

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE
APURÍMAC**

FACULTAD DE INGENIERÍA

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**



**OBTENCION DE VINAGRE A PARTIR DE FRUTAS EN
DESCARTE**

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL

JOSEANTONIO SERRANO BUSTINZA

Abancay, Diciembre del 2010

P E R U



UNIVERSIDAD NACIONAL MICHAELA BASTIDAS DE APURIMAC	
CÓDIGO	MFN
T IAG S 2010	BIBLIOTECA CENTRAL 28 MAR 2012
FECHA DE INGRESO:	
Nº DE INGRESO:	00233



**OBTENCION DE VINAGRE A PARTIR DE FRUTAS EN
DESCARTE**

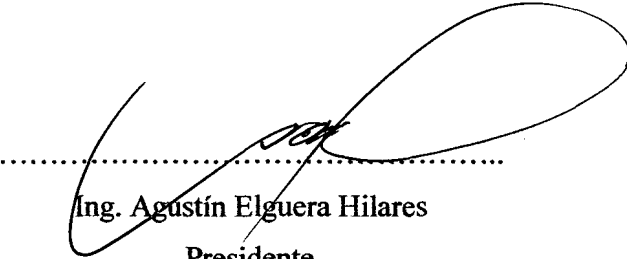


UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

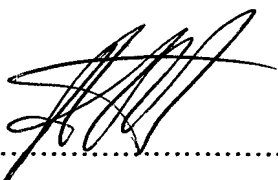
FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

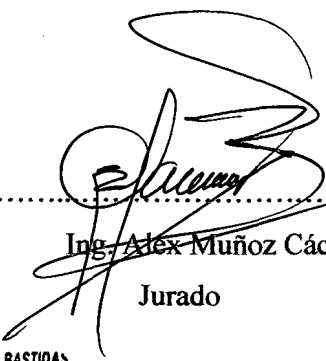
Jurado calificador integrado por:



Ing. Agustín Elguera Hilares
Presidente




Ing. Alfredo Fernández Ayma
Jurado



Ing. Alex Muñoz Cáceres
Jurado

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC



Ing. M.Sc. Víctor Hugo Sarmiento Casavilca
DOCENTE

Ing. M.Sc. Víctor Sarmiento Casavilca
Asesor



DEDICATORIA

A mi padre Pedro y mis hermanos Norma, Julia, Margoth, Juan, Alex y Marizol, quienes me brindaron su apoyo incondicional durante toda mi formación profesional y por ser los artífices del presente trabajo de tesis.

A la memoria de mi madre a quien, por su temprana partida nunca pude prodigarle completamente mi amor fraternal y cuya ausencia no he logrado superar.



AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por acompañarme en todas mis actividades y entregarme la fuerza necesaria para terminar esta importante etapa de mi vida.

Asimismo hago patente mi agradecimiento al Dr. Ing. Waldir Estela Escalante y al Ing. M.Sc. Víctor Sarmiento Casavilca, personas que gentilmente asumieron la responsabilidad de mi acción y de la marcha de la tesis.

A mi padre y a mis hermanos por la confianza puesta en Mí y por el gran esfuerzo realizado para terminar este proyecto.

También reconozco la ayuda de los evaluadores por el análisis crítico y oportunas sugerencias en la redacción final de la tesis.

A mis amigos y compañeros y a todas aquellas personas que directa o indirectamente contribuyeron al logro de una de mis metas.

RESUMEN

Las frutas en descarte no son aptas para su consumo y comercialización, siendo desechadas y desaprovechadas, debido a que no tienen utilidad, producto de los escasos estudios que se realizaron de los posibles usos que se les puede otorgar y al desconocimiento de los procesos tecnológicos y biotecnológicos para su transformación y, esto es el objetivo principal de la presente investigación utilizar frutas de descarte y determinar parámetros de suministro de aire y temperatura de acetificación en la producción de vinagre con características fisicoquímicas y organolépticas aceptables. Para alcanzar el objetivo planteado, se ensayaron el efecto de dos factores: suministro de aire durante la fermentación alcohólica (0 L/h/L y 0,032 L/h/L) y temperatura de acetificación (20°C y 30°C); en las características fisicoquímicas y sensoriales del vinagre obtenido.

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac. Para la obtención del vinagre, en la investigación se utilizó manzanas y plátanos en proporción de 1:1 a quienes se les extrajo el mosto y, esto se reguló a 11°Brix y pH 4.5. Para el proceso de fermentación alcohólica los mostos fueron previamente pasteurizados a 80°C por 20 minutos e inoculados utilizando la cepa de levadura Sc BA-IA-2009-I (5% v/v) aislado de mosto de melaza de caña en proceso de fermentación y, seguidamente se dejó fermentar a 20°C con un suministro de aire de 0 L/h/L. y 0.032 L/h/L. en una cuba acondicionada para tal fin. La conversión del etanol producido durante la fermentación alcohólica de los mostos en ácido acético se llevó a cabo en un biorreactor estándar de acero inoxidable de 25L con 6% v/v de inóculo, temperatura de 20°C y 30°C con una agitación constante de 140 rpm, y un flujo de

aireación de 3.4 L. aire/h /L. de medio, por acción de una población mixta de bacterias acéticas. Una vez obtenido el vinagre se evaluó sus características fisicoquímicas (acidez fija y acidez volátil) y organolépticas (color, sabor, olor, flavor, frutal, astringencia, agrio, alcohólico, acético).

En el presente investigación, durante la fermentación alcohólica, adicionando aire en concentraciones de 0,032 L/h/L se obtuvo mayor concentración de etanol 5,225% y acidez 0,491% comparado con los tratamientos con suministro de aire en concentraciones de 0 L/h/L donde se obtuvo 5,050% de etanol y 0,449% de acidez, a los 84 horas de fermentación. Asimismo, durante la fermentación acética se obtuvo 6,110% de acidez y 0,175% de etanol residual fermentando a temperatura de 30°C en comparación a lo que se consiguió 6,010% de acidez y 0,325% de etanol residual cuando se fermenta a 20°C durante el transcurso de 72 horas de fermentación. Por otra parte, el análisis de varianza a un nivel de significancia del ($p < 0,05$) indica que existe significancia de las variables sobre los factores fisicoquímicos y organolépticos evaluados, obteniéndose un vinagre de características aceptables según lo reportado por los jueces y la concentración de acidez fija y acidez volátil. Llegando de esta manera a la conclusión de que las frutas de descarte se pueden utilizar para la obtención de vinagre con características fisicoquímicas y organolépticas aceptables.

Palabras claves: vinagre, fermentación, oxidación, acetificación, frutas.

ABSTRACT

Discard fruits are not suitable for consumption and marketing, and missed being discarded because of no use, the product of the few studies conducted on the possible uses that can be granted and ignorance of the technological process and for processing and biotechnology, this is the main objective of this research using discarded fruits and determine parameters of the air supply and temperature of acidification on the production of vinegar with acceptable physicochemical and organoleptic characteristics. To achieve the objective set, tested the effect of two factors: air supply during alcoholic fermentation (0 L / h / L and 0.032 L / h / L) and temperature of acidification (20 ° C and 30 ° C) on the physicochemical characteristics Sensory and vinegar obtained.

This research was conducted at the Laboratory of Biotechnology, National University of Apurimac Micaela Bastidas. To obtain the vinegar, research apples and bananas are used in 1:1 ratio who are removed must and this is regulated to 11 ° Brix and pH 4.5. For the alcoholic fermentation of musts previously pasteurized at 80 ° C for 20 minutes and inoculated using the yeast strain Sc BA-IA-2009-I (5% v / v) isolated from grape cane molasses in fermentation and , then left to ferment at 20 ° C with an air supply of 0 L / h / L. and 0.032 L / h / L. in Cuba equipped for that purpose. The conversion of ethanol produced during fermentation of musts in acetic acid takes place in a bioreactor standard stainless steel 25L with 6% v / v of inoculum, temperature of 20oC and 30 ° C with constant stirring at 140 rpm, and aeration flow of 3.4 L. air / h / L. medium by the action of a mixed population of acetic acid bacteria. Once the vinegar is evaluated its



physicochemical properties (acidity and volatile acidity) and organoleptic (color, taste, odor, flavor, fruity, astringent, bitter, alcoholic, acetic).

In the present investigation, during fermentation, adding air at concentrations of 0.032 L / h / L was obtained highest concentration of ethanol and acidity 5.225% 0.491% compared with the air supply treatments at concentrations of 0 L / h / L which yielded 5.050% 0.449% ethanol and acid, to 84 hours of fermentation. Also during the acetic fermentation is obtained 6.110% acidity and 0.175% residual ethanol fermenting at a temperature of 30 ° C in comparison to what you get 6.010% acidity and 0.325% residual ethanol when fermented at 20 ° C during the course of 72 hours of fermentation. Moreover, analysis of variance at a level of significance ($p < 0.05$) indicates that there is significance of the variables on the physicochemical and sensory factors evaluated, resulting in an acceptable characteristics vinegar as reported by judges and acidity and concentration of volatile acidity. Thus reaching the conclusion that culling fruits can be used for the production of vinegar with acceptable physicochemical and organoleptic characteristics.

Keywords: vinegar, fermentation, oxidation, acidification, fruit.



Índice

	Pág.
RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Materia prima para la elaboración de vinagre	3
2.1.1. Generalidades de las frutas	3
2.1.2. Composición química de las frutas	4
2.1.3. Fisiología y características fisiológicas de las frutas	5
2.1.3.1. Fisiología de las frutas	5
2.1.3.2. Características fisiológicas de las frutas	6
2.1.3.2.1. Respiración	7
2.1.3.2.2. Efecto del etileno	8
2.1.4. Deterioro de frutas	10
2.1.4.1. Tipos de deterioro de las frutas	11
2.1.4.1.1. Deterioro físico	11
2.1.4.1.2. Deterioro fisiológico	11
2.1.4.1.3. Deterioro microbiano	12
2.1.4.2. Factores responsables de deterioro de las frutas	12
2.1.4.2.1. Temperatura	12
2.1.4.2.2. Oxígeno	13
2.1.4.2.3. Humedad relativa	13
2.1.4.2.4. Actividad de agua	14
2.1.4.2.5. Microorganismos	14
2.1.5. Perdidas poscosecha de frutas	15
2.2. Fermentación alcohólica	16
2.2.1. Generalidades de la fermentación alcohólica	16
2.2.2. Levaduras en la fermentación alcohólica	17
2.2.2.1. Características generales de las levaduras	17
2.2.2.2. Clasificación de las especies de levaduras	18
2.2.2.3. Aislamiento e identificación de las cepas de levaduras	19
2.2.3. Biosíntesis de la fermentación alcohólica	21
2.2.4. Factores que afectan en la fermentación alcohólica	22
2.2.4.1. Influencia de la temperatura	22
2.2.4.2. Incidencia del oxígeno	24
2.2.4.3. Inhibición por etanol	25
2.2.4.4. pH	26
2.2.5. Proceso de fermentación alcohólica	26



2.2.6. Productos secundarios de la fermentación alcohólica	27
2.3. Fermentación acética	27
2.3.1. Generalidades del vinagre	27
2.3.2. Bacterias acéticas	28
2.3.2.1. Generalidades de las bacterias acéticas	28
2.3.2.2. Clasificación de las bacterias acéticas	29
2.3.2.3. Aislamiento e identificación de bacterias acéticas	31
2.3.3. Biosíntesis del vinagre	33
2.3.4. Factores que afectan en la fermentación acética	34
2.3.4.1. Características del sustrato	34
2.3.4.2. Influencia de la temperatura	35
2.3.4.3. Influencia de la aireación	35
2.3.4.4. Concentración de inóculo	36
2.3.5. Métodos de producción de vinagre	36
2.3.5.1. Fermentación en cultivo superficial	37
2.3.5.2. Fermentación en cultivo sumergido	37
2.3.6. Proceso de elaboración de vinagre	38
2.3.7. Compuestos aromáticos en vinagre	38
2.4. Evaluación sensorial	39
2.4.1. Las propiedades organolépticas y los sentidos del ser humano	39
2.4.1.1. El sabor y el sentido del gusto	39
2.4.1.2. El olor y el sentido del olfato	40
2.4.1.3. El color y el sentido de la vista	40
2.4.2. Factores que influyen en la evaluación sensorial	41
2.4.2.1. Aspectos ambientales	41
2.4.2.2. Aspectos prácticos	42
2.4.2.3. Aspectos informativos	43
2.4.2.4. Aspectos humanos	44
2.4.3. Los jueces para el análisis sensorial	44
2.4.3.1. Jueces afectivos	44
2.4.3.2. Jueces analíticos	45
2.4.4. Condiciones de prueba para el análisis sensorial	46
2.4.4.1. Área de prueba y preparación	46
2.4.4.2. Temperatura de las muestras	47
2.4.4.3. Horario de las pruebas	47
2.4.4.4. Cantidad de muestras	47
2.4.4.5. Número de muestras	48
2.4.5. Métodos de evaluación sensorial	48
2.4.5.1. Pruebas afectivas	48
2.4.5.2. Pruebas discriminativas	49
2.4.5.3. Pruebas descriptivas	49



2.4.6.	Análisis estadístico en la evaluación sensorial	50
III:	MATERIALES Y METODOS	51
3.1.	Obtención y acondicionamiento de la materia prima	51
3.2.	Fermentación alcohólica del mosto de frutas de descarte	51
3.2.1.	Obtención de una cepa de levadura para la fermentación alcohólica	51
3.2.1.1.	Aislamiento e identificación de levaduras	51
3.2.1.1.1.	Aislamiento de levaduras	52
3.2.1.1.2.	Identificación de la levadura	53
3.2.1.1.2.1.	Identificación morfológica de la levadura	53
3.2.1.1.2.2.	Identificación fisiológica de la levadura	53
3.2.1.2.	Prueba de tolerancia al etanol y ácido acético	54
3.2.1.2.1.	Tolerancia al etanol	54
3.2.1.2.2.	Tolerancia al ácido acético	55
3.2.1.3.	Producción de etanol de la levadura aislada	55
3.2.1.3.1.	Preparación de inóculo	55
3.2.1.3.2.	Fermentación de mosto de frutas de descarte	56
3.2.2.	Proceso de fermentación alcohólica	56
3.2.4.1.	Preparación de inóculo	56
3.2.4.2.	Fermentación alcohólica	57
3.3.	Obtención del vinagre de frutas de descarte	57
3.3.1.	Producción del inóculo e identificación de bacterias acéticas	57
3.3.1.1.	Producción de inóculo	58
3.3.1.2.	Identificación de las bacterias acéticas	58
3.3.2.	Proceso de fermentación acética	59
3.4.	Evaluación del producto final	59
3.4.1.	Evaluación fisicoquímica del vinagre	59
3.4.2.	Evaluación organoléptica del vinagre	60
3.4.3.	Procesamiento y análisis de datos	61
IV:	RESULTADOS Y DISCUSIONES	62
4.1.	Obtención y acondicionamiento de la materia prima	62
4.2.	Fermentación alcohólica del mosto de frutas de descarte	62
4.2.1.	Obtención de una cepa de levadura para la fermentación alcohólica	62
4.2.1.1.	Aislamiento e identificación de levaduras	62
4.2.1.1.1.	Aislamiento de levaduras	62
4.2.1.1.2.	Identificación de levadura	63
4.2.1.1.2.1.	Identificación morfológica de la levadura	63
4.2.1.1.2.2.	Identificación fisiológica de la levadura	64
4.2.1.2.	Prueba de tolerancia al etanol y ácido acético	65
4.2.1.2.1.	Tolerancia al etanol	66

