como se observó durante la acetificación de mosto alcohólico de naranja.

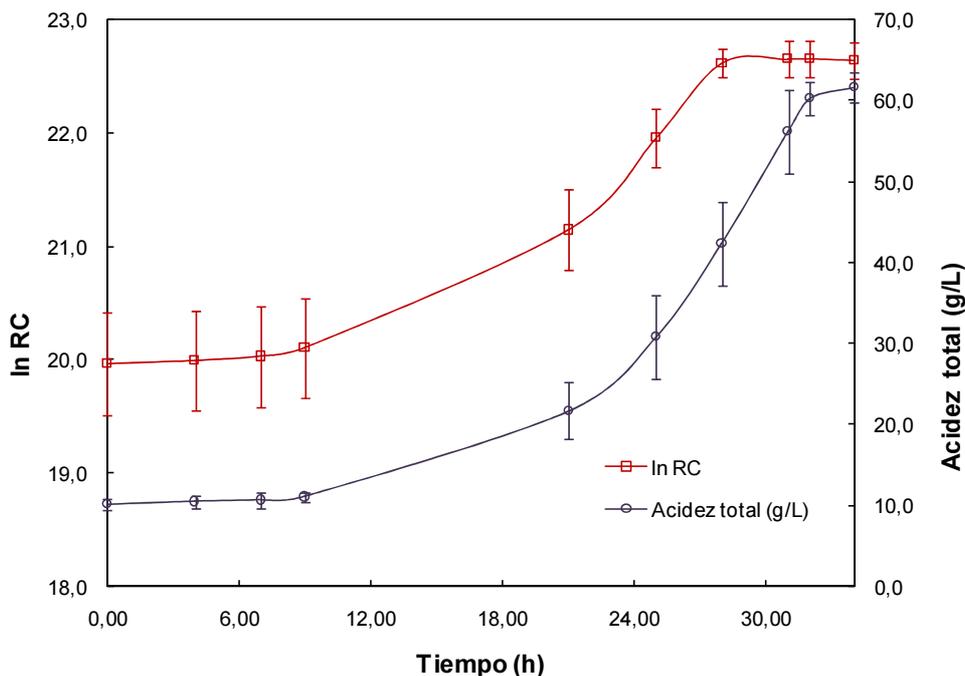


Figura 5.8. Acetificación de mosto alcohólico de arándanos en sistema discontinuo según parámetros optimizados (677 rpm/0,38 vvm): media de acidez total (g/L ácido acético) y media de ln RC (ln de recuento bacteriano) en función del tiempo de proceso.

Los vinagres obtenidos en estos ensayos se envasaron en botellas de vidrio color caramelo, se almacenaron en ambiente de laboratorio a temperaturas entre 20 - 25 °C y fueron utilizados luego, para su caracterización (Capítulo 7).

5.3.4. Determinación de parámetros cinéticos.

5.3.4.1. Relación entre velocidad de crecimiento microbiano (r_X) y velocidad de acetificación (r_A).

Mediante la representación gráfica de los datos de peso seco de biomasa vs. recuento celular (Figura 5.9), se determinó una ecuación (5.3) de tipo lineal ($R^2 = 0,967$) para el cálculo de las concentraciones iniciales y finales de biomasa (X) en cada ensayo.

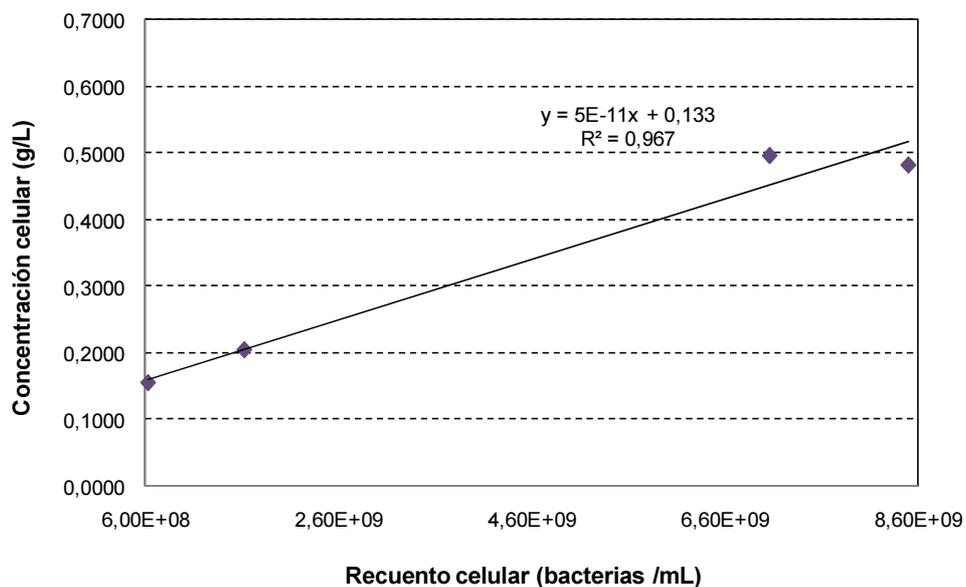


Figura 5.9. Concentración celular vs. recuento celular (RC) de *Acetobacter* sp. durante acetificación de sustrato alcohólico de arándanos.

$$X = 5 \cdot 10^{-11} \times RC + 0,133 \quad (5.3)$$

Con estos datos, a partir de la expresión (2.7) indicada en el capítulo 2, se determinó la velocidad de crecimiento celular, r_x , cuyos resultados se presentan en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5. Parámetros cinéticos de la acetificación de un sustrato alcohólico de arándanos, según diseño de MSR.

Vag [rpm]	Qa [L/min]	r_A [g/L/h]	r_X [g/L/h]	μ_M [h⁻¹]
317	0,90 (0,45 vvm)	0,60	0,003	0,012
400	0,60 (0,30 vvm)	0,99	0,006	0,023
400	1,20 (0,60 vvm)	1,17	0,012	0,043
600	0,48 (0,24 vvm)	1,12	0,010	0,043
600	0,90 (0,45 vvm)	1,51	0,013	0,048
600	0,90 (0,45 vvm)	1,57	0,020	0,064
600	0,90 (0,45 vvm)	1,31	0,015	0,050
600	0,90 (0,45 vvm)	1,55	0,017	0,058
600	1,32 (0,66 vvm)	1,64	0,022	0,062
800	0,60 (0,30 vvm)	1,52	0,016	0,068
800	1,20 (0,60 vvm)	1,41	0,017	0,054
883	0,90 (0,45 vvm)	1,68	0,015	0,042

El análisis de regresión simple entre la velocidad de crecimiento microbiano (r_X) y la velocidad de acetificación (r_A) indicó que existe una elevada correlación lineal entre ambas variables ($r=0,9$). El p-valor del ANOVA fue de 0,0001, por lo que hubo una relación estadísticamente significativa entre r_A y r_X con un nivel de confianza del 95,0% y el estadístico R^2 indicó que el modelo así ajustado explica el 81,07% de la variabilidad en r_A . En la figura 5.10 se muestra el gráfico del modelo ajustado.

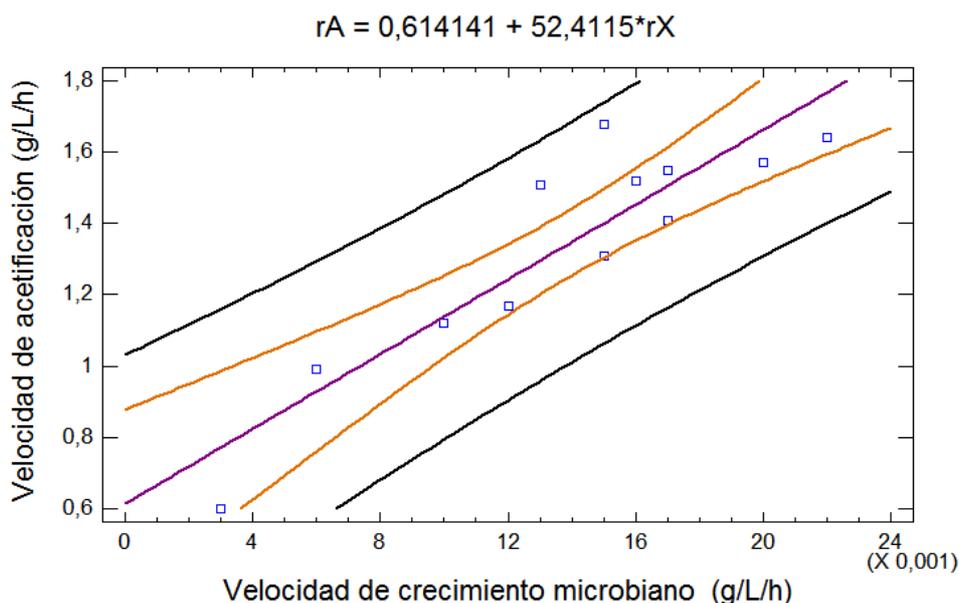


Figura 5.10. Velocidad de crecimiento microbiano (r_X) vs. velocidad de acetificación (r_A) para acetificación de sustrato alcohólico de arándanos.

La ecuación del modelo ajustado (5.4) resultó:

$$r_A = 0,614141 + 52,4115 \times r_X \quad (5.4)$$

De esta manera, se comprueba que un aumento en la velocidad de crecimiento bacteriano generó un incremento en la velocidad de acetificación, resultados que coinciden con aquellos obtenidos en la acetificación de mosto alcohólico de naranja.

5.3.4.2. Velocidad específica máxima de crecimiento bacteriano (μ_M).

Al igual que las μ_M calculadas en el proceso de vinagre de naranja, los menores valores se obtuvieron a las velocidades de agitación más bajas (317 y 400 rpm) (Tabla 5.4), con lo que nuevamente se corroboró la estrecha relación

entre la velocidad de transferencia de oxígeno al cultivo y la velocidad de crecimiento microbiano. No obstante, los valores de μ_M determinados en cada ensayo del diseño de acetificación de mosto de arándanos (0,012 a 0,068 h⁻¹) resultaron, en su mayoría, inferiores a los calculadas en las mismas condiciones para vinagre de naranja (0,053-0,192 h⁻¹; capítulo 2, tabla 2.5).

Puesto que μ_M resulta afectada cuando se produce algún tipo de inhibición no competitiva durante el proceso biológico (Ertola, Yantorno, & Mignone, 1994), podría pensarse que algún componente existente en la materia prima, en este caso arándanos, o algún producto metabólico generado por los microorganismos durante la fermentación alcohólica o la acetificación, podrían haber contribuido a disminuir los valores de μ_M respecto de los hallados para vinagre de naranja. Para intentar explicar esta diferencia, es conveniente recurrir al análisis de la composición química de las materias primas empleadas en cada producto.

Los compuestos fenólicos de las bayas en general poseen actividades biológicas interesantes, entre las que se encuentra su actividad antimicrobiana. Se han informado numerosos estudios referidos al efecto de inhibición que aquellos produjeron especialmente sobre patógenos en humanos (R. Puupponen-Pimiä et al., 2001; Riitta Puupponen-Pimiä et al., 2005; Burdulis et al., 2009; Cisowska, Wojnicz, & Hendrich, 2011; Kurek, Grudniak, Krackiewicz-Dowjat, & Wolska, 2011). En algunos casos se sugirió que esos efectos no se debían sólo a compuestos fenólicos simples sino a polímeros fenólicos complejos como los taninos, bien elagitaninos o proantocianidinas, y que la actividad antimicrobiana de los extractos era un efecto sinérgico de varios compuestos fenólicos, muchos de ellos no identificados. Además, otros compuestos bioactivos de los extractos de plantas, solos o en combinación con fenoles, podrían ser responsables de la actividad antimicrobiana (R. Puupponen-Pimiä et al., 2001). Se han documentado varias referencias acerca del carácter bactericida o bacteriostático de los taninos sobre bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (Chung, Wong, Wei, Huang, & Lin, 1998; Kurek et al., 2011).

A partir de ocho tipos de bayas diferentes, Puupponen-Pimiä et al. (2005) aislaron y purificaron las fracciones de elagitanino, ácido elágico y ácido gálico para evaluar su actividad antimicrobiana sobre diferentes patógenos intestinales en humanos. De esta experiencia pudieron determinar que la fracción de elagitanino presentó una fuerte inhibición sobre *Staphylococcus aureus* mientras que *Salmonella sv. typhimurium* fue fuertemente inhibida con la fracción de ácido gálico. Además, Wen et al. (2003) encontraron que los ácidos hidroxicinámicos (también importantes en los arándanos) fueron bactericidas sobre *Listeria monocytogenes* a pH 4-5 y bacteriostáticos a mayores valores.

Los mecanismos propuestos para explicar la actividad antimicrobiana de los taninos incluyen la desestabilización de la membrana citoplasmática, permeabilización de la membrana plasmática, inhibición de enzimas microbianas extracelulares, carencia de sustratos requeridos para el crecimiento microbiano, acción directa sobre el metabolismo microbiano a través de la inhibición de la fosforilación oxidativa, quelación de iones metálicos (Riitta Puupponen-Pimiä et al., 2005; Burdulis et al., 2009).

Se ha reportado un trabajo en el que se evaluó el comportamiento de *Acetobacter aceti* en cultivo batch sobre un medio con 5000 mg/L de etanol (aproximadamente 6,25 % v/v) con agregados de diferentes concentraciones de fenoles (Hill & Daugulis, 1999). Allí se comprobó que estos compuestos inhibieron el crecimiento bacteriano y como consecuencia, se observaron reducciones en la velocidad específica de crecimiento y el rendimiento en biomasa. Este efecto resultó aún mayor a medida que se incrementó la concentración fenólica.

Si bien no se han encontrado trabajos referidos a la actividad antimicrobiana de bayas y especialmente de arándanos sobre BAA, se podría pensar que las menores μ_M podrían haberse producido debido a un efecto bacteriostático de algún componente fenólico presente en esta materia prima. Por este motivo, se procedió a investigar la presencia de algunos de ellos como ácido elágico y gálico que, según se mencionó previamente, fueron los

componentes que se encontraron con actividad antimicrobiana, tanto en arándanos como en naranjas.

En diferentes cultivos de arándanos de la variedad *Vaccinium corymbosum* se han informado concentraciones entre 0,75-6,65 mg de ácido elágico/100 g fruta y 1,95-4,76 mg ácido gálico/100 g fruta. Además, los derivados del ácido hidroxicinámico presentaron los siguientes rangos de concentración: ácido cafeico: 3,00-3,33 mg/100 g fruta, ácido p-cumárico: 2,40-7,15 mg/100 g fruta y ácido ferúlico: 3,45-4,16 mg/100 g fruta (Sellappan, Akoh, & Krewer, 2002).