4.2.1.2.2. Tolerancia al ácido acético	67
4.2.1.3. Producción de etanol de la levadura aislada	68
4.2.2. Proceso de fermentación alcohólica	70
4.3. Obtención del vinagre de frutas de descarte	74
4.3.1. Producción de inóculo e identificación de bacterias acéticas	74
4.3.2. Proceso de fermentación acética	74
4.4. Evaluación del producto final	78
4.4.1. Evaluación fisicoquímica del vinagre	78
4.4.2. Evaluación organoléptica del vinagre	80
4.4.2.1. Pruebas afectivas del vinagre	80
4.4.2.2. Perfil sensorial del vinagre	83
V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	87
5.1. Conclusiones	87
5.2. Recomendaciones	88
VI: BIBLIOGRAFÍA	89
ANEXOS	

Índice de cuadros

Cuadro 01: Composición química de las frutas	4
Cuadro 02: Clasificación de frutas climatéricas y no climatéricas	8
Cuadro 03: Clasificación de las frutas de acuerdo a su producción de etileno	10
Cuadro 04: Clasificación de las levaduras responsables de la fermentación alcohólica	19
Cuadro 05: Clasificación de los géneros y especies de bacterias acéticas.	31
Cuadro 06: Composición química para 100 ml de solución Rauling	53
Cuadro 07: Composición del medio Manitol	58



Índice de tablas

Tabla 01. Intensidades respiratoria y fermentaria de la levadura	23
Tabla 02: Medios de cultivo para el aislamiento de bacterias acéticas	33
Tabla 03: Diseño experimental de la investigación	61
Tabla 04: Evaluación de la capacidad fermentativa de azúcares de la levadura aislada	64
Tabla 05: Evaluación de la tolerancia al etanol exógeno por la levadura aislada	66
Tabla 06: Efecto del ácido acético exógeno en la fermentación de la levadura aislada	67
Tabla 07: Evaluación fisicoquímicas del vinagre obtenido	77
Tabla 08: Evaluación de las pruebas afectivas del vinagre obtenido	80
Tabla 09: Evaluación de los perfiles sensoriales del vinagre obtenido	85



Índice de figuras

Figura 01: Biosíntesis del etanol – vía de la glicolisis	21
Figura 02: Biosíntesis de la conversión de etanol a ácido acético	34
Figura 03: Colonia de la levadura aislada	64
Figura 04: Cinética de la producción de etanol por la cepa Sc BA-IA-2009-I	68
Figura 05: Cinética del etanol y °Brix en la fermentación alcohólica	70
Figura 06: Cinética de la acidez y pH en la fermentación alcohólica	72
Figura 07: Cinética de etanol y ácido acético en la fermentación acética	74
Figura 08: Cinética del pH en la fermentación acética	76
Figura 09: Expresión gráfica de los perfiles sensoriales del vinagre	83

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se calcula que entre el 25% y 40% de las cosechas de frutas se pierden a causa de su rápida descomposición, conservación inadecuada, magulladuras, infestación de plagas, forma de cosecha, transporte, comercialización, entre otros. Es fácil encontrar en los campos de cultivo al final de cada cosecha considerables cantidades de frutas en descarte, así mismo en los almacenes de los supermercados y, al final de las ferias, donde se desechan frutos no aptos para su consumo y comercialización.

Las frutas en descarte son materia prima potencial para la agroindustria que en la actualidad no está siendo aprovechada. Esta investigación pretende desarrollar una nueva alternativa a partir de las frutas que se desechan para darle una utilidad y un valor agregado a este producto, en este caso, la materia prima no generaría ningún gasto, así que el costo del producto sería muy bajo.

El vinagre ha formado parte de la alimentación humana desde la antigüedad, en nuestro medio el consumo de vinagre es considerable, su elaboración tradicional es a partir de aguardiente, actualmente las frutas sanas y maduras son utilizadas también para la elaboración de vinagre, un producto saludable y con mejores características sensoriales. Sin embargo, las frutas en descarte también pueden utilizarse para este propósito y, este es el motivo de la investigación.

Mejía *et. al.* 2002 utilizó residuo de mango para la obtención de azúcares fermentables; Pizarro, 2005 utilizó residuos de torta de prensa de arándanos para la

elaboración de vinagre; así como también Richardson, 1967 y Horiuchi *et al.*, 2004 utilizaron residuos de piña en la elaboración de vinagre. Entonces se puede verificar que diversos autores utilizaron residuos orgánicos para la elaboración de productos fermentados como una manera de otorgar valor adicional y proponer el uso de los residuos agroindustriales.

Los objetivos de la investigación fueron:

Objetivo general

- Utilizar frutas en descarte y determinar parámetros de suministro de aire y temperatura de acetificación en la producción de vinagre con características fisicoquímicas y organolépticas aceptables.

Objetivos específicos

- Determinar la influencia de la aireación suministrada durante la fermentación alcohólica en las características fisicoquímicas y organolépticas del vinagre elaborado a partir de frutas en descarte.
- Determinar la influencia de la temperatura de acetificación del mosto fermentado en las características fisicoquímicas y organolépticas del vinagre obtenido a partir de frutas en descarte.

En este trabajo se estudio la influencia de la aireación suministrada durante la fermentación alcohólica, así como tambien la temperatura de acetificación. Se espera demostrar que ambos factores influyen significativamente en las características fisicoquímicas y organolépticas del vinagre obtenido a partir de frutas en descarte.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Materia prima para la elaboración de vinagre

2.1.1. Generalidades de las frutas

Las frutas son elementos importantes de la alimentación humana, que han formado parte de la dieta humana desde los albores de la historia (Yahia *et al.*, 1992). Las frutas, son productos vegetales con sabores aromáticos que son naturalmente dulces y que son aptas para el consumo humano (Wills *et al.*, 1999). Existen diversas frutas que son utilizadas como materia prima para la elaboración de vinagre, usualmente las manzanas son las más usadas, sin embargo, cualquier fruta es buena para elaborar este producto siendo posible obtener una gran variedad de sabores como vinagres de: higos, piña, plátano, mango, fresa, mandarina, naranja, ciruela, durazno, etc. (Pizarro, 2005).

Bortolini *et al.*, 2001 considera al vinagre de frutas superior en calidad sensorial y nutritiva, comparado con los otros tipos de vinagre, presentando características de sabor y aroma propio. Por otra parte, Weiser, 1962 y Wood, 1985 consideran que para producir un producto de calidad, las frutas utilizadas deberían ser de buena calidad sin contaminación alguna y en su estado máximo de maduración. Sin embargo, en la actualidad la utilización de residuos en la elaboración de productos fermentados y específicamente la producción de vinagre ha sido constatada y llevada a cabo por diversos autores Richardson, 1967; Horiuchi *et al.*, 2004 y Pizarro, 2005 como una manera de otorgar valor adicional y proponer el uso de los residuos agroindustriales.

2.1.2. Composición química de las frutas

En el cuadro 01 se muestra la composición química de las frutas (manzana y plátano) según Wills, 1984 y Wills *et al.*, 1999.

Cuadro 01: Composición química de las frutas

Composición	Producto	
	Manzana	Plátano
Agua	84,3	75,2
Carbohidratos:		
Glucosa	3	4
Fructosa	3	4
Sacarosa	2	10
Almidón	0,2	3,1
Fibra dietética	2,3	2,8
Proteínas	0,3	1,7
Lípidos	0,1	0,1
Ácidos orgánicos (ácidos dominantes)	Ácido málico	Ácido málico
Vitaminas:		
Vitamina C	5	12
Vitamina A	0	0,1
Minerales:		
Potasio	100	350
Calcio	4	5
Componentes aromáticos	2-Metilbutirato de etilo	Isopentanol y eugenol

Datos en g/100 g de porción comestible para los macronutrientes, y mg/100g de porción comestible para vitaminas y minerales. La composición química esta en base a frutas en condiciones óptimas de madurez.

Fuente: Wills, 1984 y Wills *et al.*, 1999.

2.1.3. Fisiología y características fisiológicas de las frutas

2.1.3.1. Fisiología de las frutas

El desarrollo fisiológico de las frutas se divide en tres etapas fundamentales subsiguientes a la germinación y el crecimiento: la maduración fisiológica, la maduración organoléptica y la senescencia (Leopold *et al.*, 1975; Cheftel, 1976; Wills, 1984 y Gallo, 1993). La maduración fisiológica suele iniciarse antes de que termine el crecimiento celular y finaliza, más o menos, cuando las frutas se encuentren fisiológicamente en su máximo estado de crecimiento y desarrollo, y todas sus partes especialmente las semillas estén formadas y aptas para la producción de nuevas plantas; la evolución de la maduración fisiológica sólo se completa adecuadamente cuando el fruto se encuentra en la planta (Gallo, 1993 y Wills, 1984).

La maduración organoléptica se define como una etapa donde las frutas sufren numerosos cambios fisicoquímicos que determinan su calidad al ser adquirida por el consumidor; la madurez organoléptica, es el conjunto de cambios externos, de color, sabor, olor y de textura que un fruto experimenta cuando alcanza su máximo tamaño y completa su desarrollo (Cheftel, 1976). Por otra parte, la maduración organoléptica se considera como un proceso enfático en la vida de las frutas; transforma un tejido fisiológicamente maduro pero no comestible, en otro visual, olfativo y gustativamente atractivo (Leopold *et al.*, 1975 y Wills, 1984). Asimismo, la maduración organoléptica señala el final del desarrollo de un fruto y el comienzo de su senescencia; ordinariamente es un proceso irreversible (Wills *et al.*, 1999).

Por otro lado, la senescencia de las frutas viene a ser la última etapa del desarrollo fisiológico de las frutas, y se define como un periodo durante el cual los procesos bioquímicos anabólicos (sintéticos) dan paso a los catabólicos (degenerativos), los que conduce al envejecimiento y finalmente, a la muerte celular (Wills *et al.*, 1999).

La mayoría de las frutas pueden madurar completamente sobre la planta; sin embargo por motivos tecnológicos o económicos, algunas frutas se recogen antes de su completa maduración. La maduración fisiológica de las frutas exige que permanezcan unidas a las plantas del que proceden, pero la maduración organoléptica y la senescencia pueden tener lugar postcosecha. Las frutas se cosechan solo fisiológicamente maduras o fisiológicamente y organolépticamente maduras (Cheftel, 1976 y Wills *et al.*, 1999).

2.1.3.2. Características fisiológicas de las frutas

Las frutas son estructuras vivas, que se encuentran activas tanto cuando están unidas a la planta de procedencia así como posterior a su recolección (Wills *et al.*, 1999). Las frutas después de ser recolectadas continúan desarrollando los procesos metabólicos y manteniendo los sistemas fisiológicos, una característica muy importante de las frutas es el hecho de que respiran tomando oxígeno y desprendiendo dióxido de carbono y calor, así como también transpiran; es decir, pierden agua (Cheftel, 1976; Pantastico, 1981 y Azcon *et al.*, 2003).

En las frutas, mientras permanece unida a las plantas de procedencia, las pérdidas ocasionadas por la respiración y la transpiración se compensan mediante el flujo de la

savia, que contiene agua, fotosintatos (especialmente sacarosa y almidón) y minerales, en tanto que tras la recolección continúan respirando y transpirando y, como han perdido contacto con la fuente de agua, fotosintatos y minerales, dependen exclusivamente de sus reservas alimenticias y de su propio contenido en agua (Azcon *et al.*, 2003), pero la pérdida de sustratos respirables no se compensa y empieza el proceso de deterioro (Cheftel, 1976).

2.1.3.2.1. Respiración

La respiración es un proceso por el cual los productos más complejos normalmente presentes en las células, como los carbohidratos, proteínas y lípidos son transformados en formas más simples para proveer las demandas energéticas que requiere la fruta para su actividad funcional vital y para la síntesis de metabolitos secundarios (Flores, 1994 y Kader, 2002). La respiración puede tener lugar en presencia de oxígeno “respiración aeróbica” o en su ausencia “respiración anaeróbica; a veces, denominada fermentación” (Pesarakli, 2002). La velocidad con que respira un producto constituye un índice de la actividad metabólica de sus tejidos y es una guía útil para calcular cuánto puede durar su vida comercial (Wills *et al.*, 1999).

La actividad respiratoria de un grupo de frutas aumenta de un modo muy apreciable durante la maduración organoléptica a este incremento de la actividad respiratoria se le denomina climaterio y al grupo de frutas que lo presentan se clasifican como frutos climatéricos; aquellas frutas que no exhiben un fenómeno de esta naturaleza se clasifican como no climatéricos (Salisbury *et al.*, 1992 y Wills *et al.*, 1999). En el cuadro 02 se clasifican algunos frutos comunes en climatéricos y no climatéricos.

Cuadro 02: Clasificación de frutas climatéricas y no climatericas.

Frutos climatéricas	Frutos no climatéricas
Manzana (<i>Malus domestica</i>)	Cereza (<i>Prunus avium</i>)
Albaricoque (<i>Prunus armeniaca</i>)	Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)
Aguacate (<i>Persea americana</i>)	Uva (<i>Vitis vinifera</i>)
Plátano (<i>Musa sp.</i>)	Limón (<i>Citrus limon</i>)
Chirimoya (<i>Annona cherimola</i>)	Piña (<i>Ananas comosus</i>)
Higo (<i>Ficus carica</i>)	Mandarina satsuma (<i>Citrus unshu</i>)
Kiwi (<i>Actinidia deliciosa</i>)	Fresa (<i>Fragaria sp.</i>)
Mango (<i>Mangifera indica</i>)	Naranja dulce (<i>Citrus sinensis</i>)
Melón (<i>Cucumis melle</i>)	
Papaya (<i>Carica papaya</i>)	
Melocotón (<i>Prunus persica</i>)	
Pera (<i>Pyrus communis</i>)	
Caqui (<i>Deiospyros kaki</i>)	
Ciruela (<i>Prunus sp.</i>)	
Sandía (<i>Citrullus lanatus</i>)	

Fuente: Wills *et al.*, 1999.

2.1.3.2.2. Efecto del etileno

El etileno es una hormona vegetal denominado como la hormona de la maduración, tiene un doble origen: biológico y no biológico, según se trate del producido por el metabolismo de la fruta, o procedente de la combustión en numerosos procesos industriales (Azcón *et al.*, 2003). Constituye un regulador del proceso de desarrollo, destacando la maduración de los frutos y respuestas a condiciones ambientales, actúa por autoproducción o por adición externa (Zarate, 1993). La relación de la producción de etileno y la tasa de

respiración climatérica, se ha comprobado en diferentes frutas, considerando que este gas es el iniciador de los procesos propios de la maduración (Reid *et al.*, 1970).

La biosíntesis del etileno depende del tipo de tejido y de su estado de desarrollo, en general durante la maduración de las frutas es el momento mas idóneo para su producción (Bradford, 2008). El etileno se sintetiza a partir del aminoácido metionina a través del “Ciclo de Yang”, esta vía cíclica involucra el consumo de energía y de O₂ para producir etileno y CO₂ principalmente (Cervantes, 2002). El mecanismo de acción del etileno está orientado en la actividad de las enzimas responsables de desencadenar toda la serie de eventos que ocurren en la maduración de las frutas (Abeles, 1972).

Entre los numerosos efectos fisiológicos del etileno, se destacan los que afectan directamente la maduración, como son la estimulación de la respiración, la influencia en el metabolismo péptico, favoreciendo el aumento de pectinas solubles y por tanto la reducción de la dureza del endocarpio, degradación de la clorofila, despolimerización de polisacáridos de alto peso molecular, pérdida o disminución de ácidos, taninos y fenoles (Wills, 1984). Debido a ello, el etileno es el principal agente inductor de la maduración de frutas climatéricas y puede causar la maduración prematura de algunas frutas. Entre los principales efectos negativos tenemos: Senescencia acelerada, amarillamiento en algunas frutas, manchas en la epidermis, pardeamiento de pulpa, etc y entre los efectos positivos tenemos: Favorece la abscisión de las frutas, desenverdecimiento de la epidermis, homogenización en la maduración, etc. (Lucangeli *et al.*, 1998). La clasificación de las frutas según su producción de etileno se puede clasificar según el cuadro 03.

Cuadro 03: Clasificación de las frutas de acuerdo a su producción de etileno.

Tasa de síntesis de etileno	C ₂ H ₄ en mg.Kg ⁻¹ .h ⁻¹ a 20 °C	Frutas
Muy baja	< 0,1	Cítricos, uva, frutillas
Baja	0,1 – 1,0	Sandía, pepino
Media	1,0 -10	Plátano, higo, melón
Alta	10 – 100	Manzana, durazno
Muy alta	> 100	Chirimoya y otras

Fuente: Kader, 2002.

2.1.4. Deterioro de las frutas

Las frutas deterioradas, no son aptas para su consumo y comercialización y son frutas que se descartan y se desechan y, no tienen utilidad. Las frutas, son generalmente susceptibles al deterioro, lo que puede ser originado por distintos factores entre ellas tenemos: cambios fisiológicos como la senescencia, daños físico-mecánicos, daños químicos, efecto de los factores ambientales, descomposición por microorganismos y, daños por insectos y roedores (Flores, 1994; Reybert *et al.*, 1995 y Tucker, 2008) son factores que perjudican la comestibilidad de las frutas.

El deterioro de frutas, se pueden presentar en el centro de producción, cosecha, transporte y almacenamiento este deterioro se ve acelerado por el inadecuado manejo que puede realizarse durante las operaciones de cosecha y postcosecha, así como también por efecto del etileno sintetizado, respiración y transpiración (Tucker, 2008; Morales *et al.*, 1979 y Mitchel *et al.*, 1988).

2.1.4.1. Tipos de deterioro de las frutas

2.1.4.1.1. Deterioro físico

Se pueden observar durante la manipulación o conservación de las frutas. Los daños físicos pueden ser el resultado de maltratos producidos durante la recolección mecánica, golpes durante la manipulación, machucones durante el transporte entre otras heridas y, en general, no perjudican, por sí solas, a la comestibilidad de las frutas, pero sí a su valor comercial porque son desagradables a la vista. Reybert *et al.*, 1995 indica que los daños físicos ocasionados provocan una mayor producción de etileno, lo que puede acelerar la respiración y causar el deterioro de las frutas. En tanto que Mitchel *et al.*, 1988 por su parte menciona que estos daños físicos generalmente dañan las barreras naturales de la fruta, ubicadas sobre su superficie, aumentando las posibilidades de pérdida de agua y el ingreso de organismos que inician la pudrición.

2.1.4.1.2. Deterioro fisiológico

Un desorden fisiológico se manifiesta durante el almacenamiento de las frutas, constituye una alteración en el tejido del fruto, se puede originar por deficiencias nutricionales, etileno o como respuesta a un ambiente adverso, como por ejemplo, temperatura o composición atmosférica (Aguirre, 1994). Las alteraciones fisiológicas son alteraciones más graves que las anteriores y con frecuencia pueden perjudicar la comestibilidad del producto. Las principales alteraciones fisiológicas son pardeamiento de

pulpa, manchas de pulpa, pardeamiento externo, pardeamiento vascular, entre otras (Berger *et al.*, 1996).

2.1.4.1.3. Deterioro microbiano

El tipo de alteración microbiana varía según las condiciones de cultivo, almacenamiento y propiedades de cada fruto; pueden ser causados por gérmenes patógenos u organismos saprofitos. Las frutas presentan una resistencia considerable a los patógenos potenciales durante la mayor parte de su vida postcosecha, el inicio de la maduración organoléptica y la senescencia lo hacen susceptibles a la infección de los patógenos. Los microorganismos atacan más fácilmente a las frutas dañadas mecánicamente que a las intactas. El estrés, los daños mecánicos, daños por frío, quemadura de sol disminuyen la resistencia de las frutas a los patógenos. (Morales *et al.*, 1979).

2.1.4.2. Factores responsables del deterioro de las frutas

2.1.4.2.1. Temperatura

La temperatura es uno de los factores que tiene una influencia importante sobre la tasa de deterioro en los productos cosechados. Kader, 2002 indica que por cada aumento de la temperatura en 10°C por encima del óptimo, la tasa de deterioro se duplica, esto ocurre producto del incremento de la velocidad de las reacciones químicas, incluyendo las reacciones enzimáticas como las no enzimáticas como lo demostró Van't Hoff. Asimismo,

la germinación de esporas y la tasa de crecimiento de los patógenos son altamente influenciados por la temperatura (Kader, 2002).

Por otra parte, el frío y el calor no controlados durante el transporte y almacenamiento, pueden causar deterioro de los alimentos. El calor excesivo desnaturaliza las proteínas, rompe las emulsiones, destruye las vitaminas y reseca los alimentos al eliminar la humedad. Sin embargo, el frío no controlado también deteriora los alimentos, altera la textura, las emulsiones se rompen, las grasas se separan, etc. (Wills *et al.*, 1999).

2.1.4.2.2. Oxígeno

El oxígeno es un componente activo de la atmósfera, que tiene la propiedad de combinarse con numerosas sustancias mediante la reacción llamada oxidación. El oxígeno interviene en la respiración, biosíntesis del etileno, oxidación y putrefacción de las frutas. Por otra parte el oxígeno tiene efectos en el desarrollo de microorganismo. García, 1983 indica también que por debajo del 2% en volumen de oxígeno, la mayoría de los insectos no pueden vivir, y con menos del 0,2% ni los hongos pueden proliferar. Asimismo, el oxígeno tiene efectos destructores sobre las vitaminas particularmente vitamina A y vitamina C.

2.1.4.2.3. Humedad relativa

La humedad relativa es el estado higrómetro del aire, y es la relación entre la humedad absoluta y la cantidad de vapor de agua que contendría el mismo volumen de aire

si estuviera saturado; se expresa en porcentaje, varía en función de la temperatura y la presión. La humedad relativa puede afectar la pérdida de agua, deshidratación, marchitamiento, desarrollo de enfermedades, pudriciones, incidencia de algunos desórdenes fisiológicos, y uniformidad en la maduración de frutos (García, 1983). La condensación de humedad en el fruto, la transpiración o sudado favorecen la pudrición. Una humedad relativa apropiada va desde 85 % hasta 95% para los frutos (Kader, 2002).

2.1.4.2.4. Actividad de agua

El agua es el componente mayoritario de las frutas, su medida se da en términos de actividad de agua (a_w); La fruta fresca en su periodo postcosecha cuenta con una a_w cercana a 0,98; ello actúa como facilitador de las reacciones metabólicas: químicas y enzimáticas encargadas de la senescencia del fruto (Eunice *et al.*, 2007). Por otra parte la actividad de agua es un factor fundamental en la proliferación de microorganismos, la cantidad más pequeña de condensación superficial es suficiente para permitir la proliferación de bacterias o el desarrollo de mohos (Martínez *et al.*, 2000).

2.1.4.2.5. Microbiológicos

La microbiota responsables de la alteración de las frutas es muy variable, constituido por hongos y bacterias. Respecto a los mohos responsables del deterioro postcosecha de las frutas, las especies mas comúnmente asociadas pertenecen a los géneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, etc. (Bottalico *et al.*, 1992; King *et al.*, 1984). Respecto a las levaduras las principales especies asociadas con el deterioro de las frutas son

Kloeckera apiculata, *Rhodotorula spp*, *Saccharomyces*, *Pichia*, etc. (Tudor *et al.*, 1993). En tanto que las bacterias responsables de este fenómeno tenemos principalmente *Enterobacter*, *Pantoea* y *Pseudomonas* (Downes *et al.*, 2001).

2.1.5. Pérdidas postcosecha de frutas

La postcosecha es la etapa que involucra todas las actividades encaminadas a ofrecer una fruta de excelente calidad al consumidor (Morales, 1991 y Coursey *et al.*, 1975). En el término postcosecha quedan implicadas todas las actividades que se realizan para el traslado de los productos del campo al consumidor; hacer que lleguen a su destino en buenas condiciones, con oportunidad, a precios asequibles, y distribuirlos adecuadamente entre la población consumidora, lograr que el producto reciba un precio remunerativo y reducir al mínimo las pérdidas (Yahia *et al.*, 1992 y Zarate, 1993).

Las frutas en general, son productos de alto consumo en países desarrollados y en vías de desarrollo, sin embargo, al ser alimentos de humedad elevada con un metabolismo activo, presentan problemas de calidad durante extensos periodos de almacenamiento (Zarate, 1993). Se estima en productos frutícolas las pérdidas postcosecha alcanzan porcentajes elevados por tratarse de alimentos altamente perecederos. Coursey *et al.*, 1975; Yahia *et al.*, 1992 y Romojaro *et al.*, 2006 estiman que se pierde el 25% de estos productos a nivel mundial en tanto que Bourne, 1977; Yahia *et al.*, 1992 y Romojaro *et al.*, 2006 indican que las pérdidas ascienden de 15% a 60% en países en vías de desarrollo.

2.2. Fermentación alcohólica

2.2.1. Generalidades de la fermentación alcohólica

Podemos definir la fermentación alcohólica como el proceso bioquímico donde las levaduras transforman los azúcares del mosto en etanol, CO₂ y energía (Zanbonelli, 1988; Navarre, 1994 y Bu'lock, 1991). En esencia, las bebidas alcohólicas son soluciones aromatizadas de etanol, producto del metabolismo de las levaduras, que puede ser obtenido por la hidrólisis de diferentes sustratos ricos en carbohidratos como: caña de azúcar, maíz, arroz, uvas u otras frutas, remolacha, o carbohidratos en general (Zaldivar *et al.*, 2005; Karini *et al.*, 2006). El etanol producido por fermentación de azúcares presentes en las frutas, fue utilizado como materia prima para la elaboración de vinagre desde los tiempos iniciales de la microbiología industrial con fines de obtener vinagre con calidad sensorial y nutritivas (Ward, 1991).

La fermentación alcohólica es el proceso biotecnológico más antiguo realizado por el hombre. Primero se utilizó como un método de conservación, pero después se adoptó para elaborar bebidas alcohólicas, tal como los vinos (Ferreya, 2006). Durante miles de años el etanol ha sido producido para el consumo humano y, también desde hace miles de años, ha sido posible hacer bebidas alcohólicas concentradas mediante destilación. Sin embargo, a efectos de reducir costos de producción durante muchos años de etanol se llevó a cabo mediante procedimientos químicos. En los años recientes la atención ha vuelto a la producción de etanol por fermentación utilizando levaduras y materias primas orgánicas (Ward, 1991 y Karini *et al.*, 2006).

Tanto levaduras como bacterias han sido utilizadas para la producción de etanol. *Saccharomyces cerevisiae* es la levadura más comúnmente utilizada, pero también ha sido utilizada *Kluyveromyces fragilis* la bacteria *Zymomonas mobilis* se ha convertido en objeto creciente de estudio en los últimos años (Roger *et al*, 1982; Bringer *et al*, 1985). La fermentación alcohólica del mosto de las frutas, en donde los azúcares reductores como glucosa y fructosa son convertidos a etanol y CO₂ está estrechamente ligada a la acción de las enzimas presentes en las levaduras. Teóricamente se puede obtener a partir de un gramo de glucosa 0.511 g de etanol, cuando se utiliza sustratos puros el rendimiento es de 95% y se reduce al 91% cuando se utilizan materias primas de grado industrial (Murtagh, 1986).

2.2.2. Levaduras en la fermentación alcohólica

2.2.2.1. Características generales de las levaduras

Las levaduras que participan en la fermentación alcohólica consta un grupo extenso de microorganismos unicelulares, que se producen asexualmente, largamente encontrados por toda la naturaleza tales como en frutas, en líquidos azucarados, etc. Las levaduras son las responsables de la producción del etanol debido a que por medio de un proceso bioquímico denominado fermentación alcohólica transforman los azúcares del mosto en etanol, CO₂ y otros compuestos químicos.

Las levaduras son hongos unicelulares pertenecientes en su mayor parte al grupo de los Ascomicetos, es decir, al grupo de hongos capaces de formar esporas contenidos en el interior de su asca. Vistas al microscopio las distintas especies presentan formas muy

variadas. Las hay elípticas como las especies del género *Saccharomyces*; esféricas como *Torula*; alargadas como *Torulopsis stellata* y apiculadas como *Hanseniaspora* (Peynaud, 1989). Su morfología es uno de los caracteres utilizados en su clasificación, como también lo son entre otros su forma de reproducción y sus características bioquímicas (Barnett *et al.*, 1990; Navarre, 1994; De Rosa, 1997).

El principal microorganismo utilizado en la fermentación es *Saccharomyces cerevisiae*. *Saccharomyces cerevisiae* es la especie de levadura utilizada por excelencia para la obtención a nivel industrial debido a que es un microorganismo de fácil manipulación y recuperación, no es exigente en cuanto a su cultivo, tolera altas concentraciones de etanol, es osmotolerante, presenta alta viabilidad celular para el reciclaje y características de floculación y sedimentación (Carballo, 2000).

2.2.2.2. Clasificación de las especies de levaduras

Las levaduras constituyen un vasto grupo de hongos unicelulares, taxonómicamente heterogéneo y profundamente complejo. Desde la primera clasificación de Hansen a principios del siglo XX; distinguiendo en ese entonces solamente levaduras esporógenas y asporógenas, la taxonomía de las levaduras ha suscitado numerosos trabajos, reagrupados en sucesivas obras que edifican progresivamente la clasificación que se conoce hoy en día (Quesada *et al.*, 1995).

Según las clasificaciones actualmente en vigencia, las levaduras ligadas a los Ascomicetos, Basidiomicetos y a los Hongos imperfectos (Deutoromicetos) se distribuyen



en 81 géneros en los cuales se relacionan 590 especies. Sin embargo, las especies de levaduras susceptibles de estar significativamente presentes en el vino, son cerca de 16 (Kregger, 1984 y Barnett *et al.*, 1990). En el cuadro 04 se muestra la clasificación de las dos familias a las cuales pertenece las levaduras enológicas: las *Saccharomycetaceae* en los Ascomicetos (esporógenas) y las *Cryptococcaceae* en los Deutoromicetos (asporógenas)

Cuadro 04: Clasificación de las levaduras responsables de la fermentación alcohólica.