Por otro lado, en jugos de naranjas, el ácido fenólico más importante es el hidroxicinámico y sus derivados: ferúlico, p-cumárico, sinápico, cafeico y clorogénico, mientras que los ácidos hidroxibenzoicos, gálico y protocatecuico, están presentes en bajas cantidades (Sdiri, Salvador, Farhat, Navarro, & Besada, 2014). Específicamente, Kelebek et al. (2009) determinaron la siguiente composición para jugo de naranjas: $3,33 \pm 0,22$ mg/L de ácido gálico, $5,66 \pm 0,38$ mg/L de ácido cafeico, $3,52 \pm 0,24$ mg/L de ácido p-cumárico y $24,06 \pm 1,62$ mg/L de ácido ferúlico.

Del análisis de las composiciones de ambos frutos se puede observar que el contenido de los ácidos gálico, cafeico y p-cumárico es aproximadamente 10 veces mayor y la del ácido ferúlico es 50 % superior en arándanos, mientras que no se hallaron trabajos que informen la presencia de ácido elágico o elagitaninos en jugos de naranja.

Otras situaciones que contribuyeron a corroborar la hipótesis de un componente inhibidor presente en la materia prima fueron la mayor duración de la fase lag, y por ende una menor r_A , en todos los tratamientos efectuados para la obtención de vinagres de arándanos, respecto de sus equivalentes en vinagre de naranja. También la tasa de crecimiento microbiano fue inferior. Concretamente, al finalizar cada proceso de acetificación el promedio de los recuentos bacterianos aumentó en un factor de aproximadamente 11 veces (recuento inicial: $7,25 \times 10^8$ bacterias/mL y recuento final: $7,95 \times 10^9$ bacterias/mL) respecto de su valor inicial, mientras que en la biooxidación de

vino de naranja este factor fue 17 veces mayor (recuento inicial: $3,60 \times 10^8$ bacterias/mL y recuento final: $6,06 \times 10^9$ bacterias/mL).

Por otra parte, en un trabajo en el que se evaluaron componentes del aroma en vinagres de arándanos (Su & Chien, 2010), se detectó la presencia de ácido benzoico (relación de área de pico: $0,38 \pm 0,10$), conocido agente conservante utilizado en alimentos, y especialmente activo a los bajos valores de pH existentes en los vinagres, debido al predominio de su forma no disociada.

De esta manera, las menores μ_M determinadas en los procesos de obtención de vinagres de arándanos se podrían atribuir a la presencia de mayores concentraciones de compuestos fenólicos en la materia prima, de probada actividad bacteriostática o bactericida contra agentes patógenos, respecto de sus equivalentes en naranjas.

5.4. Conclusiones

El análisis del diseño experimental utilizando MSR indicó que los factores V_{ag} y Q_a ejercieron influencia significativa positiva sobre la velocidad de acetificación. Sin embargo, a elevadas velocidades de agitación, superiores a 700 rpm, se observó una disminución en esta variable respuesta debida probablemente a un efecto de inhibición microbiana por exceso de oxígeno.

También la V_{ag} ejerció influencia significativa sobre el rendimiento G_K , sin embargo, tal como se observó para r_A , velocidades de agitación superiores a aproximadamente 700 rpm, provocaron un leve descenso en R_{GK} , tal vez motivada por la evaporación de alguno de los componentes volátiles presentes en el sustrato.

De acuerdo a este modelo, la combinación de los factores que maximizaron ambas respuestas simultáneamente fue de 677 rpm y 0,38 vvm y, en estas condiciones correspondió una $r_A=1,53$ g/L/h y un $R_{GK}=87,04$ %. El proceso de acetificación desarrollado según esos parámetros, presentó una

$r_A=1,52\pm 0,06$ g/L/h y un $R_{GK}=85,16\pm 2,45$ %, ambos valores muy similares a los predichos por el modelo.

Se comprobó una elevada correlación lineal entre r_A y r_X , con lo que se verificó que un aumento en la velocidad de crecimiento bacteriano produjo un incremento en la velocidad de acetificación, tal como se observó para el estudio en vinagres de naranja.

En la evaluación de los parámetros cinéticos r_A y μ_M , se verificó que estos resultaron inferiores a los hallados para vinagre de naranja. Esta diferencia se atribuyó a dos causas posibles. La primera se relaciona con la especie de *Acetobacter* empleada en los ensayos que fue aislada a partir de naranjas de la región con lo que se infiere una mayor dificultad para adaptarse a un sustrato diferente. Por otra parte, la presencia de mayores concentraciones de compuestos fenólicos en los arándanos podría haber ejercido algún tipo de actividad inhibitoria hacia las BAA. La mayor extensión de la fase lag y la menor tasa de crecimiento durante la acetificación de mosto alcohólico de arándanos podrían reforzar esta hipótesis.

5.5. Bibliografía

- Aleixandre, J. L., & Alvarez, I. (2003). *Tecnología enológica*. Madrid: Editorial Síntesis.
- Arándanos Argentinos. (2012). Arándanos Argentinos. Disponible en: http://www.arandanosargentinos.com.ar/index.php?option=com_content&task=view&id=939&Itemid=85.
- Bamforth, C. W. (2007). *Alimentos, fermentación y microorganismos*. (E. Acribia., Ed.). Zaragoza, España.
- Burdulis, D., Šarkinas, A., Jasutiene, I., Stackevičiene, E., Nikolajevs, L., & Janulis, V. (2009). Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) fruits. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 66(4), 399–408.

- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. D. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. a., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chemistry*, 113(4), 859–871.
- Chung, K., Wong, T. Y., Wei, C., Huang, Y., & Lin, Y. (1998). Tannins and human health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(6), 421–464.
- Cisowska, A., Wojnicz, D., & Hendrich, A. B. (2011). Anthocyanins as antimicrobial agents of natural plant origin. *Natural Product Communications*, 6(1), 149–156.
- De Ory, I., Romero, L. E., & Cantero, D. (2002). Optimum starting-up protocol of a pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering*, 52(1), 31–37.
- Ertola, R., Yantorno, O., & Mignone, C. (1994). *Microbiología Industrial. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos*. Washington D.C.: Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos.
- Faria, A., Oliveira, J., Neves, P., Gameiro, P., Santos-Buelga, C., Santos-Buelga, C. V. D. F., & Mateus, N. (2005). Antioxidant properties of prepared blueberry (*Vaccinium myrtillus*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6896–6902.
- Fregapane, G., Nieto, J., & Salvador, M. D. (1999). Wine vinegar production using a noncommercial 100-litre bubble column dynamic sparger. *Biotechnology and Bioengineering*, 1–6.
- Garrido-Vidal, D., Pizarro, C., & González-Sáiz, J. M. (2003). Study of process variables in industrial acetic fermentation by a continuous pilot fermentor and response surfaces. *Biotechnology Progress*, 19(5), 1468–1479.
- Gutiérrez Pulido, H., & Vara Salazar, H. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. (2a ed.). México: McGraw Hill.

- Hill, G. A., & Daugulis, A. J. (1999). Phenol inhibition kinetics for growth of *Acetobacter aceti* on ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 841–846.
- International Organisation of Vine and Wine. Compendium of international methods of wine and must analysis, O.I.V. (International organisation of vine and wine) (2009). Francia.
- Kader, A. A. (2002). *Postharvest technology of horticultural crops*. (A. A. Kader, Ed.) (3° edition.). Universidad de California.
- Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A., & Cabaroglu, T. (2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*, 91(2), 187–192.
- Krusong, W., Yaiyen, S., & Pornpukdeewatana, S. (2014). Impact of high initial concentrations of acetic acid and ethanol on acetification rate in an internal Venturi injector bioreactor. *Journal of Applied Microbiology*, 118(3), 629–640.
- Kurek, A., Grudniak, A. M., Kraczkiewicz-Dowjat, A., & Wolska, K. I. (2011). New antibacterial therapeutics and strategies. *Polish Journal of Microbiology*, 60(1), 3–12.
- Moldovan, B., David, L., Chisbora, C., & Cimpoi, C. (2012). Degradation kinetics of anthocyanins from european cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) fruit extracts. Effects of temperature, pH and storage solvent. *Molecules*, 17(10), 11655–11666.
- Nieto, J., González-Viñas, M. A., Barba, P., Martí-Alvarez, P. J., Aldave, L., & García-Romero, E., Cabezudo, M. D. (1993). Recent progress in wine vinegar R&D and some indicators for the future. En: *Food Flavors, Ingredients and Composition* (pp. 469–500).
- Nunes, M. C. N. (2008). *Color atlas of postharvest quality of fruits and vegetables*. (M. C. N. Nunes, Ed.). Iowa, USA.: Wiley-Blackwell Publishing.

- Prior, R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., Mcewen, J., Brien, C. O., ... Mainland, C. M. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 2686–2693.
- Pritts, M., & Hancock, J. (1992). Blueberry growth and development. En: M. Pritts & J. Hancock (Eds.), *Highbush Blueberry Production Guide* (p. 200). New York: Northeast Regional Agricultural Engineering Service.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Hartmann-Schmidlin, S., Kähkönen, M., Heinonen, M., Määtä-Riihinen, K., & Oksman-Caldentey, K. M. (2005). Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 98(4), 991–1000.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, a., & Oksman-Caldentey, K. M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), 494–507.
- Rein, M. (2005). *Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins*. *Academic Dissertation*. Helsinki: University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology.
- Rubio-Fernández, G. F. H. (2003). Continuous production of wine vinegar in bubble column reactors of up to 60-litre capacity. *European Food Research and Technology*, 17, 63–67.
- Sapers, G. M., Burgher, A. M., Phillips, J. G., & Jones, S. B. (1984). Color and composition of highbush blueberry cultivars. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 109, 105–111.
- Sdiri, S., Salvador, A., Farhat, I., Navarro, P., & Besada, C. (2014). Influence of Postharvest Handling on Antioxidant Compounds of Citrus Fruits. En: K. Hayat (Ed.), *Citrus: Molecular Phylogeny, Antioxidant Properties and Medicinal Uses* (pp. 73–94). New York.

- Sellappan, S., Akoh, C. C., & Krewer, G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2432–2438.
- Su, M.-S., & Chien, P.-J. (2010). Aroma impact components of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) vinegars. *Food Chemistry*, 119(3), 923–928.
- Wang, S. Y., Chen, C.-T., Sciarappa, W., Wang, C. Y., & Camp, M. J. (2008). Fruit quality, antioxidant capacity and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5788–5794.
- Wen, A., Delaquis, P., Stanich, K., & Toivonen, P. (2003). Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiology*, 20(3), 305–311.
- Zapata, L. M. (2014). *Obtención de extracto de antocianinas a partir de arándanos para ser utilizado como antioxidante y colorante en la industria alimentaria*. Universitat Politècnica de València.

Capítulo 6:

Acetificación de
sustrato alcohólico
de arándanos en
sistema
semicontinuo.

6.1. Introducción

El cultivo sumergido semicontinuo es el utilizado en la actualidad para la elaboración de vinagres a nivel industrial, como se ha mencionado en la Introducción general, apartado 1.3.2., por lo que en este capítulo se analizó el proceso de obtención de vinagres de arándanos mediante este sistema y se evaluó el efecto de la proporción de carga sobre la velocidad de acetificación y rendimiento GK. De esta manera y dado el escaso volumen útil del biorreactor (2 L), se podría obtener mayor volumen de vinagre en el menor tiempo de proceso.

6.2. Materiales y Métodos

6.2.1. Preparación del cultivo iniciador de *Acetobacter* sp.

El medio utilizado para la preparación del inóculo fue el sustrato alcohólico de arándanos (SA) formulado según se explicó en el capítulo 5, apartado 5.2.1.2, cuya concentración alcohólica fue de $5,9 \pm 0,6$ % v/v. De esta forma se pretendió comenzar la adaptación del cultivo al medio alcohólico en la etapa previa a su ingreso al biorreactor. Una vez inoculado al 10 % con la cepa de *Acetobacter* sp., se incubó a 30 °C con inyección de aire hasta lograr una concentración celular entre 3 y 5×10^8 bact./mL.

El control de esta etapa se realizó tomando una muestra del sustrato luego de la inoculación y otra al finalizar el período de incubación y se determinaron los siguientes parámetros fisicoquímicos: pH, acidez total y recuento celular (RC), cuyas técnicas fueron descriptas en el apartado 5.2.4. del Capítulo 5.

6.2.2. Desarrollo del proceso de acetificación en sistema semicontinuo.

Además del SA destinado a comenzar el proceso de acetificación, se debió preparar el volumen correspondiente a las recargas. Para ello se calculó la cantidad necesaria según el porcentaje C/D de cada una y, teniendo en cuenta la graduación alcohólica del mosto alcohólico de arándanos (MA), se preparó el volumen de la solución de nutrientes (Capítulo 5, apartado 5.2.1.2.) necesario para llevar a cabo la dilución del mismo hasta 6 % v/v. Se esterilizó a 121 °C durante 15 min en autoclave tipo Chamberland VZ (Argentina) y una vez que esta solución recuperó la temperatura ambiente, se incorporó el volumen calculado de MA. Esta solución se mantuvo en condiciones asépticas hasta su uso durante el proceso.

El proceso de acetificación de SA en sistema semicontinuo se realizó en biorreactor marca New Brünswick Cientific Co., Modelo Bioflo 2000 (New Jersey, USA), descrito en el apartado 2.2.2.3 del Capítulo 2.

Puesto que el equipo no cuenta con el accesorio necesario para realizar la recarga de sustrato alcohólico durante el proceso, se adaptó un dosificador que se conecta al mismo mediante una manguera de silicona, ambos estériles (Figura 6.1.), del mismo modo en que se realizó para vinagre de naranja (Capítulo 3, apartado 3.2.3.).



Figura 6.1. Equipo de acetificación de sustrato alcohólico de arándanos en sistema semicontinuo.

Según se determinó en los ensayos de acetificación de SA en sistema discontinuo (Capítulo 5, apartado 5.3.2.3.), las mejores condiciones para la obtención de un vinagre de arándanos se lograron a velocidades de agitación de 677 rpm y 0,76 L/min de aire (0,38 vvm), por lo que estos parámetros constituyeron las variables operativas del proceso semicontinuo.

Análogamente al estudio efectuado con vinagre de naranja, se realizaron los ensayos en sistema semicontinuo comparando dos niveles de proporción de carga (C/D): 40 % (800 mL) y 60 % (1200 mL). Las respuestas analizadas en cada caso fueron la velocidad de acetificación (r_A) y el rendimiento GK (R_{GK}), previamente definidos en el Capítulo 2, apartado 2.2.3.1.