Familia de las <i>Saccharomycetaceae</i> (esporógena)			Familia de las <i>Spermophitoraceae</i> (esporógena)	Familia de las <i>Cryptococcaceae</i> (asporógena)
Subfamilia	Subfamilia	Subfamilia		
<i>Schizosaccharomycetoideae</i>	<i>Nadsomioideae</i>	<i>Saccharomycetoideae</i>		
Genero	Genero	Genero	Genero	Genero
<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>Saccharomycodes</i> <i>Hanseniaspora</i>	<i>Saccharomyces</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Dekkera</i> <i>Hansemula</i> <i>Khuyveromyces</i> <i>Pichia</i> <i>Zygosaccharomyces</i> <i>Torulaspora</i>	<i>Metschnikowia</i>	<i>Brettanomyces</i> <i>Candida</i> <i>Kloeckera</i> <i>Rhodotorula</i>

Fuente: Kregger, 1984 y Barnett *et al.*, 1990.

2.2.2.3. Aislamiento e identificación de las cepas de levaduras

Las levaduras que intervienen en la fermentación alcohólica presentan propiedades tecnológicas extremadamente variables (velocidad de fermentación, la naturaleza y

cantidad de productos secundarios de la fermentación alcohólica, los caracteres aromáticos de la bebida) que dependen de las cepas de levadura que intervienen en la fermentación alcohólica (Ribereau *et al.*, 2003); por ese motivo es necesario aislar las cepas de levaduras quienes serán los responsables de llevar a cabo la fermentación alcohólica con la finalidad de obtener productos finales con características similares. Las levaduras se encuentran asociadas a una diversidad de bebidas y alimentos fermentados, incluyendo productos lácteos, vino de uvas, licor de manzanas, chicha de jora y masato y otros. A partir de muestras en proceso de fermentación natural, es posible aislar y seleccionar nuevas cepas con capacidad fermentativa, tolerancia a altas concentraciones de etanol y otras propiedades de interés industrial en medios sólidos selectivos por el método de disseminación (Quesada *et al.*, 1995; Ribereau *et al.*, 2003 y Quillama, 2007).

Según Kreger, 1984; Barnett *et al.*, 1990 indican que tradicionalmente los métodos utilizados para la identificación y caracterización de especies y cepas de levaduras se han basado en sus características morfológicas, sexuales, fisiológicas, bioquímicas y ecológicas, pero estas características están muy influenciadas por las condiciones de cultivo y pueden dar resultados poco precisos (Yamamoto *et al.*, 1991). En los últimos años a fines de la década de 1980, gracias al desarrollo de la genética, diversas técnicas de biología molecular han sido desarrolladas para la identificación de especies y cepas de levaduras. La aplicación de estas técnicas ha demostrado que hay una amplia diversidad genética entre las cepas vínicas (Querol *et al.*, 1992; Versavaud *et al.*, 1993; Quesada *et al.*, 1995). Las técnicas moleculares, están basadas en el polimorfismo clonal del ADN mitocondrial y del ADN genómico de las cepas vínicas. Contrariamente a las técnicas precedentes basadas en el análisis de los productos del metabolismo (Ribereau *et al.*, 2003).



2.2.3. Biosíntesis de la fermentación alcohólica

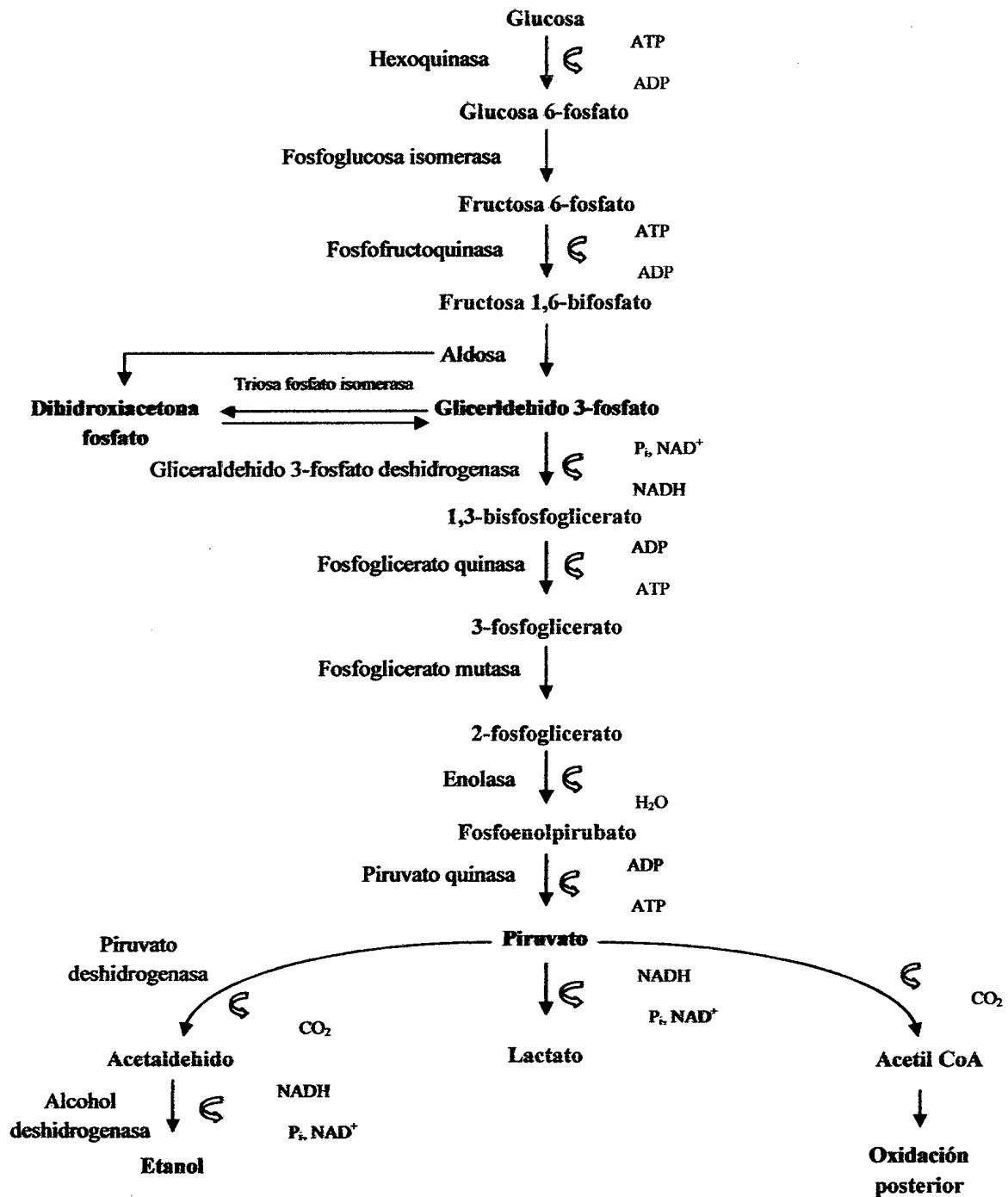


Figura 01: Biosíntesis del etanol – vía de la glicólisis

Fuente: Stryer *et al.*, 2002.

La figura 01 muestra la vía metabólica de la glucólisis, que viene a ser el mecanismo por donde se lleva a cabo la fermentación alcohólica; la vía de la glicólisis se lleva a cabo en el citoplasma de las levaduras, generando energía para mantener el crecimiento y el metabolismo de éstas. En la glicólisis participan 10 reacciones intermedias en las que el producto final es el ácido pirúvico, posteriormente este es descarboxilado a acetaldehído y finalmente es reducido a etanol (Stryer *et al.*, 2002; Ramirez, 2006).

2.2.4. Factores que afectan en la fermentación alcohólica

2.2.4.1. Influencia de la temperatura

La temperatura afecta al crecimiento de las levaduras “por lo tanto a la duración de la fermentación”, a la contribución que las diferentes cepas de levaduras tiene en la fermentación y, al metabolismo de las levaduras que es el que determina la composición química y organoléptica del vino (Fleet *et al.*, 1993 y Ribéreau *et al.*, 2003). Según Fleet *et al.*, 1993 sugieren que las levaduras de la fermentación alcohólica estarían más o menos bien adaptadas a las diferentes temperaturas comprendidas en la gama de 10 °C a 30 °C

La incidencia de la temperatura en el desarrollo de la levadura y marcha de la fermentación ha sido objeto de numerosos trabajos resumidos por Ribéreau *et al.*, 2003 en ella se demuestra, que las intensidades respiratorias y fermentarias de la levadura se ven afectadas por la temperatura así como se muestra en la tabla 01; donde se puede observar que la intensidad fermentaria se duplica en 10 °C a 10 °C, es máxima a 35 °C y disminuye a 40 °C; estas cifras muestran la importancia decisiva de la temperatura. Por otra parte la

temperatura óptima de fermentación varía según la especie de levadura (Suutari *et al.*, 1990 y Ribéreau *et al.*, 2003).

Tabla 01. Intensidades respiratoria y fermentaria de la levadura.

Temperatura (°C)	Intensidad respiratoria (O ₂)	Intensidad fermentaria (CO ₂)
15	4,2	118
20	6,7	168
25	9,6	229
30	11,4	321
35	6,2	440
40	3,0	376

mm³ de O₂ consumido o de CO₂ liberado por g de levadura seca y por hora.

Fuente: Ribéreau *et al.*, 2003.

Todo microorganismo presenta tres temperaturas cardinales “temperatura mínima, temperatura óptima y temperatura máxima” que marcan tres intensidades diferentes en su actividad. En la temperatura mínima, el microorganismo está vivo, pero no desarrolla con normalidad sus funciones de crecimiento y reproducción. Sin embargo, en la temperatura óptima el desarrollo de todas las funciones vitales es máximo, la velocidad de consumo de alimentos es enorme y la velocidad de multiplicación alcanza valores máximos. Finalmente, en la temperatura el microorganismo suspende su proceso metabólico y por tanto deja de crecer y reproducirse, es decir, queda inactivo pero vivo. Después de ésta, se alcanza muy rápido la temperatura letal a la que la especie sufre la muerte instantáneamente de todas sus células vegetativas.

El principal efecto tanto de las bajas como de las altas temperaturas se produce en la membrana plasmática (Watson, 1987; Suutari *et al.*, 1990). La temperatura afecta a la

fluidez de la membrana y por tanto, al transporte de componentes del medio externo al citoplasma de la levadura y viceversa. Las bajas temperaturas reducen la fluidez de la membrana debido a la cristalización de la cadena de los ácidos grasos, mientras que las altas temperaturas aumentan la fluidez comportando un menor control de la permeabilidad de los substratos debido a la desnaturalización de las proteínas transportadores (Bisson, 1999). Además, una baja temperatura puede limitar el crecimiento de las levaduras teniendo una población de levaduras insuficientes para una correcta fermentación (Ribereau *et al.*, 2003).

2.2.4.2. Incidencia del oxígeno

Según O'Connor *et al.*, 1990; Van *et al.*, 1995 el oxígeno tiene una gran influencia en la composición de ácidos grasos de la membrana citoplasmática de las levaduras, debido a que la usencia de oxígeno como ocurre en condiciones anaeróbicas, impide la síntesis de ácidos grasos insaturados y esteroides. Así, la inhibición de la biosíntesis de estos compuestos, trae como consecuencia, una clara disminución del crecimiento celular, la viabilidad y la actividad fermentativa (Lafon *et al.*, 1979; Youings *et al.*, 1989).

Por otra parte Bringer *et al.*, 1995 indica que los procesos para la producción de etanol se debe iniciar aeróbicamente para obtener la población de biomasa adecuada para obtener una buena velocidad de fermentación y evitar pérdidas de rendimiento. Ribereau *et al.*, 2003 por su parte menciona la importancia del suministro del oxígeno en los primeros estadios de la fermentación para la generación de componentes aromáticos en el vino,

debido a la oxidación del mosto, indica que el aroma del mosto antes de la fermentación es más sensible a la oxidación que en plena fermentación.

2.2.4.3. Inhibición por etanol

La producción de etanol por parte de las levaduras, está limitado por el efecto tóxico que tiene éste sobre el organismo (Casey *et al.*, 1986), y aunque su mecanismo de acción se desconoce, se considera a la membrana plasmática como el primer blanco de la acción inhibitoria del etanol (D'Amore *et al.*, 1987). La composición lipídica de la membrana sufre importantes modificaciones en respuesta a la adición de etanol en el medio de crecimiento, ocasionando modificaciones que repercuten sobre las funciones de la membrana, en particular alterando los mecanismos de penetración de las sustancias nutritivas, su permeabilidad selectiva y el mantenimiento de la vitalidad celular (Henschke *et al.*, 1991).

Eaton *et al.*, 1982 indica que el principal cambio producido por el etanol en la composición lipídica de las células es un aumento de la longitud media de cadena, conduciendo una mayor fluidez e inestabilidad de la membrana. Por otra parte, se ha demostrado que la combinación de los ácidos grasos de cadena corta (hexanoico, octanoico, decanoico y dodecanoico) y el etanol inhiben el crecimiento de las levaduras (Geneix *et al.*, 1984; Ravaglia *et al.*, 1993). Cabe mencionar también que Spivey, 1978 afirma que la tolerancia al alcohol de diferentes cepas varía considerablemente, asimismo, indica que la levadura es más sensible al etanol producido endógenamente que el que se añade exteriormente al sistema de fermentación.

Las investigaciones más recientes están orientadas a atribuir a la composición lipídica de la membrana un papel importante en la resistencia a las altas concentraciones alcohólicas. Baleiras *et al.*, 1995 indica que una mayor tolerancia al etanol está asociada a una mayor proporción de ácidos grasos de cadena larga en la membrana. Asimismo, numerosos trabajos demuestran que en aerobiosis las levaduras sintetizan esteroides insaturados como ergosterol. Elevado contenido en ergosterol aumenta rigidez de la membrana. Este fenómeno explica la influencia determinante de la aireación durante la fase de multiplicación de levaduras sobre la fermentación alcohólica.

2.2.4.4. pH

El pH es una medida de la acidez o alcalinidad de una solución e indica la concentración de iones hidróxido o hidrógeno y se define como el logaritmo negativo de base 10 de la actividad de los iones hidrógeno. En las levaduras, el pH óptimo para el inicio de la biosíntesis del etanol está comprendido de 3 y 6, valores favorables para el crecimiento y la actividad fermentaria de las levaduras. Durante el proceso de fermentación se produce una caída notable a valores de pH de 3-4. El pH influye en la formación de subproductos (Roger *et al.*, 1982).

2.2.5. Proceso de fermentación alcohólica

El proceso de fermentación alcohólica inicia con la recepción de la materia prima, seguidamente se extrae el mosto de las frutas realizándole las determinaciones de azúcares totales, °Brix y pH, para posteriormente pasteurizarlo a 85°C por 15 minutos, a partir de este

jugo pasteurizando se lleva a cabo el proceso de fermentación. El proceso de fermentación alcohólica de las frutas se realiza utilizando la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, a una temperatura de 28°C y a un pH inicial de 4.5. Durante la fermentación alcohólica se determina el consumo de azúcares reductores, la producción de etanol, la concentración de biomasa y el pH (Gómez, 2006).

2.2.6. Productos secundarios de la fermentación alcohólica

Durante la fermentación alcohólica de frutas, en adición a la producción de etanol, CO₂ y energía se genera una serie de compuestos como son: glicerol, acetaldehído, ácido acético, ácido succínico, ácido láctico, ácido propiónico, ácido fórmico, ácido cítrico, ácido fumárico, alcoholes superiores, ésteres, aldehídos, cetonas, acetato de etilo entre otros. Estos compuestos son conocidos como metabolitos secundarios, su presencia influye en las propiedades organolépticas del producto final. (Peynaud, 1989; Navarre, 1994; Suárez, 1997 y Ramírez, 2006;). Se considera en una fermentación alcohólica cuantitativamente el componente mayoritario después del etanol al glicerol que en promedio presenta cantidades de 6g/L a 10g/L (Navarrete, 1994 y Toriija, 2002).

2.3. Fermentación acética

2.3.1. Generalidades del vinagre

El vinagre es un líquido, apto para el consumo humano, producido exclusivamente con productos que contienen almidón y azúcares por el procedimiento de doble

fermentación, alcohólica y acética (Ward, 1991; Tesfaye *et al.*, 2004). Según la norma del Codex para el vinagre de vino el contenido total de ácido es de 60 gramos como mínimo por litro y 50 gramos como mínimo por litro de otros frutas. El vinagre es uno de los productos fermentados más antiguos usados por el hombre. Es y ha sido utilizado como condimento, aderezo en ensaladas, conservador de alimentos y base para remedios sencillos en hombres y animales. Las referencias más antiguas del uso del vinagre se encuentran en la cultura Babilónica 5000 años a.c. (Weiser, 1962; Llaguno *et al.*, 1991).

Aunque el ácido acético es producida por muchas bacterias fermentativas, sólo miembros de un grupo especial denominadas “bacterias acéticas” se utilizan ampliamente para su producción. La fermentación acética, se puede definir como un proceso aerobio de oxidación biológica, mediante el cual un sustrato con bajo contenido en etanol es oxidado por las bacterias acéticas para dar ácido acético y agua (Teyfase *et al.*, 2004; Steinkraus, 1997; Quillama, 2007).

2.3.2. Bacterias acéticas

2.3.2.1. Generalidades de las bacterias acéticas

Las bacterias acéticas son baterías gram negativas pero también pueden ser Gram Variables y en algunos cosos Gram positivas, las bacterias presentan formas variables (elipsoidal, redondeada, bastones), que pueden encontrarse al observarlas al microscopio, solas, en parejas o formando cadenas. Son móviles por la presencia de flagelos, no forman endosporas como mecanismo de resistencia. Además son aerobias, presentando

exclusivamente un metabolismo respiratorio con el oxígeno como aceptor final de electrones. También son catalasa positivas y oxidasa negativas, su temperatura óptima es de 20 – 30°C y su pH óptimo es de 5 – 6 aunque crecen bien en pH inferiores a 4 (Sokollek *et al.*, 1998; Quillama, 2007; De Ley *et al.*, 1984).

Estas bacterias se encuentran sobre sustratos azucarados y/o con presencia de alcohol tales como: zumos de frutas, vino, sidra, cerveza y vinagre (Sokollek *et al.*, 1998). Sobre estos sustratos llevan a cabo una oxidación de los azúcares y los alcoholes, produciendo una acumulación de ácidos orgánicos como productos finales. Cuando el sustrato es etanol, se produce ácido acético; de ahí deriva el nombre corriente con el que se conocen estas bacterias. (Sokollek *et al.*, 1998; Ribereau *et al.*, 2003; De ley *et al.*, 1984).

2.3.2.2. Clasificación de las bacterias acéticas

La investigación científica sobre el vinagre de vino tuvo un ilustre iniciador como fue Louis Pasteur. También podemos considerar al famoso científico francés como el primer taxónomo de este grupo de bacterias a las cuales les dio la denominación común de *Mycoderma aceti*. En épocas más recientes y hasta hace algunos pocos años, las bacterias acéticas eran divididas en dos géneros: *Acetobacter* y *Gluconobacter* (Asai, 1968). Las principales diferencias entre estos dos géneros eran tanto de tipo citológico como fisiológico. Teniendo en cuenta este último criterio, la principal diferencia entre ambos géneros radicaba en que *Acetobacter* oxidaba el etanol a ácido acético y posteriormente

podía completar la oxidación del acético hasta CO₂ y agua, mientras que las especies de *Gluconobacter* eran incapaces de llevar a cabo esta oxidación completa del acético.

Sin embargo, la taxonomía tradicional de los microorganismos, basada fundamentalmente en criterios morfológicos y fisiológicos, se ha visto sometida a continuas reordenaciones y cambios. Esto debe fundamentalmente a la aplicación de técnicas moleculares al estudio taxonómico como es la hibridación DNA – DNA, la secuenciación de diferentes regiones del genoma bacteriano, etc. La familia *Acetobacteraceae* no ha sido una excepción a este proceso de reordenación de géneros y especies. En el año 1997, a los dos géneros ya mencionados, hay que sumarle la definición de dos nuevos géneros de bacterias acéticas: *Gluconacetobacter* y *Ácidomonas* (Yamada *et al.*, 1997), y a los tres años se han definido otros dos nuevos géneros: *Asaia* (Yamada *et al.*, 2000) y *Kozakia* (Lisdiyanti *et al.*, 2002).

Por tanto, en la actualidad la familia *Acetobacteraceae* está formada por seis géneros y 34 especies de bacterias acéticas. Los géneros de las bacterias acéticas son las siguientes: *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, *Asaia*, *Ácidomona* y *Kozakia* con 14, 11, 3, 4, 1 y 1 de especies respectivamente como se muestra en el cuadro 05 (Yamada *et al.*, 2000; Lisdiyanti *et al.*, 2002 y Yamada, 2003). Los géneros *Acetobacter* y *Gluconacetobacter* son los géneros donde mayor diversidad de especies ha sido descrita; son las especies de estos dos géneros los que tradicionalmente se han asociado con la producción de vinagre, en especial las cepas de *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *Ga. europaeus* y *Ga. xylinus* (Yamada, 2003).



Cuadro 05: Clasificación de los géneros y especies de bacterias acéticas.

<i>Acetobacter</i>	<i>Gluconoacetobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>
<i>A. aceti</i>	<i>Ga. Liquefaciens</i>	<i>G. oxidans</i>
<i>A. pasteurianus</i>	<i>Ga. Diazotrophicus</i>	<i>G. frateurii</i>
<i>A. pomorum</i>	<i>Ga. Xylinus</i>	<i>G. assaii</i>
<i>A. peroxydans</i>	<i>Ga. Hansenii</i>	
<i>A. indonesiensis</i>	<i>Ga. Europaeus</i>	
<i>A. tropicalis</i>	<i>Ga. Obodiens</i>	<i>Asaia</i>
<i>A. syzygii</i>	<i>Ga. Intermedius</i>	<i>A. bogorensis</i>
<i>A. cibirongensis</i>	<i>Ga. Sacchari</i>	<i>A. siamensis</i>
<i>A. orientalis</i>	<i>Ga. Entanie</i>	<i>A. indonesiensis</i>
<i>A. orleanensis</i>	<i>Ga. Johanna</i>	<i>A. krungthepensis</i>
<i>A. lovaniensis</i>	<i>Ga. Azotocaptans</i>	
<i>A. estunensis</i>		
<i>A. malorum</i>	<i>Acidomonas</i>	<i>Kozakia</i>
<i>A. cerevisiae</i>	<i>Ac. Methanolica</i>	<i>K. baliensis</i>

Fuente: Yamada, 2003.

2.3.2.3. Aislamiento e identificación de bacterias acéticas

La microbiología ha requerido el aislamiento y recuento de los microorganismos para poder llevar a cabo estudio sobre las poblaciones que se desarrollan en los diferentes procesos industriales, para ello es necesario disponer de medios de cultivo donde crezcan los microorganismos fuera de su ambiente natural. Se han implementado una serie de

medios de cultivos para el aislamiento de bacterias acéticas de manera selectiva a partir de mosto de uva y vino. Algunos de estos medios son: medio GYC, medio manitol o medio etanol que permiten aislar las bacterias acéticas del vino e inhiben el desarrollo de levaduras y bacterias lácticas (Ruiz *et al.*, 2000). El ambiente de los acetificadores en donde se desarrollan estas bacterias se caracteriza por un bajo pH, una elevada concentración de ácido acético y etanol y una atmósfera oxidante como consecuencia del suministro de oxígeno.

Lisdiyanti *et al.*, 2003 realizaron un estudio de la diversidad de bacterias acéticas durante tres años consecutivos en el sudeste asiático a partir de diferentes fuentes, entre ellas a partir de vinagre. Para ello utilizó cinco medios de cultivo donde cambiaba la fuente de carbono y la presencia o no de etanol y acético. La composición de cada uno de estos medios se muestra en la tabla 02. El pH se ajustaba a 3,5 con HCl para que fuese lo suficientemente selectivo.

Cada medio facilita el crecimiento diferencial de los distintos géneros de bacterias acéticas, el medio de cultivo I es útil para el aislamiento de las especies de *Acetobacter* por la presencia de etanol y acético, aunque cepas de *Gluconoacetobacter* y *Kozakia* también fueron aisladas en este medio. El medio II que contiene sorbitol como fuente de carbono selecciona a cepas de *Gluconobacter* y *Asaia*. El medio IV también seleccionó a cepas de *Asaia* por la presencia de dulcitol como fuente de carbono. Las cepas de este género a su vez están inhibidas en los medios I y III por la presencia de acético. Por último, el medio V seleccionaba a cepas de *Acidomonas* frente a los otros géneros por la presencia de metanol.

Tabla 02: Medios de cultivo para el aislamiento de las bacterias acéticas

Ingredientes	Medios de cultivo a pH 3,5				
	I	II	III	IV	V
Glucosa	1.0				0.15
Sorbitol		2.0			
Manitol			2.0		
Dulcitol				2.0	
Metanol					2.0
Etanol	0.5				
Peptona	1.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Extracto de levadura	0.8	0.3	0.3	0.3	0.3
Ácido acético	0.3		0.2		
Cicloheximida	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

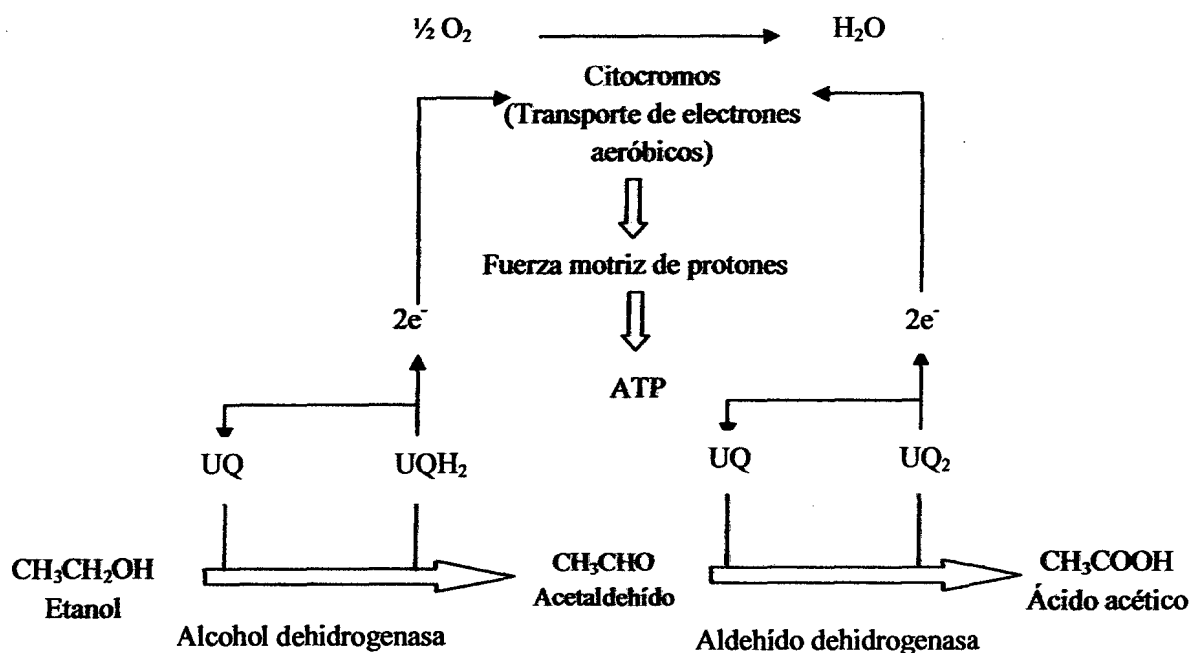
La concentración de los ingredientes se expresa en % de peso/volumen o volumen/volumen

Fuente: Lisdiyanti *et al.*, 2003.

2.3.3. Biosíntesis del vinagre

Según Llaguno *et al.*, 1991; Lu *et al.*, 1999 y Tesfaye *et al.*, 2004, la producción de ácido acético resulta de una oxidación de etanol por las bacterias acéticas, esto involucra una reacción en dos pasos; en la primera etapa se oxida etanol a acetaldehído y la segunda el acetaldehído a ácido acético, esta oxidación es catalizada por enzimas que se encuentran en la membrana celular, específicamente en la superficie externa de la membrana citoplasmática, en contacto con el medio de cultivo donde el ácido acético se acumula rápidamente. Estas son alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa, además existen

otro importante componente que actúa en la oxidación del etanol esto es el Citocromo. En la figura 02 se muestra la biosíntesis de conversión de etanol a ácido acético.



UQ = Ubiquinonas

Figura 02: Biosíntesis de la conversión de etanol a ácido acético

Fuente: Quillama, 2007.

2.3.4. Factores que afectan en la fermentación acética

2.3.4.1. Características del sustrato

Según Llaguno *et al.*, 1991 el fermento de frutas, debe estar libre de sabores y olores extraños, sin restos de azúcares fermentables que puedan provocar contaminaciones posteriores con levaduras. En cuanto a su graduación alcohólica, se ha venido considerando

que los vinos utilizados en el proceso de acetificación deben ser de baja graduación, aunque se permite utilizar vinos con una graduación alcohólica de 10% v.v. a 12% v.v.

Otro factor que influye sobre la fermentación acética es la concentración de ácido acético. Bar citado por De Ory *et al.*, 2004, afirma que el ácido acético tiene un carácter de activador a la vez de inhibidor sobre la actividad de las bacterias acéticas, por lo que han propuesto un efecto de activación para el crecimiento del microorganismo cercano a 10g/L.

2.3.4.2. Influencia de la temperatura

La temperatura del medio influye sobre el crecimiento del microorganismo. Llaguno *et al.*, 1991 y De Ory *et al.*, 2004 proponen una temperatura óptima de fermentación acética comprendida dentro del rango de 30 °C a 31 °C; de esta forma, el proceso de fermentación es viable entre los 28 °C y 33°C. Sin embargo, cuando la temperatura es superior a 33°C o está por sobre la temperatura óptima, ocurre un proceso de desactivación bacteriana, en el cual las enzimas son desnaturalizadas, la membrana dañada, causando que los constituyentes se dispersen y el organismos sea más sensible a los efectos tóxicos de la célula.