El ensayo consistió en el desarrollo de dos ciclos de acetificación. El primero de ellos se dio por finalizado cuando la acidez total alcanzó valores entre 40-50 g/L, teniendo en cuenta las consideraciones referidas a la inhibición

del crecimiento de las BAA a elevadas concentraciones de acidez (Capítulo 3, apartado 3.2.4.).

La descarga de 800 mL ó 1200 mL de vinagre de arándanos según el nivel de C/D evaluado, se realizó lo más rápidamente posible y, una vez concluida, se inició el agregado de SA desde el dosificador de recarga, en igual volumen que vinagre retirado previamente (Figura 6.2). Para evitar que la biomasa quede expuesta a modificaciones bruscas en las condiciones ambientales (Bu'Lock & Kristiansen, 1991; de Ory, Romero, & Cantero, 2004) este nuevo agregado se realizó lenta y progresivamente a razón de 14 mL/min (Tesfaye, García-Parrilla, & Troncoso, 2000; Tesfaye, Morales, García-Parrilla, & Troncoso, 2003).

Concluida la recarga, se tomó una muestra del fermentador para establecer las condiciones iniciales del segundo ciclo oxidativo. Para ello se analizaron pH, acidez total, recuento celular y concentración de etanol (Capítulo 5, apartado 5.2.4. de Técnicas analíticas). Este nuevo ciclo se continuó hasta que se observó el inicio de una fase estacionaria en la producción de ácido, alrededor de 60 g/L de ácido acético.

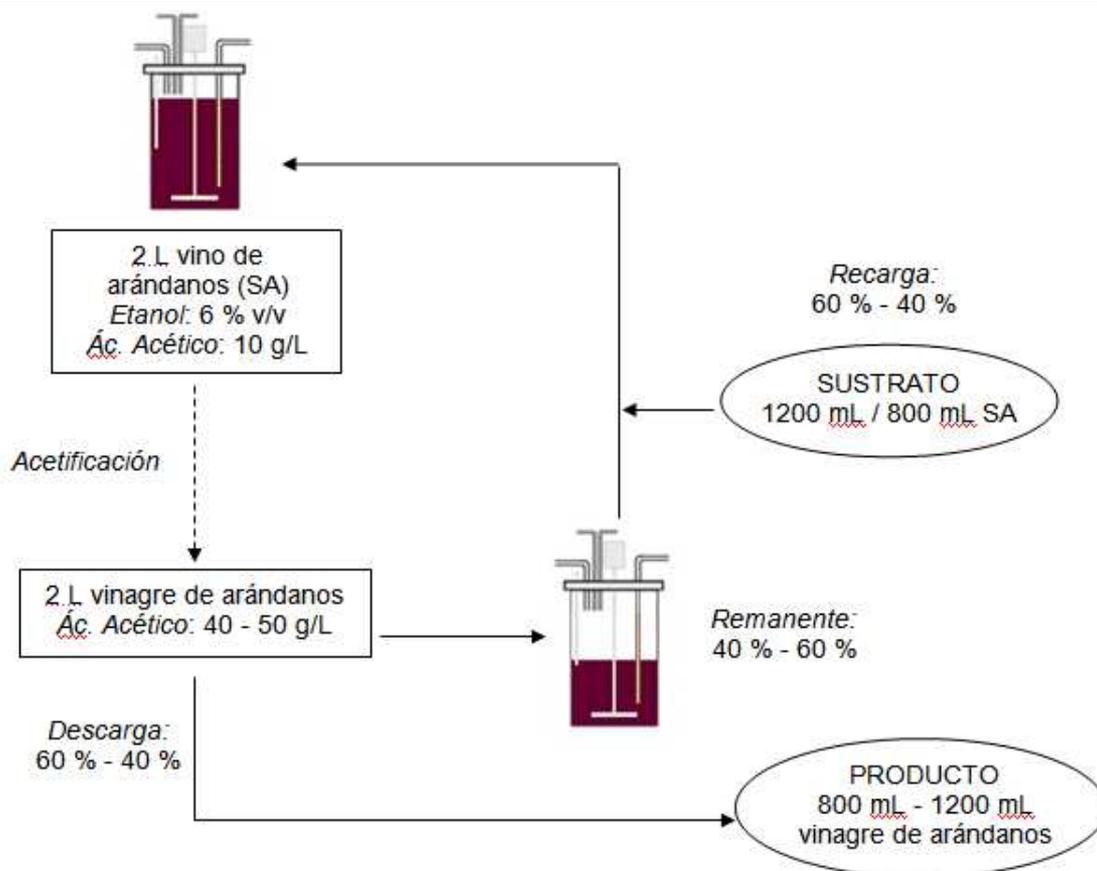


Figura 6.2. Esquema de elaboración de vinagre de arándanos en sistema semicontinuo.

Las condiciones iniciales del sustrato en todos los tratamientos fueron: pH: $2,92 \pm 0,10$, volumen del sustrato: 2 L, concentración de alcohol: $5,9 \pm 0,3$ % v/v y concentración de ácido acético: $10,14 \pm 0,62$ g/L.

El monitoreo del proceso se realizó a través de muestras tomadas del fermentador cada 4–6 horas, mediante determinaciones de pH, acidez total y recuento celular. La concentración de etanol se determinó al inicio y al final de cada ciclo. Con esta información, se graficaron las curvas de crecimiento microbiano (logaritmo natural de RC en función del tiempo) y evolución de la acetificación (acidez total en función del tiempo).

6.2.3. Tratamiento estadístico

Cada nivel del factor C/D se ensayó por duplicado y el análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante análisis de varianza, mediante el programa estadístico Statgraphics Centurion XV Corporate. Se consideró que hubo diferencias estadísticas significativas si el p-valor del ANOVA fue menor que 0,05. En los casos que así lo requirieron, se realizó la comparación de las medias mediante contraste múltiple de rangos utilizando el test de Fisher (LSD) para un nivel de confianza del 95 %.

6.3. Resultados y Discusión

Un primer análisis de las curvas de crecimiento de *Acetobacter* sp. y de producción de ácido acético (Figuras 6.3, 6.4, 6.5 y 6.6) demuestran el comportamiento característico de un metabolito asociado al crecimiento microbiano tal como se observó para la acetificación de vino de naranja (Capítulo 3, apartado 3.3.).

Las BAA presentaron una fase de latencia de 9-11 horas, notablemente superior a la observada en el proceso de obtención de vinagre de naranja que resultó de 3-6 horas. Como ya se ha mencionado, la duración de esta fase depende de factores tales como la concentración inicial de etanol y ácido acético y la historia previa del cultivo (de Ory et al., 2004; Ndoye, Lebecque, Destain, Guiro, & Thonart, 2007). Sin embargo, las concentraciones iniciales de aquellos componentes y el inóculo utilizado se han mantenido como en el ensayo equivalente en vinagre de naranja por lo que se podría interpretar que la mayor extensión de la fase lag podría haber sido consecuencia del efecto inhibitorio de las mayores concentraciones de compuestos fenólicos presentes en los arándanos (Capítulo 5, apartado 5.3.4.2.).

CAPITULO 6. Acetificación de sustrato alcohólico de arándanos en sistema semicontinuo.

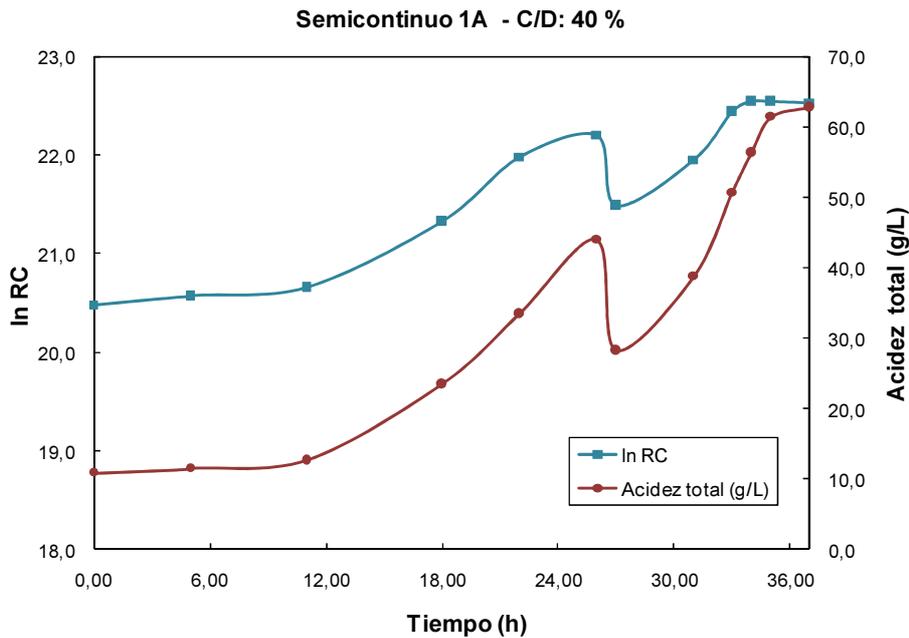


Figura 6.3. Evolución del crecimiento microbiano y la acidez total durante acetificación de un sustrato alcohólico de arándanos en proceso semicontinuo con 40 % de carga/descarga (C/D).

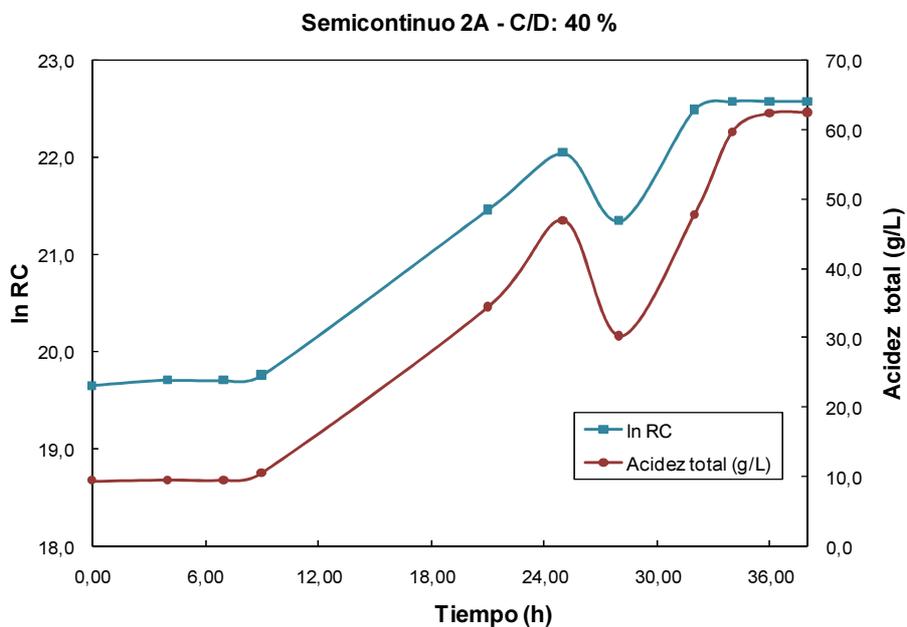


Figura 6.4. Evolución del crecimiento microbiano y la acidez total durante acetificación de un sustrato alcohólico de arándanos en proceso semicontinuo con 40 % de carga/descarga (C/D), (réplica).

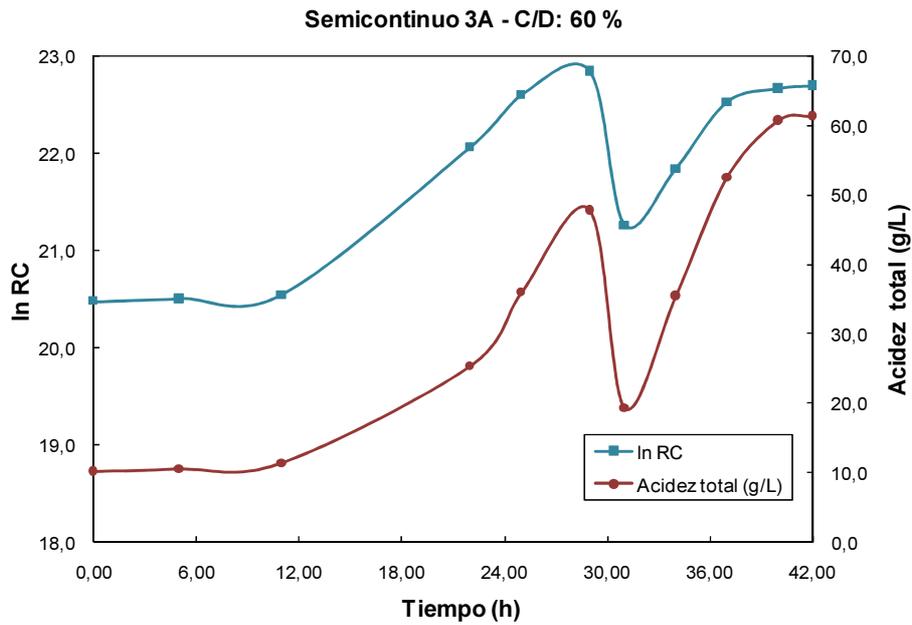


Figura 6.5. Evolución del crecimiento microbiano y la acidez total durante la acetificación de un sustrato alcohólico de arándanos en proceso semicontinuo con 60 % de carga/descarga (C/D).

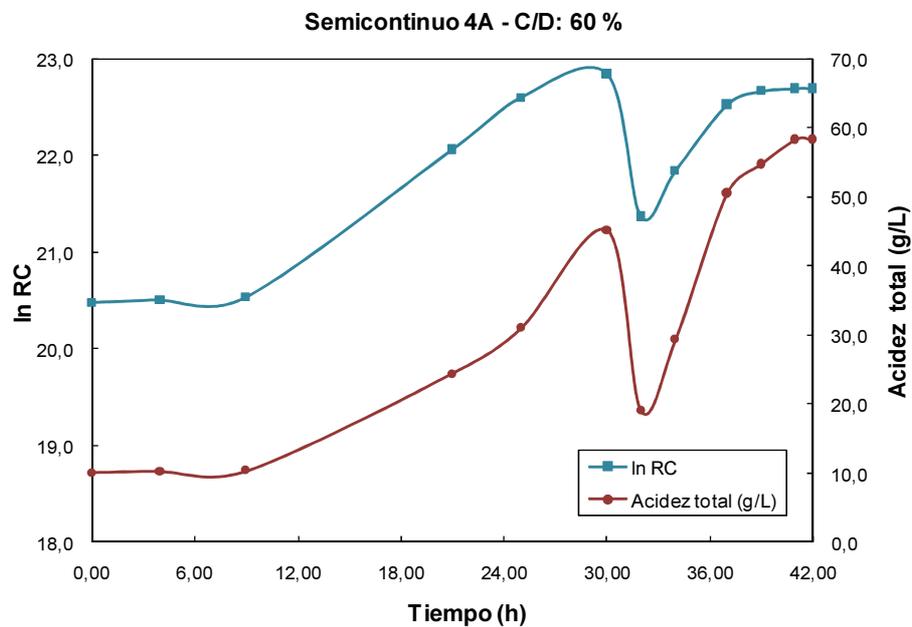


Figura 6.6. Evolución del crecimiento microbiano y la acidez total durante la acetificación de un sustrato alcohólico de arándanos en proceso semicontinuo con 60 % de carga/descarga (C/D), (réplica).

Hasta el momento en que se alcanzó la concentración establecida para la primer descarga de vinagre de arándanos (40-50 g/L de ácido acético), la duración del primer ciclo fue de 25-30 horas y la r_A alcanzada fue de $1,4\pm0,2$ g/L/h para C/D=40 % y $1,2\pm0,1$ g/L/h para C/D=60 % (Tabla 6.1). Estos resultados así como los R_{GK} ($91,1\pm0,3$ % y $91,4\pm0,1$ % para C/D=40 % y 60 %, respectivamente) no presentaron diferencias estadísticas significativas entre ellos ya que este primer ciclo se comporta como un proceso discontinuo para ambos procesos desarrollados en condiciones iniciales similares.

Tabla 6.1. Velocidad de acetificación y rendimiento GK en cada ciclo de la acetificación de un sustrato alcohólico de arándanos en sistema semicontinuo con diferentes proporciones de carga/descarga (C/D).

	<i>Proporción de carga (C/D)</i>	
	40 %	60 %
r_{A1} [g/L/h]	$1,4\pm0,2^a$	$1,2\pm0,1^a$
r_{A2} [g/L/h]	$3,8\pm0,3^b$	$3,5\pm0,1^b$
$R_{GK,1}$ [%]	$91,1\pm0,3^a$	$91,4\pm0,1^a$
$R_{GK,2}$ [%]	$92,3\pm0,1^a$	$90,2\pm3,2^a$

r_{A1} : velocidad de acetificación en 1° ciclo; r_{A2} : velocidad de acetificación en 2° ciclo; $R_{GK,1}$: rendimiento GK en 1° ciclo; $R_{GK,2}$: rendimiento GK en 2° ciclo. Letras diferentes en una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los distintos niveles de C/D ($p<0,05$). Letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias de cada ciclo.

En el comienzo del segundo ciclo de acetificación se observó la ausencia de una fase lag definida (Figuras 6.3, 6.4, 6.5 y 6.6) análogamente a lo sucedido en el proceso de obtención de vinagre de naranja (Capítulo 3, apartado 3.3.). Nuevamente, se puede inferir que la elevada población

bacteriana en crecimiento exponencial existente aún luego de la dilución con sustrato alcohólico ($1,7 \times 10^9$ - $2,2 \times 10^9$ bacterias/mL) así como su adaptación gradual a los elevados niveles de acidez logrados durante el primer ciclo, podrían haber disminuido el período de adaptación a las nuevas condiciones ambientales.

Sin embargo, otra interpretación podría realizarse mediante el análisis de la concentración de fenoles totales (FT) presentes en el volumen remanente en el fermentador luego de realizar la primera descarga establecida de vinagre. Teniendo en cuenta que el contenido de estos compuestos depende de las técnicas de procesado, de la presencia de oxígeno, enzimas y temperatura de trabajo (Su & Chien, 2007) y que se ha informado una fuerte degradación o transformación fenólica luego de la acetificación en sistema sumergido de vino tinto, vino blanco y sidra (Andlauer, Stumpf, & Fu, 2000) en la presente tesis se evaluó la concentración de FT en estas instancias. Luego del proceso de acetificación se determinó una reducción del 51 % (Capítulo 7, apartado 7.3.1.2) respecto de su contenido en SA. Por lo tanto, el contenido fenólico adicionado con cada recarga de SA se vería disminuido por un efecto de dilución con el sustrato transformado existente en el biorreactor. Como consecuencia se podría inferir que el efecto inhibitorio se vería reducido y con ello, contribuiría a disminuir la fase lag.

Los resultados de r_A durante el segundo ciclo (Tabla 6.1) indicaron que ésta fue 2,7 veces superior a las del primer ciclo para una C/D del 40 % y 2,9 veces superior para una C/D del 60 %. Nuevamente, se corroboró en este caso que el importante incremento de r_A respecto de la primera etapa, se fundamenta en la adaptación del cultivo bacteriano a las condiciones ambientales extremas reinantes en el medio. No obstante, es imprescindible el desarrollo de un mínimo de dos ciclos ya que de esta manera, un inóculo procedente de cultivos puros podría aumentar su habilidad para la fermentación y, en consecuencia, la velocidad de acetificación (Tesfaye et al., 2003; de Ory et al., 2004; Ndoye et al., 2007).

La comparación de las medias de r_A para el primer ciclo de los tratamientos realizados durante la obtención de vinagre de naranja con

respecto a aquellas alcanzadas durante la acetificación de sustrato alcohólico de arándanos indicó que hubo diferencias estadísticas significativas entre ellas ($p < 0,05$). Sin embargo, el mismo análisis efectuado con respecto al segundo ciclo indica que no hubo diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$) entre las r_A de los procesos de diferente materia prima de origen.

Teniendo en cuenta la expresión de cálculo de la velocidad de acetificación (Capítulo 1, apartado 1.2.4.) y considerando que la diferencia de acidez total final e inicial se mantuvo relativamente constante en todos los tratamientos (se partió y descargó a niveles similares de acidez), se deduce que el tiempo de cada etapa fue el factor que influyó en r_A .

A los fines de facilitar el análisis, se presentan las curvas de evolución de acidez total en todos los tratamientos en función del tiempo, en un mismo gráfico (Figura 6.7). Allí se puede apreciar claramente las diferencias en la duración de cada ciclo: mientras el primero se desarrolló en 25-30 horas, el segundo se concretó en 9-12 horas. Si se comparan estos períodos con sus análogos en vinagre de naranja es de notar que, si bien la extensión del primer ciclo fue inferior (18-22 horas) en éste último tal como era de esperar, no se observaron diferencias sustanciales con respecto a los correspondientes al segundo ciclo, en que el vinagre de naranja se concretó en 10-13 horas. Por lo tanto, aquí también se aprecia el efecto de la adaptación celular a los elevados niveles de acidez y/o a la dilución de los FT que se mencionó anteriormente. Incluso se podría deducir que las *Acetobacter* sp., aclimatadas a estas nuevas condiciones ambientales, presentaron una elevada versatilidad a los diferentes sustratos ensayados, en este caso los provenientes de naranja y arándanos.

CAPITULO 6. Acetificación de sustrato alcohólico de arándanos en sistema semicontinuo.

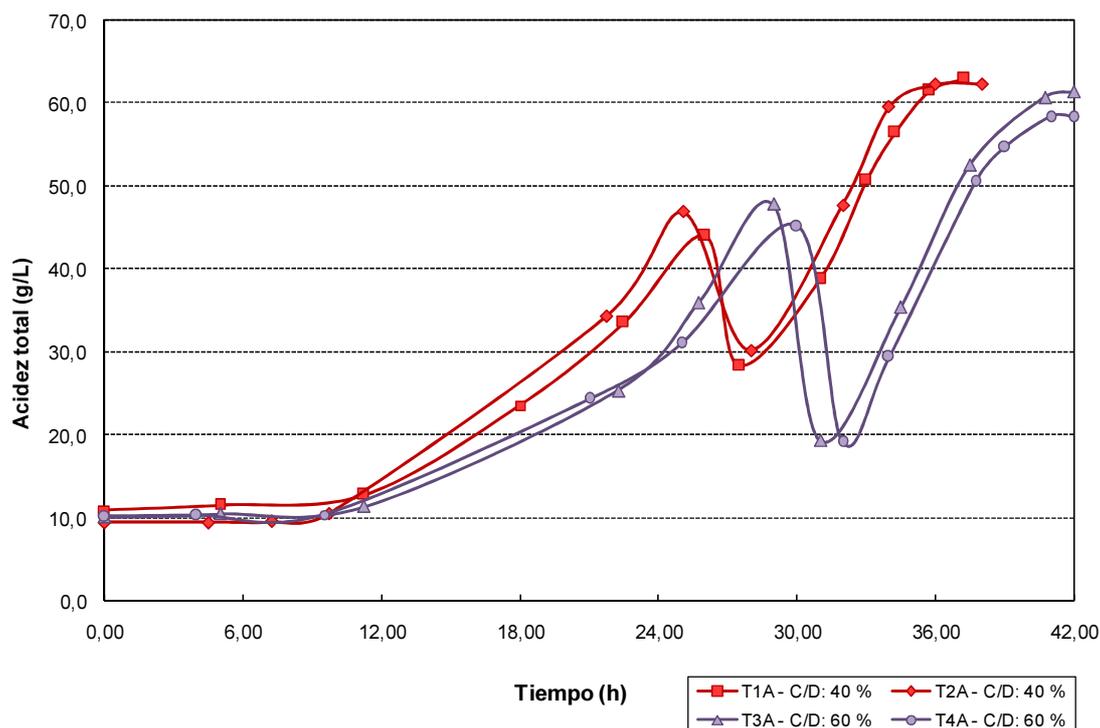


Figura 6.7. Evolución de la acidez total durante acetificación de sustrato alcohólico de arándanos en proceso semicontinuo. T1A: tratamiento con 40 % de carga/descarga (C/D); T2A: réplica de tratamiento con C/D: 40 %; T3A: tratamiento con C/D: 60 %; T4A: réplica de tratamiento con C/D: 60 %.

En el presente trabajo de investigación se observó una producción exponencial de acidez total hasta valores de $60,7 \pm 1,7$ g/L en coincidencia con el comienzo de la fase estacionaria de crecimiento ocurrida a las 32-37 horas de iniciado el proceso, cuando no se registraron aumentos sucesivos en la densidad celular. Este comportamiento probablemente fue consecuencia del agotamiento del sustrato alcohólico ya que la concentración final en todos los casos fue de $0,102 \pm 0,074$ % v/v. Aunque el crecimiento exponencial ocurrido aún a las concentraciones de acidez mencionadas indicó una elevada resistencia a este compuesto, serán necesarios mayores estudios para establecer los límites de tolerancia de la *Acetobacter* sp. empleada.

El análisis de los rendimientos GK mostró que no hubo diferencias estadísticas significativas entre los ciclos e incluso entre las diferentes proporciones C/D evaluadas (Tabla 6.1.) lo que indicó que si bien existieron

pérdidas por evaporación de los componentes volátiles, éstas se mantuvieron constantes durante el proceso.

El análisis de varianza realizado sobre la velocidad de acetificación y el rendimiento GK correspondientes al segundo ciclo, indica que no hubo diferencias estadísticas significativas para los niveles de proporción de carga evaluados, 40 % y 60 % ($p > 0,05$), del mismo modo que se observó para el estudio realizado en vinagre de naranja. Tal como fuera mencionado en esa oportunidad un comportamiento similar fue informado en vinagres de vino de Jerez obtenidos en sistema sumergido con *Acetobacter aceti* donde la alimentación con 60 g/L de etanol produjo valores prácticamente constantes de ácido acético para cualquier volumen descargado, y la razón fue atribuida a que a esa concentración alcohólica la conversión es total para todos los niveles de C/D (Macias, Caro, & Cantero, 1997). Debido a la escueta información suministrada en ese trabajo no fue posible realizar una comparación estadística entre los valores reportados y los correspondientes a la presente investigación. No obstante se pudo apreciar que los valores de r_A (4,5 g/L/h para C/D=40 % y 4,0 g/L/h para C/D=60 %) resultaron levemente superiores a los hallados en el presente trabajo de tesis.

6.4. Conclusiones

Se observó el comportamiento característico de un sistema semicontinuo en el cual se logró incrementar la velocidad del proceso con la incorporación de un nuevo ciclo oxidativo y obtener mayor volumen de producto que durante un sistema discontinuo desarrollado en las mismas condiciones operativas.

Durante el primer ciclo se determinó una fase lag de mayor extensión respecto de la observada en el ensayo análogo en vinagre de naranja que se atribuyó a una probable actividad antimicrobiana debida a las mayores concentraciones de compuestos fenólicos presentes en estas bayas. Esto

produjo un incremento en el tiempo del primer ciclo y por ende, afectó la velocidad de acetificación.

En la segunda etapa del proceso biooxidativo, la velocidad de acetificación aumentó entre 2,7-2,9 veces con respecto a la primera como consecuencia de la probable adaptación del cultivo de BAA a los elevados niveles de acidez aunque también podría deberse a un efecto de dilución de la concentración de compuestos fenólicos luego de la recarga de medio de cultivo fresco.

Tal como ocurrió en los ensayos de vinagre de naranja, la especie de *Acetobacter* utilizada demostró que fue capaz de tolerar elevados niveles de acidez, alrededor de 60 g/L expresado como ácido acético. No obstante, también en este caso queda pendiente la evaluación del nivel de tolerancia a la acidez en un proceso de acetificación con mayor número de ciclos y aumento gradual en la concentración de alcohol, lo que mejoraría su futuro uso en la industria.

No se determinaron diferencias estadísticas significativas en los rendimientos GK en ninguno de los niveles evaluados lo que indicó que las pérdidas por evaporación se mantuvieron constantes durante el proceso.

En las condiciones analizadas, con una descarga/carga del 60 % no se vieron significativamente afectados la velocidad de acetificación y el rendimiento GK respecto de una descarga del 40 %. Por este motivo y con el objeto de desarrollar una fermentación económicamente eficiente y obtener mayor volumen de producto, se puede establecer a priori, una proporción de carga/descarga de 60% para cada ciclo de un proceso semicontinuo.

6.5. Bibliografía

Andlauer, W., Stumpf, C., & Fu, P. (2000). Influence of the acetification process on phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3533–3536.