2.3.4.3. Influencia de la aireación

El factor aireación, se considera fundamental, dado que las bacterias acéticas requieren de un suministro constante de oxígeno, además de una agitación orbital para homogenizar el contenido y garantizar la distribución del oxígeno en todo el medio de

fermentación. La concentración de oxígeno disuelto en el medio se debe mantener constante, en torno a 2mg/L y la cantidad de aire suministrado debe ser aproximadamente de 50ml/min para 1000ml de medio lo que equivale a 0,5vvm que es el volumen de aire introducido, por unidad de volumen de fermentador por minuto (De Ory *et al.*, 2004). La incorporación de aire es un proceso esencial, dado el carácter aerobio de las bacterias acéticas. Además de la cantidad de aire suministrado, se debe considerar la pureza y calidad de éste, las bacterias acéticas son sensibles a contaminantes presentes en el aire (Llaguno *et al.*, 1991). No obstante, algunos autores mencionan que el proceso de fermentación acética es estrictamente dependiente del oxígeno abastecido a la fase líquida y se requiere de un sistema de distribución (Fregapane *et al.*, 1999).

2.3.4.4. Concentración de inóculo

Las condiciones del inóculo, es un parámetro importante para una óptima fermentación. La concentración de biomasa total, debe ser de orden de 500×10^6 cel./ml, de acuerdo a De Ory *et al.*, 2004. Para Soo *et al.*, 1989, la producción de ácido acético se lleva a cabo con una concentración de células viables de orden de $1,9$ a $4,7 \times 10^8$ cel/ml aumentando la productividad de ácido acético.

2.3.5. Métodos de producción de vinagre

Existen diversos métodos de producción de vinagre, específicamente dos métodos básicos en que se realiza la fermentación acética, estos son fermentación en cultivo superficial (lento) y fermentación en cultivo sumergido (rápido).

2.3.5.1. Fermentación en cultivo superficial

La fermentación en cultivo superficial, se caracteriza porque las bacterias acéticas se encuentran en contacto directo con oxígeno gaseoso, o situadas en la interface líquido - gas, o bien, fijadas a soportes de materiales tales como virutas de madera. Este sistema constituyó el primer paso hacia la industrialización del proceso de fabricación de vinagre y es también precursor de las bacterias inmovilizadas. A pesar del avance tecnológico, éste método presenta desventajas, como la pérdida de sustancias volátiles por evaporación; el material de soporte, como las virutas de madera, se contamina fácilmente y es necesario reemplazarlo cada año; además es un proceso lento (Weiser, 1962 y Llaguno *et al.*, 1991).

2.3.5.2. Fermentación en cultivo sumergido

La fermentación en cultivo sumergido ha sido descrita por Ebner *et al.* 1993 y 1999 quienes sugieren una fermentación semi-continua y continúa adicional a la fermentación por batch. Este sistema se basa en ciclos, comenzando con concentraciones de ácido acético iniciales en cada ciclo del orden de 7 a 10 % y cerca de 5% de etanol. Cuando la concentración de etanol está entre un rango de 0,05% y 0,3%, se procede a descargar el fermentador y comenzar un nuevo ciclo.

Levonen *et al.*, 2003; Ebner *et al.* 1993 y 1999; se refieren al método Frings, el cual es usado en todo el mundo para la producción de vinagre. El Acetator Frings consiste en un depósito provisto de agitación donde el mismo dispositivo consigue la aireación y la mezcla

de aire con el líquido el Acetator Frings es totalmente automatizado y así garantiza una acetificación rápida y uniforme.

2.3.6. Proceso de elaboración de vinagre

Un proceso de elaboración típico del vinagre es como sigue: recepción de la materia prima, acondicionamiento de la materia prima, fermentación alcohólica, fermentación acética. Una vez obtenido el vinagre, éste se clarifica y/o decolora en función del producto deseado. A continuación el vinagre pasa al sulfitado de acuerdo con las especificaciones del producto final y, si es necesario el vinagre se puede someter a un proceso de pasteurización (López, 2004). Para la fermentación acética, es necesario cultivar bacterias acéticas quienes serán los responsables de la acetificación del etanol procedente de la fermentación alcohólica, estas bacterias se pueden obtener por un proceso de aislamiento o mediante una fermentación espontánea.

2.3.7. Compuestos aromáticos en vinagre

Considerando que los constituyentes volátiles son específicos para cada vinagre, éstos son originarios de las características de la materia prima utilizada y por la tecnología de procesamiento durante su producción. Los vinagres son caracterizados y diferenciados por la cantidad y calidad de sus componentes volátiles (Castro *et al.*, 2002). En el vinagre se han identificado diversos componentes volátiles entre los más característicos tenemos: acetaldehído, etil acetato, acetoína, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol (Gerbi 1995 citado por Tesfaye *et al.*, 2004, Morales *et al.*, 2001 y De Ory *et al.*, 2004).

2.4. Evaluación sensorial

El consumo de productos alimentarios no sólo cubre las necesidades nutricionales del organismo, sino que además aporta la sensación de placer producida al comer. La calidad sensorial de un alimento no es una característica propia, sino es el resultado de la interacción entre el alimento y el hombre, por lo que puede ser definida como la sensación humana provocada por determinados estímulos procedentes del alimento, mediatizada por las condiciones fisiológicas, psicológicas y sociológicas de las personas o grupo de personas que la evalúa (Guerrero, 1995; Anzaldua, 1994).

Ureña *et al.*, 1999 define la evaluación sensorial como una disciplina científica usada para medir, analizar e interpretar las sensaciones producidas por las propiedades sensoriales de los alimentos, y que son percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído, asimismo, está constituida por dos procesos definidos: el análisis sensorial y el análisis estadístico. Mediante el primero se obtiene las apreciaciones de los jueces a manera de datos que serán posteriormente transformados y valorados por el segundo, dándole con ello la objetividad deseada.

2.4.1. Las propiedades organolépticas y los sentidos del ser humano

2.4.1.1. El sabor y el sentido del gusto

El sabor, es definido como la interpretación psicológica de los estímulos físicos y químicos, causados por la presencia de componentes volátiles y no volátiles del alimento

saboreado en la boca (Ureña et al., 1999). En tanto, que el sentido del gusto está conformada por los receptores de la boca “botones gustativos”, que se encuentran en las papilas gustativas de la lengua, aunque también existen algunos en la superficie del paladar, amígdalas, faringe y laringe; y, mediante ella se percibe las sensaciones del sabor básico y sabores especiales de los alimentos (Espinosa, 2007 y Torricella *et al.*, 2008).

2.4.1.2. El olor y el sentido del olfato

Mediante el sentido del olfato, se distinguen las propiedades del olor de los alimentos. El olor es la percepción de las sustancias volátiles liberados por los alimentos, la mayor parte de las sustancias olorosas son compuestos orgánicos relativamente pequeños con suficiente volatilidad para ser transportados como vapores hasta las fosas nasales (Stryer *et al.*, 2002). El sentido del olfato funciona mediante todo el sistema nasal, en el interior de la nariz, existen regiones cavernosas cubiertas de una mucosa pituitaria, la cual presenta células y terminales nerviosos que reconocen los diversos olores y transmiten a través del nervio olfativo hasta el cerebro la sensación olfatoria (Espinoza, 2007).

2.4.1.3. El color y el sentido de la vista

El color, es la impresión que produce en la vista los rayos de luz reflejada por un cuerpo, convirtiéndose así en un atributo del mismo y, por tanto en una propiedad sensorial (Ureña *et al.*, 1999). La visión se basa en la absorción de la luz por unas células fotorreceptoras del ojo, estas células son sensibles a la luz en una región relativamente estrecha del espectro electromagnético, la región con longitudes de onda entre 300nm y

850nm (Stryer *et al.*, 2002). La importancia del color en la evaluación sensorial se debe fundamentalmente a la asociación que el consumidor realiza entre este y otras propiedades de los alimentos, demostrándose que en ocasiones sólo por la apariencia y color del alimento un consumidor puede aceptarlo o rechazarlo (Anzaldúa, 1994).

2.4.2. Factores que influyen en la evaluación sensorial

Para la realización de cualquier análisis hay una serie de factores que de no ser considerados influyen negativamente en la validez, precisión y reproducibilidad de los resultados obtenidos. En el caso particular de la evaluación sensorial, donde el instrumento de medida lo constituyen los jueces, es de suma importancia la normalización de las condiciones que rodean al grupo de personas que evalúan el producto.

2.4.2.1. Aspectos ambientales

Torricella *et al.*, 2008 menciona que con independencia de las características personales y del grado de interés y preparación que posean los jueces que participan en una evaluación sensorial, las condiciones externas influyen directamente en sus juicios. Para que las personas no desvíen la atención del punto que se quiere sea su objeto de observación, es necesario controlar todo tipo de variable que pueda en un momento dado influir o afectar su respuesta; de allí la importancia de que las condiciones ambientales estén normalizadas (Anzaldúa, 1994).

El laboratorio de Evaluación Sensorial debe contar con dos áreas independientes entre sí, el área de preparación de muestras y la de evaluación. Las dimensiones de estas salas pueden variar, deben ser cómodas y confortables, debiendo estar situada muy cerca una de otra pero sin que exista una comunicación entre ella que origine el paso de ruidos, olores, etc. (Espinoza, 2007). De manera general la sala de cata debe cumplir con los siguientes requisitos (Torricella *et al.*, 2008; Anzaldua, 1994, Espinoza, 2007):

- El color de las paredes y el mobiliario debe ser de tonos claros y lisos.
- La iluminación general debe ser semejante a la luz del día, uniforme.
- No deben existir ruidos que provoquen molestias o distracción a los jueces.
- La temperatura y humedad relativa debe ser agradables y constantes, se propone de 20°C a 22 °C de temperatura y de 60% a 70 % de humedad relativa.
- El acceso y la salida de los jueces del área de evaluación debe realizarse de manera tal que no pueda haber comunicación verbal entre ellos.

2.4.2.2. Aspectos prácticos

Para lograr hacer lo más objetiva la evaluación sensorial hay que tener en cuenta determinados aspectos relacionados con las muestras que se evalúan, entre ellos se encuentran (Torricella *et al.*, 2008; Anzaldua, 1994, Espinoza, 2007):

- Uniformidad de las muestras. Las muestras a evaluar deberán ser representativas, y se presentarán de modo uniforme a todos los jueces.



- Preparación de las muestras. Las muestras se preparan de manera tal que no se introduzcan olores, ni sabores extraños o cambios en algunas de sus propiedades organolépticas.
- Codificación de las muestras. Las muestras se identifican de forma tal que no sugieran al juez ningún tipo de relación entre ellas. Se aconseja utilizar códigos compuestos por tres dígitos elegidos al azar.
- Utensilios empleados para evaluar las muestras. Los utensilios han de ser uniformes, no proveer sabores ni olores extraños al producto, deben ser de material inerte, pueden ser de vidrio o material desechable.

2.4.2.3. Aspectos informativos

Antes de realizar el análisis, el juez debe recibir información para así facilitar su tarea. Los aspectos básicos a informar son (Torricella *et al.*, 2008; Anzaldua, 1994; Espinoza, 2007):

- Agente enjuagante a emplear. Se utiliza para eliminar el sabor residual que persiste después de una degustación, generalmente se emplea agua a temperatura ambiente, la cual no tiene que ser tragada.
- El período de tiempo entre la degustación de una muestra a otra también es importante, normalmente oscila entre 15 y 30 segundos.
- Informaciones adicionales. A los jueces se les comunicará el tiempo que deben esperar después de ingerir alguna merienda y después de las comidas, que para realizar las evaluaciones no pueden usar cosméticos ni perfumes y han de lavarse

las manos con jabones que no transmitan olor. También se le indicará que no deben conversar entre ellos, manteniendo disciplina y postura correcta antes y durante las evaluaciones.

2.4.2.4. Aspectos humanos

En el análisis sensorial es el hombre el instrumento de medición, es decir los jueces que participan en las diferentes pruebas de evaluación sensorial; por lo que es necesario tener en cuenta todos los factores que pueden incidir en sus respuestas, tanto desde el punto de vista psicológico como fisiológico (Anzaldua, 1994; Espinoza, 2007). Los jueces merecen singular atención en la evaluación sensorial, de ahí que se presenta de manera detallada en la sección 2.4.3.

2.4.3. Los jueces para el análisis sensorial

El juez es el ente analista y calificador en las pruebas de evaluación sensorial, que se sirve sólo de la capacidad de percepción desarrollada y habituada de sus sentidos para reconocer, identificar, mensurar y valorar las propiedades y atributos organolépticos o sensoriales de los alimentos. Se distinguen dos tipos de jueces entre ellas tenemos:

2.4.3.1. Jueces afectivos

El Juez afectivo es el individuo que no tiene que ser seleccionado ni adiestrado, son consumidores escogidos al azar representativo de la población a la cual se estima está

dirigido el producto que se evalúa. El objetivo que se persigue al aplicar una prueba de evaluación sensorial con este tipo de juez, es conocer la aceptación, preferencia o nivel de agrado que estas personas tienen con relación al alimento evaluado. Las pruebas con consumidores pueden realizarse en un supermercado, una escuela, centro de trabajo, etc. (Espinoza, 2007).

Debido a que los juicios que se emiten están influenciados por diversos factores propios del individuo, es de esperarse una variación grande entre ellos, por lo que debe tratarse de normalizar ciertas condiciones que permitan lograr resultados más objetivos, como son: explicación detallada a los participantes del procedimiento de la prueba, presentación adecuada de las muestras, entre otras (Anzaldúa, 1994 y Espinoza, 2007).

2.4.3.2. Jueces analíticos

El juez analítico es el individuo que entre un grupo de candidatos ha demostrado una sensibilidad sensorial específica para uno o varios productos. Es necesario tener en cuenta algunos aspectos personales de los jueces analíticos entre los que se encuentran los siguientes (Guerrero, 1995; Anzaldúa, 1994):

- **Edad.** Como representante de la población en general se consideran las personas entre 18 y 50 años de edad, pues se supone que sus organismos han logrado un desarrollo óptimo, tanto desde el punto de vista fisiológico como cultural.
- **Sexo.** Es aconsejable que las comisiones de evaluación sensorial estén formadas por individuos de ambos sexos, evitando así las variables debidas a este factor.



- Estado de salud. Los jueces no deben presentar ninguna enfermedad, bien sea esta de tipo orgánica o psíquica, pues se altera su capacidad perceptiva y su atención.
- Carácter y responsabilidad. El juez tiene que ser honesto, confiable y debe mostrar preocupación e interés en la prueba que está realizando, siendo puntual, receptor y fiel al procedimiento solicitado.
- Afinidad con el material objeto de prueba. Los jueces analíticos no pueden emplearse cuando presenten un franco rechazo al material que se estudia, tampoco deben considerarse las personas que sienten una preferencia excesiva sobre el producto a evaluar.