- Bu'Lock, J., & Kristiansen, B. (1991). *Biotecnología Básica*. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A.
- de Ory, I., Romero, L. E., & Cantero, D. (2004). Operation in semi-continuous with a closed pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering*, 63(1), 39–45.
- Macias, M., Caro, I., & Cantero, D. (1997). Optimum operating conditions in closed-system industrial acetifiers (semi-continuous operation): a study by computer simulation. *Chemical Engineering Journal*, 65, 201–207.
- Ndoye, B., Lebecque, S., Destain, J., Guiro, A. T., & Thonart, P. (2007). A new pilot plant scale acetifier designed for vinegar production in Sub-Saharan Africa. *Process Biochemistry*, 42(11), 1561–1565.
- Su, M.-S., & Chien, P.-J. (2007). Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. *Food Chemistry*, 104(1), 182–187.
- Tesfaye, W., García-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2000). Set up and optimization of a laboratory scale fermentor for the production of wine vinegar. *Journal of the Institute of Brewing*, 106(4), 215–219.
- Tesfaye, W., Morales, M. L., García-Parrilla, M. del C., & Troncoso, A. M. (2003). Optimising wine vinegar production: fermentation and ageing. *Applied Biotechnology, Food Science and Policy*, 1(2), 1–6.

Capítulo 7:

Caracterización de
vinagre de
arándanos.

7.1. Introducción

Los arándanos son considerados como las bayas que poseen mayor actividad antioxidante (Eichholz, Huyskens-Keil, & Rohn, 2015). Este efecto está asociado a su alta concentración en compuestos fitoquímicos naturales como compuestos fenólicos, entre ellos antocianinas, y ácido ascórbico, tal como se mencionó en el Capítulo 5. Como consecuencia de los posibles beneficios para la salud (protección contra enfermedades coronarias, procesos inflamatorios, cáncer, entre otras), desde hace tiempo se está prestando atención a los cambios que experimentan antocianinas y compuestos fenólicos en general, durante el procesamiento y almacenamiento de productos obtenidos con diferentes bayas.

El perfil de compuestos fenólicos en arándanos está constituido predominantemente por flavonoides, en su mayoría antocianinas y algunos flavonoles como la quercetina, y ácidos fenólicos entre los que se han encontrado ácido cafeico, clorogénico, p-cumárico, ferúlico y p-hidroxibenzoico (Rodarte Castrejón, Eichholz, Rohn, Kroh, & Huyskens-Keil, 2008; Eichholz et al., 2015).

El contenido de polifenoles en estos frutos no sólo es afectado por diferencias genéticas de los cultivos, condiciones ambientales de pre-cosecha y grado de madurez al momento de la cosecha, sino también por cambios fisiológicos durante la maduración y post-cosecha (Zadernowski, Naczki, & Nesterowicz, 2005; Eichholz et al., 2015).

Las antocianinas son compuestos polifenólicos responsables de las atractivas coloraciones roja, azul y violeta en numerosas hojas, flores y frutos (Kalt et al., 2003; Wang & Xu, 2007; Sablani, 2015). Son glucósidos de antocianidinas (aglicona), cuya estructura básica está formada por un núcleo de benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B), que en conjunto se denominan ión flavilio. Las diferentes sustituciones en el anillo B originan las diversas antocianidinas conocidas (Figura 7.1).

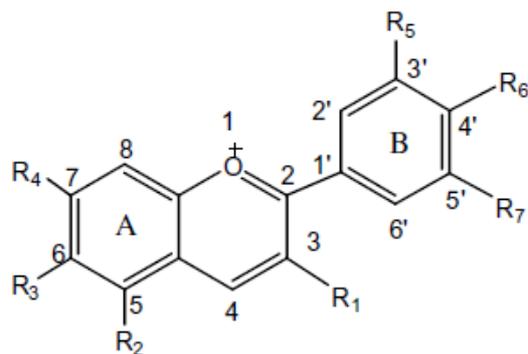


Figura 7.1. Estructura general de las antocianinas (Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández, Páez-Hernández, Rodríguez, & Galán-Vidal, 2009)

Los principales factores que gobiernan la degradación de las antocianinas son el pH, la temperatura y la concentración de oxígeno (Damodaran, Parkin, & Fennema, 2010). Otros factores de menor importancia son la luz, ácido ascórbico, enzimas degradativas, entre otros (Castañeda-Ovando et al., 2009; Moldovan, David, Chisbora, & Cimpoi, 2012).

La acidez tiene un efecto protector sobre la estructura de las antocianinas, a pH ácidos adquieren una estructura oxonio estable de catión flavilio coloreado mientras que, cuanto más elevado es el pH, aparecen estructuras quinoidales inestables que se degradan con rapidez (Badui Dergal, 2013).

Los aumentos de temperatura provocan un efecto adverso sobre la estructura de las antocianinas, especialmente durante el tratamiento térmico o el almacenamiento (Su & Chien, 2007). En experiencias realizadas a diferentes temperaturas y a pH 3 y 7, se han informado velocidades de degradación 10,7 veces superior a 37 °C respecto de la determinada a 2 °C, para los pH evaluados (Moldovan et al., 2012).

Un factor particularmente importante en esta investigación es el oxígeno, por las condiciones aerobias del proceso de acetificación. Por su insaturación, las antocianinas son sensibles al oxígeno molecular. Además, la presencia de oxígeno potencia el efecto de otros factores que favorecen la inestabilidad de las mismas. El mecanismo de la oxidación puede ser directo

y/o indirecto, en el que las antocianinas reaccionan con compuestos que han sido previamente oxidados, dando lugar a la formación de productos de color marrón o incoloro. También pueden reaccionar con radicales de oxígeno, actuando en este caso como antioxidantes, y es esta característica la que otorga los efectos beneficiosos hacia la salud humana (Rein, 2005).

Si bien la luz es esencial durante la biosíntesis de las antocianinas, presenta un efecto perjudicial durante los tratamientos poscosecha, ya que acelera su degradación (Rein, 2005).

El ácido ascórbico induce la degradación de las antocianinas a través del peróxido de hidrógeno que se forma durante su oxidación. Esta reacción se acelera en presencia de cobre y se inhibe en presencia de flavonoles como la quercetina. El mecanismo de degradación es debido a la ruptura del anillo de pirilio provocada por el peróxido de hidrógeno (Damodaran et al., 2010).

Algunas enzimas como las glicosidasas y las polifenoloxidasas (PPO) ocasionan la pérdida de la estabilidad de las antocianinas. Las primeras provocan la ruptura entre el azúcar y la aglicona, generando una menor solubilidad en las antocianidinas y su transformación en productos incoloros (Damodaran et al., 2010), mientras que las PPO oxidan los o-difenoles en presencia de oxígeno y la o-quinonas liberadas durante esta reacción, degradan las antocianinas (Damodaran et al., 2010; Routray & Orsat, 2011).

El agua puede actuar como nucleófilo y atacar el catión flavilio en el C-2 de la estructura química de las antocianinas (Figura 7.1), formando una base carbinol incolora. Sin embargo, esta degradación puede variar, dependiendo de la concentración de azúcares o con el fenómeno denominado copigmentación (Zapata, 2014). Cuando los azúcares se encuentran en altas concentraciones, la actividad acuosa es baja, por lo que las moléculas de agua tienen menores posibilidades de atacar el catión flavilio para formar la base carbinol. Sin embargo, cuando los azúcares están en bajas concentraciones, la actividad de agua no se ve afectada, por lo que sus productos de degradación (hidroximetilfurfural y furfural) aceleran la degradación de las antocianinas (Lewis & Walker, 1995; Kopjar, Bilić, & Piližota, 2011).

Tal como se mencionó en el Capítulo 4, dado el amplio reconocimiento científico de los beneficios del mayor consumo de alimentos ricos en componentes antioxidantes, en el presente capítulo se analizaron especialmente las variaciones en las concentraciones de antocianinas totales, fenoles totales y actividad antioxidante durante todo el proceso de elaboración de vinagre de arándanos. Además, se realizó su caracterización teniendo en cuenta los estándares especificados en las legislaciones argentina y española.

7.2. Materiales y Métodos

7.2.1. Evolución de componentes antioxidantes.

Se evaluaron las concentraciones de los principales componentes antioxidantes, fenoles totales (FT) y antocianinas totales (AntT), y se determinó la actividad antioxidante (AA) mediante los métodos ABTS y DPPH, según las técnicas analíticas descriptas en el apartado 7.2.3.

Con el objeto de analizar las modificaciones ocurridas en esas características de calidad, se tomaron muestras en las siguientes etapas del proceso de obtención de vinagre de arándanos (Figura 7.2): materia prima, sustrato destinado a vinificación (SV), sustrato alcohólico destinado a acetificación (SA), vinagre joven o recién obtenido (Va0) y vinagre de arándanos al cabo de un período de maduración de 6 meses (Va6), según se indica en la Figura 7.2.

A los efectos de la maduración o envejecimiento, los vinagres se envasaron en botellas de vidrio color caramelo con el fin de disminuir los riesgos de alteración de las antocianinas y se almacenaron en ambiente de laboratorio a temperaturas que oscilaban entre 20-25 °C, simulando condiciones de comercialización o de alacena, una vez adquirido por el consumidor.

7.2.2. Caracterización del vinagre de arándanos.

Las muestras de vinagre de arándanos empleadas en la caracterización fueron obtenidas de una serie de tres procesos (réplicas) desarrollados a 30 °C, 677 rpm y un caudal de aire de 0,76 L/min (condiciones de máxima velocidad acetificación y rendimiento GK, según fueron determinadas en Capítulo 5, apartado 5.3.2.3.). Las condiciones del sustrato se mantuvieron como en todos los ensayos de acetificación realizados en este trabajo de investigación.

Considerando las escasas especificaciones reglamentadas para vinagres de procedencia frutal (Capítulo 4, apartado 4.1), los parámetros fisicoquímicos analizados en el vinagre de arándanos para su caracterización, se basaron en los estándares de calidad especificados para vinagre de vino. De esta manera, se determinó acidez total, acidez fija, acidez volátil, pH, extracto seco, cenizas totales, densidad, azúcares reductores totales y etanol residual (apartado 7.2.3. de "Técnicas analíticas"), en las siguientes etapas: vinagre joven (Va0) y vinagre envejecido o madurado (Va6).

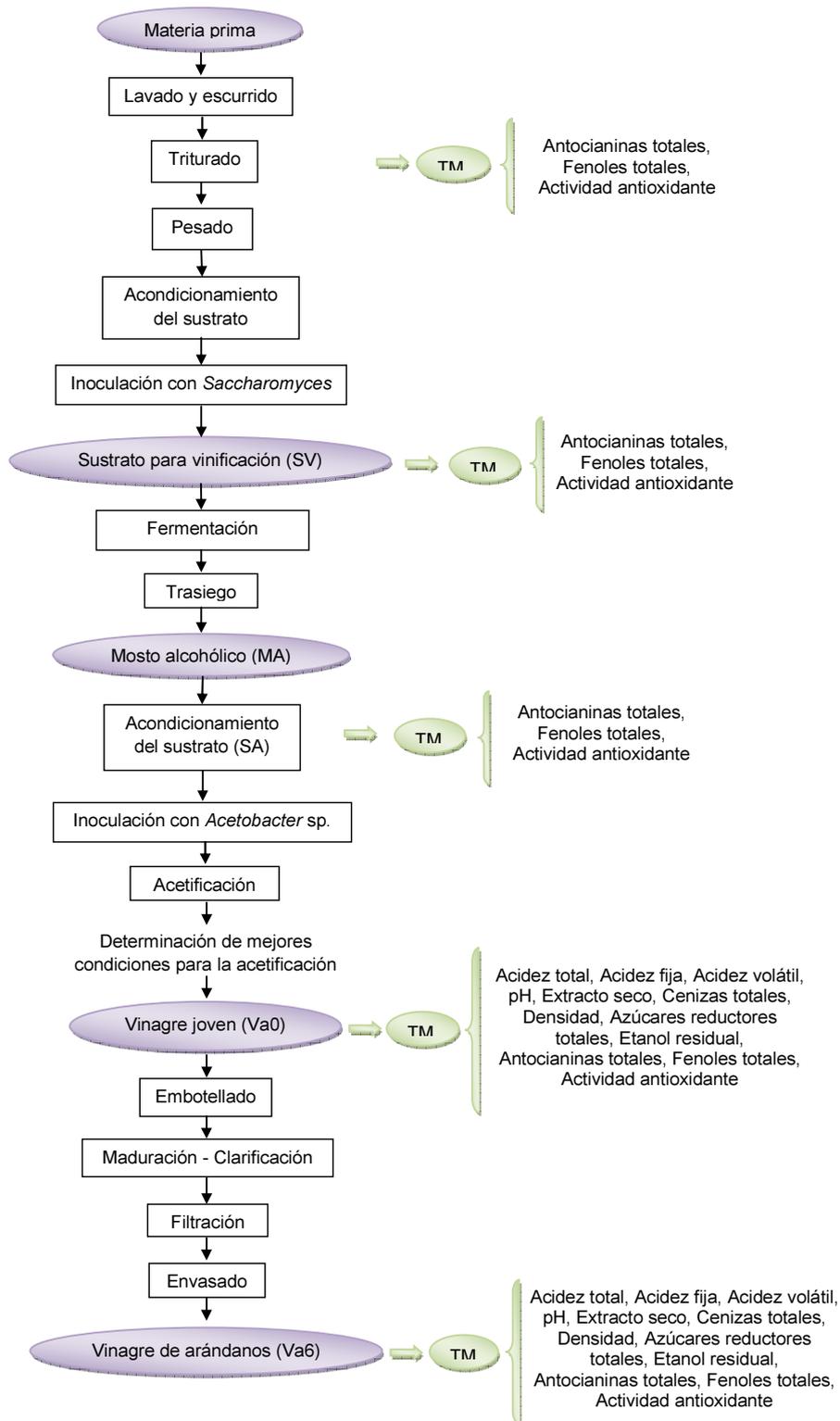


Figura 7.2. Esquema de toma de muestras (TM) para caracterización del vinagre de arándanos.

7.2.3. Técnicas analíticas

Acidez total: mediante titulación potenciométrica con solución de hidróxido de sodio (NaOH) (AOAC, 2005, 18th Ed., Official Method 930.35). El resultado se expresó como g de ácido acético por 100 mL de vinagre (se asumió que toda la acidez del medio se debe a este ácido).

Acidez fija: mediante técnica basada en la evaporación a sequedad, en repetidas veces, de una muestra de vinagre previamente filtrado (AOAC, 2005, 18th Ed., Official Method 930.35). El resultado se expresó en g de ácido acético por 100 mL de vinagre.

Acidez volátil: definida convencionalmente como la diferencia entre los valores de su acidez total y fija, expresadas ambas en g de ácido acético por 100 mL de vinagre (AOAC, 2005, 18th Ed., Official Method 930.35).

pH: método potenciométrico, con peachímetro BOECO modelo BT-500 (Germany) (AOAC, 2005, 18th Ed., Official Method 930.35).

Extracto seco: el método oficial para vinagres se basa en la evaporación de la muestra de vinagre en baño de agua en ebullición y posterior desecación en estufa a 100-105 °C durante 2,5 horas. El resultado se expresó como % (p/v) de vinagre (AOAC, 2005, 18th Ed., Official Method 930.35).

Cenizas totales: la técnica incluye sucesivas evaporaciones, incineración a 500 - 550 °C y redisoluciones repetidas durante tres veces del residuo de evaporación proveniente de un volumen de vinagre. El resultado se expresó en % (p/v) de vinagre (AOAC, 2005, 18th Ed., Official Method 930.35).

Densidad: mediante densímetro peso específico a 15 °C 1,000/1,500: 0,005, expresada en g/mL de vinagre.

Azúcares reductores totales: mediante técnica volumétrica de Lane-Eynon (AOAC, 1995, 16th Ed., Official Method 923.09), previa hidrólisis ácida de la muestra. Los resultados se expresaron como g por 100 mL de vinagre.

Concentración de etanol residual: método enzimático (Boehringer Mannheim/R-Biopharm, Cat. N° 10176290035). El resultado se expresó como % (v/v) de vinagre.

Antocianinas totales: se determinaron a través del método diferencial de pH (Giusti & Wrolstad, 2001). Para la cuantificación se preparó una solución buffer de cloruro de potasio 0,025 M ajustado con ácido clorhídrico a pH 1,0 y otra de acetato de sodio 0,4 M ajustado con ácido acético a pH 4,5. Un volumen de muestra fue adicionada de la solución tampon de cloruro de potasio (pH 1,0) y se midió la absorbancia a 510 nm (longitud de onda de máxima absorción de antocianinas) con un espectrofotómetro UV-visible SHIMADZU, modelo UV 1603 (Japan). Posteriormente, y con el propósito de efectuar la corrección de la medida debida a la presencia de compuestos degradados o sustancias interferentes, se midió la absorbancia a 700 nm. La misma dilución y procedimiento se realizó utilizando solución buffer de acetato de sodio (pH 4,5) con el fin de eliminar la absorbancia debida a la intensidad de color de pigmentos poliméricos amarronados y antocianinas degradadas. Las mediciones se realizaron contra un blanco de agua ultra pura (Zapata, 2014).

La diferencia en las absorbancias a la longitud de onda de máxima absorción es proporcional al contenido de antocianinas (Wrolstad, 1993). La concentración de estos compuestos presentes en la fruta se expresó como mg cianidina-3-glucósido/kg de arándano, mientras que para las muestras líquidas (SV, SA, vinagres) se expresó como mg cianidina-3-glucósido/L de muestra.

Fenoles totales: se empleó el método basado en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu (Saura-Calixto, 1998). Este reactivo consiste en una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos presentes en la muestra, originando óxidos azules de wolframio (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}). Para la cuantificación se mezcló un volumen de muestra con otro del reactivo y se agregó solución de carbonato de sodio al 20 % y agua ultra pura. Luego de agitar esta mezcla se incubó a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) durante 30 minutos en la oscuridad. Por último, se midió la absorbancia de estas muestras a 760 nm en espectrofotómetro UV-visible SHIMADZU, modelo UV 1603 (Japan). Todas las lecturas se realizaron contra un blanco compuesto de agua ultra pura, solución de carbonato de sodio al 20 % y Reactivo de Folin-Ciocalteu (Zapata, 2014).

Se utilizó ácido gálico como fenol de referencia, por lo que los resultados en la fruta se expresaron como mg equivalente de ácido gálico (GAE)/100 g de arándano, mientras que para las muestras líquidas (SV, SA, vinagres), se expresaron como mg de equivalente de ácido gálico (GAE)/100 mL de muestra.

Actividad antioxidante: la actividad antioxidante de las muestras se determinó por dos métodos: ABTS y DPPH. Se utilizó ácido L-ascórbico como antioxidante de referencia y los resultados, para la fruta, se expresaron como mg de equivalente de ácido ascórbico (EAA)/100 g de arándano, mientras que para las muestras líquidas se expresó como mg de equivalente de ácido ascórbico (EAA)/100 mL de muestra (SV, SA, vinagre).

Método del radical ABTS^{•+}: el radical ABTS^{•+} se obtiene tras la reacción de 2,2' azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico), ABTS, con persulfato potásico (2,45 mM, concentración final) incubados en la oscuridad durante 12 h. Una vez formado el radical ABTS^{•+} se efectuó una dilución con buffer fosfato a pH 7,4 hasta obtener un valor de absorbancia de 0,70 a 734 nm (longitud de onda de máxima absorción) (Re et al., 1999). Durante la reacción con antioxidantes (fenoles, vitamina C u otros) pasa a su forma neutra e incolora y puede observarse espectrofotométricamente (Zapata, 2014).

La determinación de la actividad antioxidante de las muestras se realizó mezclando un volumen de éstas con otro de solución diluida de radical ABTS^{•+}, se agitó durante 30 segundos a 1600 rpm e incubó a temperatura ambiente (25±1 °C) y en oscuridad durante 20 minutos. Luego se midió la absorbancia a 734 nm en espectrofotómetro UV-visible SHIMADZU, modelo UV 1603 (Japan). El control se preparó de la misma forma pero en vez de muestra se utilizó un volumen de agua ultra pura.

Se construyó una curva de calibrado con cinco puntos de concentraciones conocidas de soluciones patrón de ácido ascórbico, tratadas como se explicó en el párrafo anterior.

Método del radical DPPH[•]: esta técnica se basa en la reducción de la absorbancia a 517 nm del radical DPPH[•] o 2,2-difenil-1-picril hidrazilo por la

acción de antioxidantes. Este radical es de color violeta intenso y se vuelve incoloro o amarillo pálido cuando reacciona con antioxidantes que lo neutralizan (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995).

En primer lugar se preparó una solución madre de DPPH^{*} en una concentración de 200 mg/L y se conservó en refrigeración a 4 ± 1 °C en envase de vidrio color caramelo y envuelto en papel de aluminio hasta el momento de ser utilizado. Para las determinaciones analíticas, se realizó una dilución 1/10 de esa solución empleando metanol calidad HPLC como solvente (Brand-Williams et al., 1995). Las medidas de la actividad antioxidante de las muestras se realizaron mezclando un volumen de la muestra con otro de solución diluida de DPPH. Luego de agitar durante 30 segundos a 1600 rpm se incubó a temperatura ambiente (25 ± 1 °C) y en oscuridad durante 30 minutos. Luego se midió la absorbancia a 517 nm en espectrofotómetro UV-visible SHIMADZU, modelo UV 1603 (Japan). El control se preparó de la misma forma pero en vez de muestra, se utilizó un volumen de agua ultra pura. Con estos datos se calculó la diferencia de absorbancia (absorbancia del control menos absorbancia de la muestra) a los 30 minutos de iniciada la reacción entre el radical y los antioxidantes presentes en la muestra (Zapata, 2014).

Se construyó una curva de calibrado con cuatro puntos de concentraciones conocidas de soluciones patrón de ácido ascórbico, tratadas como se explicó en el párrafo anterior.

7.2.4. Tratamiento estadístico.

Cada una de las determinaciones se efectuó por triplicado. Se analizaron los resultados mediante análisis de varianza y, cuando fue necesario ($p < 0,05$), se aplicó el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. En todos los casos se utilizó un nivel de confianza del 95 %.

Con el fin de evaluar la relación entre los diferentes componentes antioxidantes analizados y la actividad antioxidante, se obtuvieron los coeficientes de correlación (r). Se consideró que hubo una correlación significativa entre dos variables cuando $p < 0,05$.

Todos los análisis estadísticos de los datos se realizaron con el programa Statgraphics Centurión XV Corporate.

7.3. Resultados y Discusión

7.3.1. Evolución de componentes antioxidantes.

Tanto los componentes bioactivos, antocianinas totales y fenoles totales, como la actividad antioxidante medida por los métodos ABTS y DPPH, experimentaron una importante reducción a lo largo del proceso de obtención de vinagre de arándanos (Tabla 7.1.).

Tabla 7.1. Concentración de componentes antioxidantes presentes en distintas etapas del proceso de obtención de vinagre de arándanos.

	Antocianinas totales (mg cian.-3-gluc./L)	Fenoles totales (mg GAE/100 mL)	ABTS (mg EAA/100 mL)	DPPH (mg EAA/100 mL)
Fruta	873,80±3,44 ^{(1)a}	430,18±9,40 ^{(2)a}	800,98±3,22 ^{(3)a}	559,99±7,28 ^{(3)a}
SV	243,91±10,14 ^b	121,40±2,55 ^c	62,48±0,91 ^c	40,14±0,35 ^c
SA	32,57±0,41 ^c	130,30±1,21 ^b	73,58±0,25 ^b	53,41±0,74 ^b
Va0	18,38±0,78 ^d	64,52±1,42 ^d	57,37±1,87 ^d	24,12±1,02 ^d
Va6	7,52±1,80 ^e	41,37±1,93 ^e	42,23±0,27 ^e	15,4±0,35 ^e

SV: sustrato de arándanos para vinificación, SA: sustrato alcohólico de arándanos, Va0: vinagre joven de arándanos, Va6: vinagre de arándanos con 6 meses de maduración. ⁽¹⁾ La concentración de AntT se expresó en mg cianidina-3-glucósido/kg fruta. ⁽²⁾ La concentración de FT se expresó en mg GAE/100 mg fruta. ⁽³⁾ La actividad antioxidante se expresó en mg EAA/100 mg fruta. Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas (p<0,05) entre las medias de los productos de cada etapa analizada.

7.3.1.1. Antocianinas Totales.

La concentración de AntT disminuyó durante el proceso de obtención de vinagre. La pérdida de estos compuestos desde la materia prima hasta el vinagre recién obtenido (Va0) fue de 98 %. Su & Chien (2007) llegaron a un resultado similar en la elaboración de vinagre de arándanos, con una reducción de la concentración de AntT superior al 99%, respecto de la materia prima.

La disminución entre la fruta y el SV fue de 72 %, debido principalmente a la dilución efectuada en el acondicionamiento del sustrato. Además, tal como se explicó en la introducción de este capítulo, las moléculas de antocianinas probablemente sufrieron el ataque nucleofílico del agua al catión flavilio, formando compuestos incoloros (Kopjar et al., 2011).

Durante la fermentación alcohólica, es decir entre SV y SA, el contenido de AntT se redujo en un 87 %. También Ubeda et al. (2013) determinaron una pérdida entre 63-85 % durante la fermentación alcohólica en estudios de obtención de vinagre de frutilla. Klopotek, Otto, & Boehm (2005) hallaron resultados similares en la fabricación de vinagre de frutilla, obteniendo una reducción de la concentración de AntT del 69-79 %. El deterioro de estos componentes en esta etapa fermentativa pudo estar relacionada con la cepa de levadura utilizada en la fermentación (Ubeda et al., 2011), posiblemente debido a la adsorción de AntT a las paredes celulares de las cepas de levaduras utilizadas (Morata, Gomez-Cordoves, Colomo, & Suarez, 2005), y a reacciones de condensación con acetaldehído formado durante el metabolismo de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Bosso & Guaita, 2008). Además, se ha informado la desaparición de antocianinas monoméricas durante la etapa de vinificación, debida a reacciones de polimerización y formación de nuevos pigmentos de bajo y alto peso molecular (Pérez-Trujillo, Hernández, López-Bellido, & Hermosín-Gutiérrez, 2011). La pérdida de Ant obtenida en esta tesis, levemente superior a los rangos informados, podría atribuirse al ataque nucleofílico del agua al catión flavilio de las antocianinas como consecuencia de la dilución efectuada para el acondicionamiento de SA.

El contenido de AntT se redujo en un 44 % durante la etapa de acetificación, es decir entre SA y Va0. Este comportamiento puede atribuirse a que estos compuestos constituyen un sustrato fácilmente degradable por las enzimas polifenoloxidasas (PPO), más aún considerando las características de esta etapa, es decir, elevado contacto con el oxígeno y temperatura de trabajo ubicada dentro del rango óptimo de actividad de estas enzimas (25-35 °C) (Damodaran et al., 2010; Jeantet, Croguennec, Schuck, & Brulé, 2010). Su & Silva (2006) informaron una reducción del 79 % en el contenido de AntT durante la obtención de un vinagre de arándanos y la atribuyeron a los factores mencionados previamente. Este porcentaje de pérdida de AntT resultó bastante mayor que la registrada en el presente trabajo de investigación, lo que podría deberse a que estos autores emplearon un sistema estático (superficial) de fermentación, que requiere de mayores tiempos para la obtención del producto final. De esta manera, al ser mayor el tiempo de contacto del sustrato con el oxígeno, podría aumentar la degradación de las AntT.

Durante la etapa de maduración (Va0 a Va6) la concentración de AntT se redujo en un 59 %. Este comportamiento ha sido observado en una amplia variedad de productos obtenidos de arándanos (jugos, puré, extractos) y atribuido al incremento de la cinética de degradación con la temperatura y el tiempo de calentamiento o de almacenamiento (Brownmiller, Howard, & Prior, 2008; Hernández-Herrero & Frutos, 2011; Syamaladevi, Andrews, Davies, Walters, & Sablani, 2012; Zapata, 2014).

7.3.1.2. Fenoles Totales.

La concentración de FT en el vinagre depende de las técnicas de procesado, como el tiempo de fermentación alcohólica donde el medio hidroalcohólico está en contacto con la piel, del triturado y del prensado, además de la presencia de oxígeno, enzimas y temperatura de trabajo (Su & Chien, 2007).

En la presente investigación se observó una importante disminución en la concentración de FT (85 %) en el vinagre respecto de la fruta, debido

probablemente a la fuerte oxidación provocada por las condiciones aeróbicas del proceso y por la dilución efectuada durante el acondicionamiento de los sustratos.

La concentración de FT entre la materia prima y el SV disminuyó un 72%, atribuida, como se señaló anteriormente, a la dilución de la mezcla de arándanos triturados para evitar su gelificación, debido al elevado contenido de pectinas en estas bayas (Proctor & Peng, 1989).