2.4.4. Condiciones de prueba para el análisis sensorial

2.4.4.1. Área de prueba y preparación

Las pruebas sensoriales requieren de un lugar especial para su realización. Las pruebas, hecho por jueces afectivos, deben llevarse a cabo en un ambiente que no se haya impuesto al juez, o sea, en un lugar donde sea común encontrar a éste (Anzaldúa, 1994). Para las pruebas sensoriales realizadas por jueces analíticos, es necesario contar con un lugar diseñado y destinado para este fin, debe ser un ambiente tranquilo, donde sea posible impedir las distracciones y las interrupciones (Larmond, 1977), donde los jueces deben sentirse cómodos para impedir que algunos factores externos e irrelevantes a las pruebas, tales como la temperatura, luces, sonidos, etc. puedan distraerlos y causar invalidez en las conclusiones del ensayo.

2.4.4.2. Temperatura de las muestras

Las muestras deben servirse a la temperatura a la cual suele ser consumido el alimento lo que permitirá obtener respuestas correctas de las calificaciones emitidos por los jueces (Torricella *et al.*, 2008).

2.4.4.3. Horario de las pruebas

Uno de los factores que más pueden afectar a los resultados de pruebas de análisis sensorial es la hora a la cual se llevan a cabo las pruebas. Las evaluaciones sensoriales no deben hacerse a horas muy cercanas a las de las comidas. Si el juez acaba de comer o desayunar no se sentirá dispuesto a ingerir alimentos, y entonces podría asignar calificaciones demasiadas bajas o podría alternarse sus apreciaciones de los atributos sensoriales. Similarmente, si ya falta muy poco tiempo para la hora de la comida o la cena, el juez tendrá hambre cualquier cosa que pruebe le agradara, así que también puede afectar simplemente a sus respuestas (Torricella *et al.*, 2008; Anzaldúa, 1994; Espinoza, 2007). Anzaldúa, 1994 recomienda como horarios adecuados entre las once de la mañana y una de la tarde y de cinco a seis de la tarde; aunque el primer horario es el más adecuado.

2.4.4.4. Cantidad de muestras

ASTM, 1968 recomienda que para pruebas sensoriales cada juez debe recibir al menos 16 ml de muestra líquida o 28 gr de alimentos sólidos, según Anzaldúa, 1987 en el caso de bebidas, pueden presentarse a los jueces muestras de 50ml. Estas cantidades sin



embargo, no deben tomarse al pie de la letra como absolutas, ya que sea visto que pueden modificarse según la cantidad de muestras que se tenga (Larmond, 1977; Anzaldúa, 1987).

2.4.4.5. Numero de muestras

En una sesión de evaluación sensorial, por lo general, no deben darse a probar a un juez más de seis muestras al mismo tiempo (Larmond, 1977), ya que puede ocasionarle fatiga y hastío, lo cual puede repercutir en sus respuestas. Puede haber algunas excepciones, como en el caso, cuando se tiene jueces altamente entrenados, en que se pueden evaluar muchas más muestras en una sesión (Anzaldúa, 1982).

2.4.5. Métodos de evaluación sensorial

El análisis sensorial de los alimentos se lleva a cabo utilizando diferentes pruebas, según sea la finalidad para la que se efectuó, existen tres tipos principales de pruebas: las pruebas afectivas, las discriminativas y las descriptivas.

2.4.5.1. Pruebas afectivas

Las pruebas afectivas son aquellas en las cuales el juez expresa su reacción subjetiva ante el producto, indicando si le gusta o le disgusta, si lo acepta o lo rechaza, o si prefiere otro (Larmond, 1977). Estas pruebas son las que presentan mayor variabilidad en los resultados y estas son las más difíciles para interpretar (Amerine *et al.*, 1965), ya que se trata de apreciaciones completamente personales. Para las pruebas afectivas es necesario

contar con no menos de 30 jueces según ASTM, 1968 y de 40 jueces según Anzaldúa, 1994.

2.4.5.2. Pruebas discriminativas

Las pruebas discriminativas son aquellas en las que no se requiere conocer la sensación subjetiva que produce un alimento a una persona, si no que se desea establecer si hay diferencia o no entre dos o más muestras y, en algunos casos, la magnitud o importancia de esa diferencia (Larmond, 1977). Para las pruebas discriminativas pueden usarse jueces semientrenados o entrenados (Anzaldúa, 1994). Para las pruebas discriminativas es necesario contar con no menos de 3 miembros y un máximo de 10 miembros según Guerrero, 1995.

2.4.5.3. Pruebas descriptivas

En las pruebas descriptivas se trata de definir las propiedades del alimento y medirlas de la manera más objetiva posible. Aquí no son importantes las preferencias o aversiones de los jueces, y no es tan importante saber si las diferencias entre las muestras son detectadas, sino cual es la magnitud o intensidad de los atributos del alimento (Amerine, 1965). Para las pruebas discriminativas pueden usarse jueces semientrenados o entrenados (Anzaldúa, 1994). Para las pruebas discriminativas es necesario contar con no menos de 10 miembros y un máximo de 20 miembros y como mucho 25 miembros según Ureña *et al.*, 1999.

2.4.6. Análisis estadístico en la evaluación sensorial

El análisis estadístico de las respuestas dadas por los jueces, se puede procesar utilizando las siguientes técnicas matemáticas: Evaluación del atributo mediante el diagrama de telaraña, análisis de varianza para los factores que afectan sobre las características finales del producto, prueba de Comparaciones Múltiples de Duncan, etc. (Ureña *et al.*, 1999).

La evaluación de atributos mediante el diagrama de telaraña es una técnica que se basa en las apreciaciones emitidas por un grupo de jueces idóneamente entrenados en los análisis de perfil de sabor y análisis de perfil de textura.

El análisis de varianza es una técnica matemática que permite distinguir matemáticamente y estadísticamente los factores que tienen una influencia significativa sobre las características finales del producto. El análisis de varianza consiste en separar la contribución de cada fuente en la variación total observada.

La prueba de Comparaciones Múltiples de Duncan es una técnica matemática que se utiliza con la finalidad de efectuar comparaciones múltiples entre las medias de los tratamientos del experimento. La prueba de Duncan permite comparar tratamientos no relacionados, es decir todos los tratamientos contra todos a fin de establecer un orden de méritos.

III: MATERIALES Y METODOS

3.1. Obtención y acondicionamiento de la materia prima

En la investigación se utilizó frutas en descarte procedentes del mercado “Las Américas” de Abancay – Apurímac. Las frutas que se utilizaron en el experimento son manzanas y plátanos en proporción de 1:1 a quienes se les extrajo el mosto, donde el contenido de sólidos totales de mosto obtenido se regula a 11°Brix y pH 4.5 ajustado con bicarbonato de sodio; para luego realizar la fermentación alcohólica.

3.2. Fermentación alcohólica del mosto de frutas en descarte

3.2.1. Obtención de una cepa de levadura para la fermentación alcohólica

En la presente investigación se utilizó una cepa de levaduras nativa, aislado de un nicho natural. Para el aislamiento se tomó una muestra de mosto de caña en proceso de fermentación. Luego de ello, se consideró necesario realizar un estudio de identificación basado en técnicas morfológicas y fisiológicas. Cabe mencionar que los estudios realizados son elementales y no nos permite identificar la especie a la que corresponden, pero si podemos confirmar que se ha aislado y trabajado con una cepa específica.

3.2.1.1. Aislamiento e identificación de levaduras

La muestra utilizadas para el aislamiento de la levadura utilizada en la investigación

fue mosto de caña de azúcar en proceso de fermentación proveniente de la destilería Espinoza, valle Pachachaca, Abancay; del departamento de Apurímac – Perú. La muestra recolectada procede de las prácticas cotidianas de la elaboración de caña.

3.2.1.1.1. Aislamiento de levaduras

Se tomó 5 ml de muestra y se llevó a un tubo de ensayo, luego se adicionó 10 ml de solución Rauling (cuadro 06) y posteriormente se dejó en reposo a 20 °C, durante 24 horas. El principio se basa en la actividad isotónica que produce la solución Rauling frente a la pared celular de bacterias.

Después de 24 horas se realizaron diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} en agua peptonada estéril al 1% a partir de la muestra que contiene solución Rauling. De las diluciones se tomaron asepticamente 0,5 ml y se sembró en profundidad en agar Saboreaud al cual se le adicionó 300 mg/L. de metabisulfito de sodio, como agente inhibidor de levaduras no *Saccharomyces*. Luego de ello se llevó a incubación durante 48 horas, a 26°C ±2°C. Las colonias crecidas en el agar se resembraron en tubos con agar inclinado de igual composición, a pH 5,6; posteriormente, los tubos se incubaron durante 48 horas a 26°C ±2°C. Así de esta manera se realizó el aislamiento de la cepa de levadura nativa.

El mantenimiento de la cepa aislada se conservó en agar Saboreaud inclinado a 6°C con la finalidad de disminuir la variabilidad genética. Asimismo, la cepa se resembró en agar nuevo de igual composición cada 3 meses.

Cuadro 06: Composición química para 100 ml de solución Rauling

Peptona	0.50 g
NaCl	0.85 g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	0.90 g
KH ₂ PO ₄	0.15 g
Agua destilada	100 ml
pH	7.6

Fuente: Elaboración propia, 2010.

3.2.1.1.2. Identificación de la levadura

La identificación de género se realizó mediante microscopia y estudio fisiológico. Para la determinación morfológica se utilizó un microscopio óptico Revelatium 3, USA. Así mismo, en los ensayos de fisiología se utilizaron los siguientes azúcares; glucosa, almidón, galactosa, maltosa, lactosa y sacarosa.

3.2.1.1.2.1. Identificación morfológica de la levadura

La colonia aislada se observa directamente en el microscopio a una resolución de 40X, así se determinaron el color, textura y la forma de la colonia crecida sobre agar Sabouraud. Para la observación de células se preparó una suspensión celular a partir de la colonia aislada y se observó en el microscopio a la misma resolución. Se determinó la forma de las células como una herramienta para la identificación de géneros de levaduras.

3.2.1.1.2.2. Identificación fisiológica de la levadura

La identificación fisiológico se realizó cultivando la cepa aislada en un medio de

cultivo líquido con 2 % w/v de fuente de carbono, 1% w/v de peptona, 0.5% w/v de extracto de levadura ajustando el pH a 5,6. Se utilizó la técnica de fermentación en tubos de ensayo conteniendo tubos Durham, para ello se tomó una porción de cada colonia crecida en agar Saboraud y se inoculó directamente en los tubos de ensayo, luego se llevó a incubación por 48 horas a $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, realizando el control de producción de CO_2 y película a las 24 horas y 48 horas.

3.2.1.2. Prueba de tolerancia al etanol y ácido acético

La prueba de tolerancia al etanol y ácido acético se realizó con la finalidad de determinar la capacidad fermentativa de la cepa de levadura aislada en presencia de ácido acético y etanol, metabolitos que normalmente producen durante la fermentación alcohólica.

3.2.1.2.1. Tolerancia al etanol

La tolerancia de la cepa aislada al etanol exógeno se determinó evaluando su capacidad fermentativa. Se utilizó la técnica de cultivo en tubos de ensayo conteniendo tubos Durham en un medio líquido con 2 %w/v de glucosa, 1% w/v de peptona, 0.5% w/v de extracto de levadura ajustando el pH a 5.6, al cual se le añadió etanol a 97% v/v hasta alcanzar concentraciones en los tubos de 2.5% v/v, 5% v/v, 7.5% v/v y 10 % v/v respectivamente. La temperatura de fermentación fue $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y se realizó el control de los resultados a las 24 y 48 horas.

3.2.1.2.2. Tolerancia al ácido acético

La tolerancia de la cepa aislada al ácido acético se realizó evaluando su capacidad fermentativa, para ello se utilizó la técnica de cultivo en tubos de ensayo conteniendo tubos Durham en un medio líquido con 2% w/v de glucosa, 1% w/v de peptona, 0.5% w/v de extracto de levadura ajustando el pH a 5.6, al cual se agregó ácido acético 98% v/v, hasta alcanzar concentraciones de 100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L y 500 mg/L respectivamente, la fermentación se realizó a $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas, y los resultados se tomaron a las 24 horas y 48 horas.

3.2.1.3. Producción de etanol de la levadura aislada

La producción de etanol de la levadura aislada se realizó con la finalidad de determinar la capacidad fermentativa de la cepa de levadura aislada.

3.2.1.3.1. Preparación de inóculo

El inóculo para los ensayos de fermentación se obtuvo cultivando la cepa aislada en frascos Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo 100 ml de mosto de frutas en descarte al 2% w/v como medio de cultivo, el pH se ajustó a 4.5. La propagación del inóculo se realizó a $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ a 100 rpm de agitación, durante 48 horas en un agitador construido para tal fin como se muestra en el anexo 05.

3.2.1.3.2. Fermentación de mosto de frutas en descarte

Para determinar el volumen de etanol que la cepa aislada es capaz de producir, se utilizó mosto de frutas en descarte como medio de fermentación. El mosto obtenido se diluyó hasta obtener 16 °Brix de sólidos totales. Las fermentaciones se realizaron a 29°C \pm 1°C y el pH del medio se ajustó a 4.5. Las fermentaciones se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 200 ml de medio de fermentación estéril. A los matraces se acondicionaron gargantas de cisne conteniendo glicerol para asegurar la esterilidad del medio. Las lecturas se realizaron cada 12 horas y se determinaron la concentración de etanol, pH y el CO₂ disipado durante la fermentación. La fermentación se consideró terminada cuando el peso del medio de cultivo fue constante y no se observó producción de CO₂. Además, la concentración de etanol producido se determinó mediante la técnica de picnometría y el pH se determinó mediante la técnica de valoración potenciométrica.

3.2.2. Proceso de fermentación alcohólica

3.2.2.1. Preparación de inóculo

El inóculo para la fermentación se cultivó en mosto de frutas en descarte como medio de cultivo diluyendo la concentración de azúcar hasta 2% w/v y ajustando el pH a 4.5. La propagación del cultivo se llevó a cabo en un agitador a 100 rpm a 29°C \pm 1°C durante 48 horas. La cantidad de inóculo utilizado para realizar la fermentación fue de 5% v/v con respecto al volumen de fermentación.

3.2.2.2. Fermentación alcohólica

El proceso de fermentación se llevó a cabo en cubas de fermentación de 20L de capacidad acondicionadas para tal fin como se muestra en el anexo 05. Para el proceso de fermentación los mostos fueron previamente pasteurizados a 80°C por 20 minutos, seguidamente, se inóculo y se dejó fermentar a 20°C. En esta etapa se manipuló la variable suministro de aire con los niveles de 0 L/h/L. y 0,032 L/h/L. (Litros de aire/hora/litros de mosto). Durante el proceso se midió el pH, acidez, sólidos totales y la producción de etanol. La fermentación se dio por concluido cuando no se observó producción de CO₂ y cuando el mosto de fermentación alcanzó un contenido de etanol de 5% v/v.

3.3. Obtención del vinagre de frutas en descarte

3.3.1. Producción del inóculo e identificación de bacterias acéticas

En la presente investigación se utilizó una población mixta de bacterias acéticas quienes serán los responsables de la acetificación del mosto fermentado. Cabe mencionar que la ruta metabólica de acetificación es una ruta corta, por tanto los metabolitos generados por las distintas cepas de bacterias acéticas son los mismos, aportando así cada cepa la misma calidad organoléptica al producto final, por ello no se considera importante el aislamiento de una cepa de la bacteria responsable de la acetificación y se opta por trabajar con una población mixta.