Sin embargo, entre SV y SA se observó un aumento del 7 % en los FT debido probablemente a que su extracción continuó durante la fermentación alcohólica (Lee & Wrolstad, 2004). Además, Delteil et al. (2000) publicaron que el dióxido de azufre, liberado por el metabisulfito de potasio agregado, pudo haber actuado como protector contra la oxidación, además de reducir la constante dieléctrica del agua y consecuentemente aumentar la solubilidad de los fenoles. Por otra parte, Ubeda et al. (2011) encontraron que la levadura puede influir de dos maneras diferentes: capturando polifenoles (Razmkhab et al., 2002; Mazauric & Salmon, 2005), o bien, liberando, desde el interior celular y la pared celular, compuestos antioxidantes distintos de los polifenoles presentes naturalmente en la materia prima (Jaehrig, Rohn, Kroh, Fleischer, & Kurz, 2007; Aredes Fernandez, Farias, & Nadra, 2010). Varios investigadores reportaron también mayores contenidos de fenoles totales en el vino respecto de los cuantificados en el jugo de uvas utilizado como sustrato y lo atribuyeron a las transformaciones realizadas por la cepa de levadura empleada en la fermentación (Brandolini, Fiore, Maietti, Tedeschi, & Romano, 2007; Budak & Guzel-Seydim, 2010).

En la etapa de acetificación, es decir entre SA y Va0, hubo una pérdida de FT del 51%, similar al registrado en la misma fase para vinagre de naranja (Capítulo 4, apartado 4.3.1.2.). Este comportamiento se podría atribuir a la degradación de los FT por acción de las PPO, más aún considerando el elevado caudal de aire con que se trabaja en esta fase.

Durante la etapa de maduración (Va0 a Va6) la concentración de FT se redujo en un 36 %, en gran parte debida a la disminución en las AntT (59 %) durante este período.

7.3.1.3. Actividad antioxidante (AA).

Con el método ABTS se registró una pérdida de 93% en la actividad antioxidante entre la materia prima y el vinagre joven, mientras que con la técnica DPPH, la reducción fue del 96%.

La reducción de AA entre la fruta y el SV fue de 92 y de 93 %, para ABTS y DPPH, respectivamente, y en ambos casos esto se relacionó con la dilución del sustrato triturado, según se mencionó anteriormente.

Entre SV y SA se observó un incremento del 18 % y del 33 % respectivamente para las citadas metodologías, lo que podría atribuirse al incremento en la concentración de FT registrados durante la fermentación alcohólica. Brandolini et al. (2007) también arribaron a esta conclusión luego de varios ensayos de vinificación en tinto con diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

En la etapa de acetificación (SA-Va0), el valor de AA disminuyó 22 y 55 %, respectivamente para ABTS y DPPH, lo que pudo deberse a la degradación de las AntT, y con ello la menor concentración de los FT, o bien, a la generación de nuevos compuestos fenólicos con menor actividad antioxidante que los originalmente presentes en el vino (Dávalos, Bartolomé, & Gómez-Cordovés, 2005).

Cerezo et al. (2010) informaron una disminución de la actividad antioxidante del 16,8 %, medida con la metodología DPPH, durante la etapa de acetificación de un vino tinto. Este valor resultó inferior al obtenido en el presente estudio, tal vez porque estos investigadores no efectuaron dilución del sustrato, y por lo tanto, los cambios se debieron a variaciones en la composición química después del proceso fermentativo, más que a efectos de dilución.

En la etapa de maduración (Va0 a Va6), la reducción de la actividad antioxidante registrada con el método ABTS fue del 26 %, mientras que con el método DPPH, fue del 36 %, lo que podría estar relacionado con la pérdida de antocianinas totales y fenoles totales, durante este período.

Se obtuvo una elevada correlación significativa entre las concentraciones de antocianinas y fenoles totales y la actividad antioxidante (Tabla 7.2), lo que demuestra la importante contribución de estos componentes a la AA de los vinagres de arándanos.

Tabla 7.2. Coeficientes de correlación (r) entre componentes antioxidantes y actividad antioxidante (ABTS y DPPH), en vinagres de arándanos ($p < 0,05$).

	ABTS	DPPH	Fenoles totales
Antocianinas totales	0,97	0,97	0,97
Fenoles totales	0,98	0,98	---
ABTS	---	0,99	0,98

Las prácticas realizadas sobre la materia prima, principalmente el agregado de agua para evitar la gelificación de los arándanos luego del triturado, seguramente podría ser reemplazado para evitar la disminución de los componentes antioxidantes. Una alternativa podría ser el uso de enzimas pectolíticas. En la mayoría de los estudios consultados, el uso de estas enzimas no incrementó la concentración de antocianinas, sin embargo, aumentaron el contenido de otros compuestos fenólicos así como la intensidad del color (Cvejić & Atanacković, 2015).

Además, una opción para cubrir la deficiencia de antocianinas en el vinagre de arándanos radicaría en el agregado de extractos naturales de estos componentes (Hernández-Herrero & Frutos, 2011). En este sentido Zapata (2014) propuso un método de extracción sólido-líquido de antocianinas a partir de arándanos, con una posterior concentración de este extracto. De esta manera, se obtuvo un producto final con uso potencial en la industria alimentaria como colorante y antioxidante, que podría ser incorporado al vinagre de arándanos.

7.3.2. Caracterización del vinagre de arándanos.

Para el análisis de las características específicas del vinagre de arándanos se hace referencia a la tabla 4.3 (Capítulo 4, apartado 4.3.2.), donde se pueden observar las especificaciones de las legislaciones argentina y española, para vinagres de frutas y de vino.

Tabla 4.3. Especificaciones del Código Alimentario Argentino (C.A.A.) y Código Alimentario Español (C.A.E.) respecto de los vinagres de procedencia frutal y de origen vínico.

	<i>Vinagres de frutas</i>		<i>Vinagres de vino</i>	
	C.A.A.	C.A.E.	C.A.A.	C.A.E.
Acidez total	No menor de 4,0 % p/v	Mín. 50 g/L	No menor de 5,0 % p/v	Mín. 60 g/L
Acidez volátil	----	----	No menor de 85 % p/v de la acidez total	----
Extracto seco	----	----	0,75 – 2,0 % p/v	Mín. de 1,2 g/L y grado de ácido acético
Cenizas totales	----	----	No menor de 0,1 % p/v	----
Densidad (a 15 °C, g/mL)	----	----	1,015-1,020	----
Azúcares reductores totales	----	----	Máx. de 0,4 % p/v, expresadas en dextrosa	----
Etanol residual	----	Máx. de 0,5 % v/v	Máximo equivalente a 1/10 de la acidez total, expresada en volumen	Máx. de 1,5 % v/v

Los resultados de la caracterización de los vinagres de arándanos en las etapas Va0 y Va6 indicaron que los parámetros de acidez total y etanol

(Tabla 7.3) se encuadraron dentro de lo estipulado en las normas argentina y española para vinagres de frutas (Tabla 4.3). El resto de los parámetros, como se señaló anteriormente, fue evaluado con respecto a los estándares de calidad para vinagres de vino y estos resultados también cumplieron las especificaciones de ambas reglamentaciones (Tabla 7.3).

Tabla 7.3. Parámetros fisicoquímicos de vinagre de arándanos joven (Va0) y al cabo de 6 meses de maduración (Va6).

	Va0	Va6
Acidez total (% p/v)	5,61±0,01 ^a	6,02±0,02 ^b
Acidez fija (% p/v)	0,25±0,00 ^a	0,25±0,00 ^a
Acidez volátil (% p/v)	5,36±0,01 ^a	5,77±0,02 ^b
pH	2,47±0,02 ^a	2,45±0,01 ^b
Extracto seco (% p/v)	1,17±0,02 ^a	1,15±0,01 ^a
Cenizas totales (% p/v)	0,24±0,01 ^a	0,22±0,01 ^a
Densidad (a 15 °C, g/mL)	1,020±0,000 ^a	1,020±0,000 ^a
Azúcares reductores totales (% p/v)	0,16±0,01 ^a	0,17±0,01 ^a
Etanol residual (% v/v)	0,427±0,007 ^a	0,012±0,002 ^b

Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las medias de los productos.

7.3.2.1. Acidez

Los elevados valores de acidez volátil permitieron inferir que la acidez de los vinagres se debió casi exclusivamente a la biooxidación, mientras que la participación de otros ácidos resultó de menor envergadura.

Al finalizar el período de maduración de 6 meses, las muestras de vinagre (Va6) mostraron un aumento de 7,3 % en la acidez total. Si bien no se

registró variación en la acidez fija, el incremento en la acidez volátil (7,6 %) permitió concluir que durante este periodo las BAA continuaron la transformación del etanol remanente en ácido acético. Este comportamiento, similar al observado en los vinagres de naranja (Capítulo 4, apartado 4.3.2.1) se ha justificado por el hecho que estas bacterias no mueren necesariamente en condiciones de privación de oxígeno (Fugelsang & Edwards, 2007).

7.3.2.2. pH

Los valores de pH medidos en los vinagres de arándanos fueron los más bajos respecto de referencias bibliográficas para vinagres en general (Acosta Artiles, Hardisson de la Torre, & Romero, 1993; Aguiar et al. 2005; Peixoto Marques et al., 2010). Incluso resultaron inferiores a los determinados en vinagre de naranja (Capítulo 4, apartado 4.3.2.2) y puesto que los ensayos de acetificación se realizaron en similares condiciones, esta diferencia puede atribuirse a la composición en ácidos y a la procedencia de la materia prima de origen.

Luego del período de maduración, las muestras de Va6 presentaron menores valores de pH, seguramente relacionado con la producción de ácido acético en esta etapa, tal como se refirió en el apartado anterior.

7.3.2.3. Densidad

La densidad determinada en los vinagres de arándanos resultó levemente superior a la de vinagres de naranja (Capítulo 4, apartado 4.3.2.3.). Esto se puede atribuir a que para vinagres de naranja, la materia prima de origen fue un vino ya madurado con un alto grado de clarificación, por lo que la turbidez presente en el vinagre fue debida a la suspensión bacteriana. Sin embargo, para la obtención de vinagres de arándanos, se partió de la fruta para elaborar el vino y, si bien éste fue sometido a una filtración previa a la acetificación, su grado de limpidez, a simple vista, fue inferior al primero.

7.3.2.4. Extracto seco. Azúcares reductores totales. Cenizas totales.

Los contenidos de extracto seco, azúcares reductores totales y cenizas totales no experimentaron modificaciones durante el periodo de maduración, al igual que lo sucedido con vinagre de naranjas (Capítulo 4).

7.3.2.5. Etanol residual

Como fue mencionado oportunamente, el vinagre joven debe disponer de un contenido alcohólico remanente ya que de lo contrario, durante el envejecimiento, las BAA podrían consumir el ácido acético formado originando productos de baja calidad. Además, pequeñas cantidades de alcohol presentes en el producto final se combinan lentamente con el ácido acético durante el almacenamiento para producir ésteres, que favorecen la formación del bouquet (Llaguno Marchena & Polo, 1991; Acosta Ariles, Romero, & Hardisson de la Torre, 1993).

Se pueden identificar dos etapas durante el envejecimiento (maduración) de los vinagres: una fase de actividad biológica en la cual las BAA aún presentan algún tipo de actividad fermentativa a pesar de la menor disponibilidad de oxígeno, y una fase de actividad fisicoquímica, sin actividad biológica significativa (Palacios, Valcárcel, Caro, & Pérez, 2002). De acuerdo a esto, y considerando que Va6 presentó una concentración alcohólica inferior respecto de la inicial (Va0), se podría inferir que esta disminución fue producto tanto del metabolismo oxidativo de las BAA como de la formación de ésteres con ácido acético.

7.4. Conclusiones

En general, tanto la fermentación alcohólica como la acetificación y la maduración durante 6 meses, disminuyeron el contenido de antocianinas totales. En cambio, el contenido de fenoles totales aumentó durante la fermentación alcohólica, lo que se atribuyó a un posterior proceso extractivo.

Durante la fermentación acética se acentuaron los procesos oxidativos de los componentes fenólicos, lo que provocó una reducción en su concentración.

La actividad antioxidante, medida con los métodos ABTS y DPPH, presentó una elevada correlación estadística con la concentración de antocianinas y de fenoles totales.

Una alternativa a la dilución para evitar la gelificación después del triturado, es la incorporación de enzimas pectolíticas, lo que podría mejorar sustancialmente la composición de componentes antioxidantes. Ya que con este tratamiento no se lograría incrementar la concentración de antocianinas, adicionalmente y con el objeto de aumentar la calidad nutricional del vinagre respecto del fruto fresco, se podría analizar el agregado de extractos naturales de estos componentes al producto final.

La caracterización del vinagre de arándanos mostró una completa adecuación a los estándares de calidad especificados para vinagres en las legislaciones argentina y española, incluso luego del período de maduración de 6 meses.

Las modificaciones registradas en los parámetros fisicoquímicos analizados fueron aquellas relacionadas con la actividad metabólica de las BAA, es decir, acidez total y volátil, pH y etanol residual, que prosiguió durante la maduración a pesar de la exclusión del oxígeno.

7.5. Bibliografía

- Acosta Artilles, A., Hardisson de la Torre, A., & Romero, C. A. (1993). Caracterización fisico-química de distintos tipos de vinagre. I: Acidez, extracto seco y cenizas. *Revista de Tecnología E Higiene de Los Alimentos*, 245, 99–104.
- Acosta Artilles, A., Romero, C. A., & Hardisson de la Torre, A. (1993). Caracterización fisico-química de distintos tipos de vinagre. II:

- Determinación de algunos parámetros de naturaleza volátil. *Revista de Tecnología E Higiene de Los Alimentos*, 245, 105–108.
- Aguiar, A., de Alencar Nascimento, R. A., Ferretti, L. P., & Gonçalves, A. R. (2005). Determinação de ácidos orgânicos e etanol em vinagres comerciais. *Brazilian Journal of Food Technology*, 51–56.
- Aredes Fernandez, P. A., Farias, M. E., & Nadra, M. C. (2010). Interaction between *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii* isolated from wine. Modification of available nitrogen and biogenic amine production. *Biotechnology Letters*, 32, 1095–1102.
- Badui Dergal, S. (2013). *Química de los alimentos* (5° edición.). México: Pearson.
- Bosso, A., & Guaita, M. (2008). Study of some factors involved in ethanal production during alcoholic fermentation. *European Food Research and Technology*, 227, 911–917.
- Brandolini, V., Fiore, C., Maietti, A., Tedeschi, P., & Romano, P. (2007). Influence of *Saccharomyces cerevisiae* strains on wine total antioxidant capacity evaluated by photochemiluminescence. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(4), 581–586.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 22, 25–30.
- Brownmiller, C., Howard, L. R., & Prior, R. L. (2008). Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blueberry products. *Journal of Food Science*, 73(5), H72–H79.
- Budak, H. N., & Guzel-Seydim, Z. B. (2010). Antioxidant activity and phenolic content of wine vinegars produced by two different techniques. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(12), 2021–2026.

- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. D. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. a., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food Chemistry*, 113(4), 859–871.
- Cerezo, A. B., Cuevas, E., Winterhalter, P., Garcia-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2010). Anthocyanin composition in *Cabernet Sauvignon* red wine vinegar obtained by submerged acetification. *Food Research International*, 43(6), 1577–1584.
- Cvejić, J., & Atanacković, M. (2015). Effect of wine production techniques on wine resveratrol and total phenolics. En: V. R. Preedy (Ed.), *Processing and impact on active components in food* (1st. ed., pp. 501–508). United States of America: Academic Press, Elsevier.
- Damodaran, S., Parkin, K. L., & Fennema, O. R. (2010). *Fennema. Química de los alimentos*. (S. Damodaran, K. L. Parkin, & O. R. Fennema, Eds.) (3° edición.). Zaragoza, España.: Editorial Acribia S.A.
- Dávalos, A., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2005). Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. *Food Chemistry*, 93(2), 325–330.
- Delteil, D., Feuillat, M., Guilloux Benatier, M., & Sapis, J. C. (2000). Los vinos blancos secos. En: C. Flanzy (Ed.), *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos* (pp. 443–461). Madrid: Vicente ediciones/Ediciones Mundi-Prensa Publishers.
- Eichholz, I., Huyskens-Keil, S., & Rohn, S. (2015). Blueberry phenolic compounds: fruit maturation, ripening and post-harvest effects. En: V. R. Preedy (Ed.), *Processing and impact on active components in food*. (1 st., pp. 173–180). United States of America: Academic Press, Elsevier.
- Fugelsang, K., & Edwards, C. (2007). *Wine Microbiology. Practical Applications and Procedures* (2° edition.). Springer.
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry, Unit F1.2*, 1–13.

- Hernández-Herrero, J. A., & Frutos, M. J. (2011). Degradation kinetics of pigment, colour and stability of the antioxidant capacity in juice model systems from six anthocyanin sources. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(12), 2550–2557.
- Jaehrig, S. C., Rohn, S., Kroh, L. W., Fleischer, L. G., & Kurz, T. (2007). In vitro potential antioxidant activity of (1-3), (1-6)- β -D-glucan and protein fractions from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4710–4716.
- Jeantet, R., Croguennec, T., Schuck, P., & Brulé, G. (2010). *Ciencia de los alimentos. Volumen 1: Estabilización biológica y fisicoquímica*. (Lavoisier, Ed.). Zaragoza, España.: Editorial Acribia S.A.
- Kalt, W., Lawand, C., Ryan, D. A. J., McDonald, J. E., Donner, H., & Forney, C. F. (2003). Oxygen radical absorbing capacity, anthocyanin and phenolic content of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L) during ripening and storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128, 917–923.
- Klopotek, Y., Otto, K., & Boehm, V. (2005). Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins and antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5640–5646.
- Kopjar, M., Bilić, B., & Piližota, V. (2011). Influence of different extracts addition on total phenols, anthocyanin content and antioxidant activity of blackberry juice during storage. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 3, 9–15.
- Lee, J., & Wrolstad, R. E. (2004). Extraction of anthocyanins and polyphenolics from blueberry-processing waste. *Journal of Food Science*, 69, 564–573.
- Lewis, C., & Walker, J. (1995). Effect of polysaccharide on the colour of anthocyanins. *Food Chemistry*, 54, 315–319.
- Llaguno Marchena, C., & Polo, M. C. (1991). La composición química de los vinagres vínicos. En: C. Llaguno Marchena & M. C. Polo (Eds.), *El Vinagre*

de Vino (pp. 105–132). Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

- Mazauric, J. P., & Salmon, J. M. (2005). Interactions between yeasts lees and wine polyphenols during simulation of wine aging: I. Analysis of remnant polyphenolic compounds in the resulting wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 5647–5653.
- Moldovan, B., David, L., Chisbora, C., & Cimpoiu, C. (2012). Degradation kinetics of anthocyanins from european cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) fruit extracts. Effects of temperature, pH and storage solvent. *Molecules*, *17*(10), 11655–11666.
- Morata, A., Gomez-Cordoves, M. C., Colomo, B., & Suarez, J. . (2005). Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv. Graciano grapes. *European Food Research and Technology*, *220*, 341–346.
- Palacios, V., Valcárcel, M., Caro, I., & Pérez, L. (2002). Chemical and biochemical transformations during the industrial process of sherry vinegar aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(15), 4221–4225.
- Peixoto Marques, F. P., Spinosa, W., Fernandes, K. F., de Souza Castro, C. F., & Caliari, M. (2010). Padrões de identidade e qualidade de fermentados acéticos comerciais de frutas e vegetais. *Food Science and Technology (Campinas)*, *30*(1).
- Pérez-Trujillo, J. P., Hernández, Z., López-Bellido, F. J., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2011). Characteristic phenolic composition of single-cultivar red wines of the Canary Islands (Spain). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(11), 6150–6164.
- Proctor, A., & Peng, L. C. (1989). Pectin transitions during blueberry fruit development and ripening. *Journal of Food Science*, *54*(2), 385–387.
- Razmkhab, S., Lopez-Toledano, A., Ortega, J. M., Mayen, M., Merida, J., & Medina, M. (2002). Adsorption of phenolic compounds and browning products in white wines by yeasts and their cell walls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 7432–7437.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
- Rein, M. (2005). *Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins*. Academic Dissertation. Helsinki: University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology.
- Rodarte Castrejón, A. D., Eichholz, I., Rohn, S., Kroh, L. W., & Huyskens-Keil, S. (2008). Phenolic profile and antioxidant activity of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) during fruit maturation and ripening. *Food Chemistry*, 109(3), 564–572.
- Routray, W., & Orsat, V. (2011). Blueberries and their anthocyanins: factors affecting biosynthesis and properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(6), 303–320.
- Sablani, S. S. (2015). Freezing of fruits and impact on anthocyanins. En: V. R. Preedy (Ed.), *Processing and impact on active components in food* (1^o edition.). New York: Academic Press, Elsevier.
- Saura-Calixto, F. (1998). Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4303–4306.
- Su, M.-S., & Chien, P.-J. (2007). Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. *Food Chemistry*, 104(1), 182–187.
- Su, M.-S., & Silva, J. L. (2006). Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) by-products as affected by fermentation. *Food Chemistry*, 97(3), 447–451.
- Syamaladevi, R. M., Andrews, P. K., Davies, N. M., Walters, T., & Sablani, S. S. (2012). Storage effects on anthocyanins, phenolics and antioxidant activity of thermally processed conventional and organic blueberries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(4), 916–924.

- Ubeda, C., Callejón, R. M., Hidalgo, C., Torija, M. J., Troncoso, A. M., & Morales, M. L. (2013). Employment of different processes for the production of strawberry vinegars: effects on antioxidant activity, total phenols and monomeric anthocyanins. *LWT - Food Science and Technology*, 52(2), 139–145.
- Ubeda, C., Hidalgo, C., Torija, M. J., Mas, A., Troncoso, A. M., & Morales, M. L. (2011). Evaluation of antioxidant activity and total phenols index in persimmon vinegars produced by different processes. *LWT - Food Science and Technology*, 44(7), 1591–1596.
- Wang, W., & Xu, S. (2007). Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering*, 82, 271–275.
- Wrolstad, R. E. (1993). *Color and pigment analyses in fruit products*. Oregon.
- Zadernowski, R., Naczek, M., & Nesterowicz, J. (2005). Phenolic acid profiles in some small berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2118–2124.
- Zapata, L. M. (2014). *Obtención de extracto de antocianinas a partir de arándanos para ser utilizado como antioxidante y colorante en la industria alimentaria*. Universitat Politècnica de València.

III. Conclusiones generales

- El estudio realizado para la selección del cultivo iniciador para los procesos de acetificación, indicó que el mayor crecimiento y velocidad de formación de ácido acético, se obtuvieron con un inóculo de *Acetobacter* sp. aislado a partir de naranjas de la región de Salto Grande. El medio de cultivo que dio los mejores resultados fue el RAE (1a/2e) y el sistema de suministro de oxígeno, mediante inyección de aire.
- Las variables de proceso estudiadas, velocidad de agitación y caudal de aire, tuvieron influencia significativa sobre la velocidad de acetificación de un sustrato alcohólico de naranjas en sistema batch, mientras que la velocidad de agitación, presentó un efecto significativo sobre el rendimiento GK. De esta manera, la combinación de variables de proceso que maximizaron ambas respuestas simultáneamente fue: 701 rpm y 0,36 vvm y, en estas condiciones, correspondió una $r_A=2,28$ g/L/h y un $R_{GK}=89,63$ %. El proceso de acetificación desarrollado según esos parámetros, presentó una $r_A=2,29\pm 0,17$ g/L/h y un $R_{GK}=88,19\pm 5,00$ %, ambos valores muy similares a los predichos por el modelo.
- Para el proceso discontinuo de acetificación de un sustrato alcohólico de arándanos, el análisis de las variables de proceso resultó similar a su análogo de naranjas: la velocidad de agitación y caudal de aire, tuvieron influencia significativa sobre la velocidad de acetificación, mientras que la velocidad de agitación, presentó un efecto significativo sobre el rendimiento GK. La combinación de variables de proceso que maximizaron ambas respuestas simultáneamente fue: 677 rpm y 0,38 vvm y, en estas condiciones, correspondió una $r_A=1,53$ g/L/h y un $R_{GK}=87,04$ %. El proceso de acetificación desarrollado según esos parámetros presentó una $r_A=1,52\pm 0,06$ g/L/h y un $R_{GK}=85,16\pm 2,45$ %, ambos valores muy similares a los predichos por el modelo.
- A elevados niveles de los factores V_{ag} y Q_a (alrededor de 700 rpm y 0,4-0,6 vvm), se registró una disminución en r_A durante los procesos biooxidativos de ambas materias primas en estudio. Esto pudo ser consecuencia de un efecto de inhibición sobre la velocidad de crecimiento

específico de las BAA, causado por un exceso en la concentración de oxígeno disuelto en el caldo de fermentación.

- En la acetificación del sustrato alcohólico de naranjas, así como en su análogo de arándanos, se verificó una elevada correlación lineal entre la velocidad de crecimiento microbiano (r_X) y la velocidad de acetificación (r_A), lo que implica que un aumento en la primera produjo un incremento en r_A .
- La velocidad de acetificación y la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_M) en los ensayos de acetificación batch con sustrato alcohólico de naranjas, resultaron superiores a los hallados para vinagre de arándanos. Esta diferencia se atribuyó a dos causas posibles. La primera se relaciona con la especie de *Acetobacter* inoculada, que fue aislada a partir de naranjas de la región, con lo que se infiere una mayor dificultad para adaptarse a un sustrato diferente. Por otra parte, la presencia de mayores concentraciones de compuestos fenólicos en los arándanos podría haber ejercido algún tipo de actividad inhibitoria hacia las BAA. La mayor extensión de la fase lag y la menor tasa de crecimiento durante la etapa oxidativa con sustrato alcohólico de arándanos, podrían reforzar esta hipótesis.
- El desarrollo del proceso oxidativo en sistema semicontinuo permitió el incremento de la velocidad de acetificación respecto de un sistema discontinuo desarrollado en las mismas condiciones operativas. Sin embargo, no se determinaron diferencias estadísticas significativas en los rendimientos GK, lo que indicó que las pérdidas por evaporación se mantuvieron constantes durante el proceso.
- El primer ciclo del sistema semicontinuo del proceso de obtención de vinagre de naranja presentó una fase lag de menor extensión respecto de la observada en su análogo para vinagre de arándanos. Las razones argumentadas previamente en el análisis de r_A y μ_M , son aplicables en este caso, es decir, el origen cítrico de la especie de *Acetobacter* inoculada permitió una adaptación más rápida al medio, y por otro lado, las menores concentraciones de compuestos fenólicos presentes en las naranjas, con una consiguiente menor actividad antimicrobiana.

- En el segundo ciclo del proceso semicontinuo, la velocidad de acetificación aumentó entre 2,2-2,5 y 2,7-2,9 veces con respecto a la calculada en el primer ciclo para vinagre de naranjas y de arándanos, respectivamente. Este comportamiento pudo deberse a la adaptación del cultivo de *Acetobacter* sp. a las condiciones ambientales de elevada acidez predominantes al iniciar un nuevo ciclo oxidativo. En el caso del vinagre de arándanos, también podría atribuirse a un efecto de dilución de la concentración de compuestos fenólicos, luego de la recarga de medio de cultivo fresco.
- Tanto para el vinagre de naranjas como para el de arándanos, la evaluación de la proporción de carga en sistema semicontinuo indicó que, para los niveles de carga/descarga de 40% y 60 %, no hubo diferencias estadísticas significativas para las respuestas velocidad de acetificación y rendimiento GK. Por lo tanto, con el objeto de desarrollar una fermentación económicamente eficiente y obtener mayor volumen de producto, se puede fijar una proporción de C/D de 60% para cada ciclo de un proceso semicontinuo.
- La caracterización de los vinagres de naranjas y de arándanos obtenidos en las condiciones que maximizaron las respuestas analizadas, se encuadró dentro de los estándares de calidad especificados para vinagres de frutas en las legislaciones argentina y española, incluso después de un período de maduración de 6 meses. Puesto que estos estándares incluyen sólo la acidez total y el etanol residual, el análisis de otras características reglamentadas para vinagres de vino también mostraron una completa adecuación a las especificadas en ambas reglamentaciones.
- Los componentes antioxidantes analizados en el vinagre de naranjas, ácido ascórbico, fenoles totales y carotenoides totales, así como la actividad antioxidante, disminuyeron a lo largo de todo el proceso. La mayor reducción se produjo durante la acetificación, probablemente a causa de la oxidación de los componentes por el continuo ingreso de aire al sistema. La mayor contribución a la actividad antioxidante se debió a la concentración de ácido ascórbico y compuestos fenólicos.

- De los componentes antioxidantes analizados en el vinagre de arándanos, la concentración de antocianinas disminuyó en cada etapa del proceso. Si bien, el contenido de fenoles totales disminuyó desde la materia prima hasta el producto final, durante la fermentación alcohólica se registró un aumento que se atribuyó a un proceso de extracción fenólica. La actividad antioxidante, medida con los métodos ABTS y DPPH, presentó una elevada correlación estadística con la concentración de antocianinas y fenoles totales.
- Dado que uno de los principales causantes de la disminución de los componentes antioxidantes, durante la obtención de vinagre de arándanos, fue la dilución efectuada para evitar la gelificación posterior al triturado, una alternativa sería la incorporación de enzimas pectolíticas, con lo que se podría mejorar sustancialmente su composición. Adicionalmente, y con el objeto de aumentar la calidad nutricional del vinagre respecto del fruto fresco, se propone evaluar el agregado de extractos naturales de estos componentes al producto final.