3.3.1.1. Producción de inóculo



Para obtener el inóculo se acondicionó un proceso de generación de vinagre espontáneo. Se fermentó espontáneamente en una cuba los mostos de manzana y plátano procedente del mercado “las Américas” durante diez meses a temperatura ambiente. Las cubas fueron agitadas interdiariamente por un intervalo de 10 minutos durante todo el proceso de fermentación. Al término de los diez meses se evaluó el contenido de ácido acético y la identificación de las bacterias.

3.3.1.2. Identificación de las bacterias acéticas

Se tomó aproximadamente 1ml de muestra y se sembró en superficie en agar manitol (Cuadro 07) a pH 5,6 luego de ello se llevo a incubación durante 48 horas, a $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Se tomaron las colonias crecidas para identificar las bacterias acéticas realizando la tinción Gram ayudado de un microscopio óptico a una resolución de 100X de esta manera se identifica las bacterias acéticas. El principio se basa en el agar selectivo manitol que permite el crecimiento exclusivo de bacterias acéticas.

Cuadro 07: Composición del medio Manitol.

Extracto de levadura	5g/L.
Peptona	3g/L.
Manitol	25g/L.
Agar	20g/L.
Agua destilada	

Fuente: Elaboración propia, 2010.

3.3.2. Proceso de fermentación acética

La conversión del etanol producido durante la fermentación alcohólica de los mostos, en ácido acético se llevó a cabo en un biorreactor estándar de acero inoxidable de 25L construido para tal fin (anexo 05). El cultivo en biorreactor se llevó a cabo con una agitación constante de 140 rpm, flujo de aireación de 3.4 L/h/L. de medio, inóculo de 6% v/v y 1 % de acidez para dar inicio la fermentación acética.

En esta etapa de la investigación se manipuló la variable temperatura con los niveles 20°C y 30°C, estos niveles son manipulados en función al diseño experimental. Durante la fermentación acética se midió el pH, acidez, % de etanol. El proceso se dio por concluido cuando la concentración de ácido acético alcanzo su equivalente en conversión de etanol.

3.4. Evaluación del producto final

3.4.1. Evaluación fisicoquímica del vinagre

Respecto a la calidad fisicoquímica del vinagre se evaluó el contenido de la acidez fija y la acidez volátil, mediante la técnica de valoración potenciométrica y por diferencia respectivamente.

3.4.2. Evaluación organoléptica del vinagre

La calidad organoléptica se evaluó para determinar la aceptabilidad del vinagre, se realizaron pruebas afectivas y pruebas descriptivas.

Para las pruebas afectivas el panel sensorial estuvo constituido por 40 jueces no entrenados seleccionados en función al hábito de uso del producto. Este tipo de prueba se realizó para evaluar atributos como sabor, flavor, color y olor del vinagre de frutas en descarte con una escala hedónica de siete puntos con las siguientes calificaciones: me desagrada muchísimo, me desagrada mucho, me desagrada poco, me agrada más o menos, me agrada poco, me agrada mucho y me agrada muchísimo como se muestra en el anexo 04.

Por otra parte, para las pruebas descriptivas el panel sensorial estuvo constituido por 15 jueces semi entrenados. Este tipo de prueba se realizó para evaluar atributos del perfil sensorial del vinagre tales como sabor frutal, sabor astringente, sabor agrio, sabor alcohólico y sabor acético del vinagre de frutas en descarte con una escala hedónica de cinco puntos con las siguientes calificaciones: imperceptible, ligero, moderado, fuerte y muy fuerte como se muestra en el anexo 04.

Para realizar la evaluación organoléptica se utilizaron cartillas de respuesta para recolectar las puntuaciones obtenidas por cada juez (anexo 04) y posteriormente se evaluaron estadísticamente.

3.4.3. Procesamiento y análisis de datos

Los resultados de las variables respuestas obtenidos en la etapa de evaluación del producto final son recopilados y preparados para ser procesados, para ello se hace uso de una computadora provista de software (Statistica 7, SPSS y Microsoft Office Excel 2007) para obtener resultados finales con la mayor precisión y veracidad. Para el procesamiento de datos el diseño experimental se presenta en la tabla 03.

Tabla 03: Diseño experimental de la investigación.

N° de tratamientos	Factores				N° Repeticiones
	Suministro de aire (L/h/L)		Temperatura acetificación (°C)		
	Niveles				
	0	0.032	20	30	
T1	0		20		3
T2	0		30		3
T3	0.032		20		3
T4	0.032		30		3
Total de ensayos					12

Fuente: Elaboración propia, 2010.

Los resultados obtenidos de las variables respuestas son procesados utilizando las siguientes técnicas matemáticas:

- Evaluación de atributos mediante el diagrama de telaraña.
- Análisis de varianza para los factores que afectan sobre las características finales del producto.
- Prueba de Comparaciones Múltiples de Duncan.

IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención y acondicionamiento de la materia prima

El proceso de obtención y acondicionamiento de materia prima se detalla en la sección 3.1. Obteniéndose así un mosto con 11°Brix y pH 4.5.

4.2. Fermentación alcohólica del mosto de frutas en descarte

4.2.1. Obtención de una cepa de levadura para la fermentación alcohólica

En la presente investigación se obtuvo una cepa de levadura con características adecuadas para ser utilizado en la fermentación alcohólica del mosto de frutas en descarte, la obtención de una cepa de levadura es importante porque nos permite trabajar con cepas puras y así evaluar la contribución de la levadura en la definición de las características generales del producto final. Los procedimientos para la obtención de una cepa de levadura esta descrita en las secciones 3.2.1.1, 3.2.1.2 y 3.2.1.3.

4.2.1.1. Aislamiento e identificación de levaduras

4.2.1.1.1. Aislamiento de levaduras

El procedimiento del aislamiento de levaduras esta descrita en la sección 3.2.1.1.1. La adición de metabisulfito de sodio está relacionada con el pH del medio. El pH define el

grado de disociación del metabisulfito de sodio y la fracción activa antimicrobiana está conformada por SO₂ libre. El metabisulfito de sodio es un agente inhibidor del crecimiento y desarrollo de levaduras excepto en especies de los géneros *Saccharomyces* (Estela, 2004). La cepa aislada pertenece al género *Saccharomyces* se rotulo para facilitar su identificación como sigue:

Cepas	Género	Símbolo
I	<i>Saccharomyces sp.</i>	Sc BA-IA-2009-I

La cepa de levadura aislada se utilizó posteriormente para la identificación, en los ensayos de tolerancia a etanol, ácido acético y producción de etanol.

4.2.1.1.2. Identificación de la levadura

La evaluación microscópica de apariencia de las colonias y el estudio fisiológico de fermentación de azúcares son técnicas básicas que nos permiten identificar grupos de levaduras acercándonos al género.

4.2.1.1.2.1. Identificación morfológica de la levadura

El procedimiento para la identificación de levaduras por microscopia se detalla en la sección 3.2.1.1.2.1. Los aspectos que se evaluaron fueron: textura, color, apariencia y forma de la colonia.

Las colonias aisladas presentaron textura blanda, color crema, apariencia brillante, de forma circular con bordes irregulares y sin anillos, estas características coinciden con lo señalado por Withe, 1995 y, Aguilar *et al.*, 2003. En la figura 03 se muestra las imágenes de la colonia de levadura aisladas.

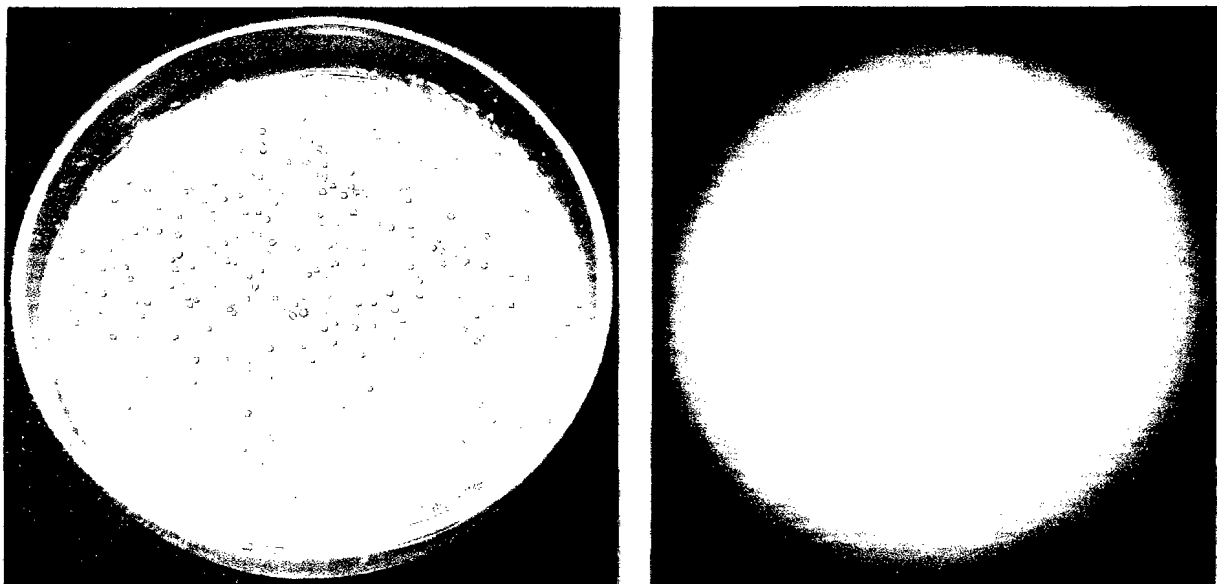


Figura 03: Colonia de la levadura aislada

4.2.1.1.2.2. Identificación fisiológica de la levadura

El procedimiento para la identificación fisiológica de fermentación de azúcares esta detallado en la sección 3.2.1.1.2.2, y los resultados obtenidos se muestra en la tabla 04.

Tabla 04: Evaluación de la capacidad fermentativa de azúcares de la levadura aislada

Cepa		Cepa Sc BA-IA-2009-I
Fuentes de carbono		Formación de CO ₂
Glucosa	24 h	+++
	48 h	+++
Maltosa	24 h	+++
	48 h	+++
Almidón	24 h	-
	48 h	-
Sacarosa	24 h	+++
	48 h	+++
Galactosa	24 h	-
	48 h	-
Lactosa	24 h	-
	48 h	-

+ = Débil, ++ = Moderado, +++ = Intenso y - = nulo

Fuente: Elaboración propia, 2010.

Los resultados en la tabla 04 muestran que la cepa aislada es capaz de fermentar intensamente glucosa, maltosa y sacarosa a comparación de lactosa y almidón, los resultados concuerdan con Lagos, 1999, quien manifiesta que levaduras *Saccharomyces cerevisiae* fermentan glucosa y sacarosa y son variables en cuanto a la fermentación de maltosa y galactosa y no fermentan lactosa. Estos resultados son importantes ya que contribuyen a confirmar el género de la cepa aislada (*Saccharomyces*).

4.2.1.2. Prueba de tolerancia al etanol y ácido acético

El etanol y ácido acético son los principales componentes producidos durante la fermentación alcohólica, ellos tienen efectos inhibitorios en la fermentación de azúcares a medida que su concentración se incrementa durante la fermentación. En la producción de

vinagre se utilizan habitualmente cepas de levadura que puedan tolerar concentraciones de etanol sobre el 5% v/v.

4.2.1.2.1. Tolerancia al etanol

La tolerancia al etanol por levaduras está relacionado con la composición de los lípidos de su membrana celular. Las levaduras que toleran concentraciones altas de etanol son aquellas capaces de mantener la estabilidad de su membrana celular en el transcurso de la fermentación. El procedimiento para los ensayos de tolerancia al etanol exógeno se describen en la sección 3.2.1.2.1. Los resultados se muestran en la tabla 05.

Tabla 05: Evaluación de la tolerancia al etanol exógeno por la levadura aislada

Levadura		Cepa Sc BA-IA-2009-I
Concentración de etanol		Formación de CO ₂
2.5%	24 h	+++
	48 h	+++
5.0%	24 h	+
	48 h	+++
7.5%	24 h	+
	48 h	++
10.0%	24 h	-
	48 h	-

+ = Débil, ++ = Moderado, +++ = Intenso y - = nulo

Fuente: Elaboración propia, 2010.

La tolerancia al etanol se determinó indirectamente observando la producción de CO_2 a 24h y 48h de cultivo. La producción de CO_2 es un indicador de la capacidad que tienen las cepas aisladas para fermentar azúcares en presencia de una determinada concentración de etanol exógeno. Los resultados de la tabla 05 muestran que la cepa de levadura fermenta intensamente aún con una concentración de 5%v/v de etanol exógeno y moderadamente aún con una concentración de 7.5%v/v de etanol adicionado externamente al medio. Estos resultados son favorables para nuestro propósito, nos da una idea que la cepa podría utilizarse en la producción de vinagre desde que el contenido alcohólico esperado durante la fermentación alcohólica será del 5% v/v. Es necesario indicar que, el efecto inhibitorio del etanol exógeno es menor al efecto inhibitorio del etanol endógeno, aquél etanol producido por las levaduras durante la fermentación de azúcares internamente. Explicaciones sobre el efecto inhibitorio del etanol fueron mencionados ya en su momento por Aguilera *et al*, 2003 quien manifiesta que el etanol ejerce una inhibición sobre la membrana celular.

4.2.1.2.2. Tolerancia al ácido acético

Las levaduras durante la fermentación de azúcares producen normalmente ácido acético, se producen concentraciones que no sobrepasan 1g/L, sin embargo estas concentraciones son suficientes para inhibir el crecimiento de las levaduras y detener la fermentación alcohólica en concordancia con lo manifestado por Acevedo *et al* 2003. El procedimiento para los ensayos de tolerancia al ácido acético se muestra en detalle en la sección 3.2.1.2.2, los resultados se presentan en la tabla 06.



Tabla 06: Efecto del ácido acético exógeno en la fermentación de la levadura aislada

Cepas		Sc BA-IA-2009-I
Conc. de ácido acético		Formación de CO ₂
100ppm	24 h	+++
	48 h	+++
200ppm	24 h	+++
	48 h	+++
300ppm	24 h	+++
	48 h	+++
400ppm	24 h	+++
	48 h	+++
500ppm	24 h	+++
	48 h	+++

+ = Débil, ++ = Moderado, +++ = Intenso y - = nulo

Fuente: Elaboración propia, 2010.

La evaluación de tolerancia al ácido acético exógeno por la cepa aislada se determinó indirectamente mediante la observación de producción de CO₂. De los resultados mostrados en la tabla 06 podemos observar que la cepa fermentó vigorosamente inclusive a concentraciones de 500 mg/L de ácido acético exógeno. La producción de ácido acético por levaduras está relacionado principalmente con la naturaleza en sí de la cepa, la temperatura de fermentación y la composición del medio de fermentación en concordancia con lo manifestado por Bellisimi *et al.*, 2004. El ácido acético y el etanol en conjunto en el medio ejercen un efecto sinérgico inhibitorio a medida que sus concentraciones se incrementan.

4.2.1.3. Producción de etanol de la levadura aislada

El procedimiento para la producción de etanol de la levadura aislada se detalla en la sección 3.2.1.3; los resultados se muestra la figura 04 los datos se muestran en el anexo 01.

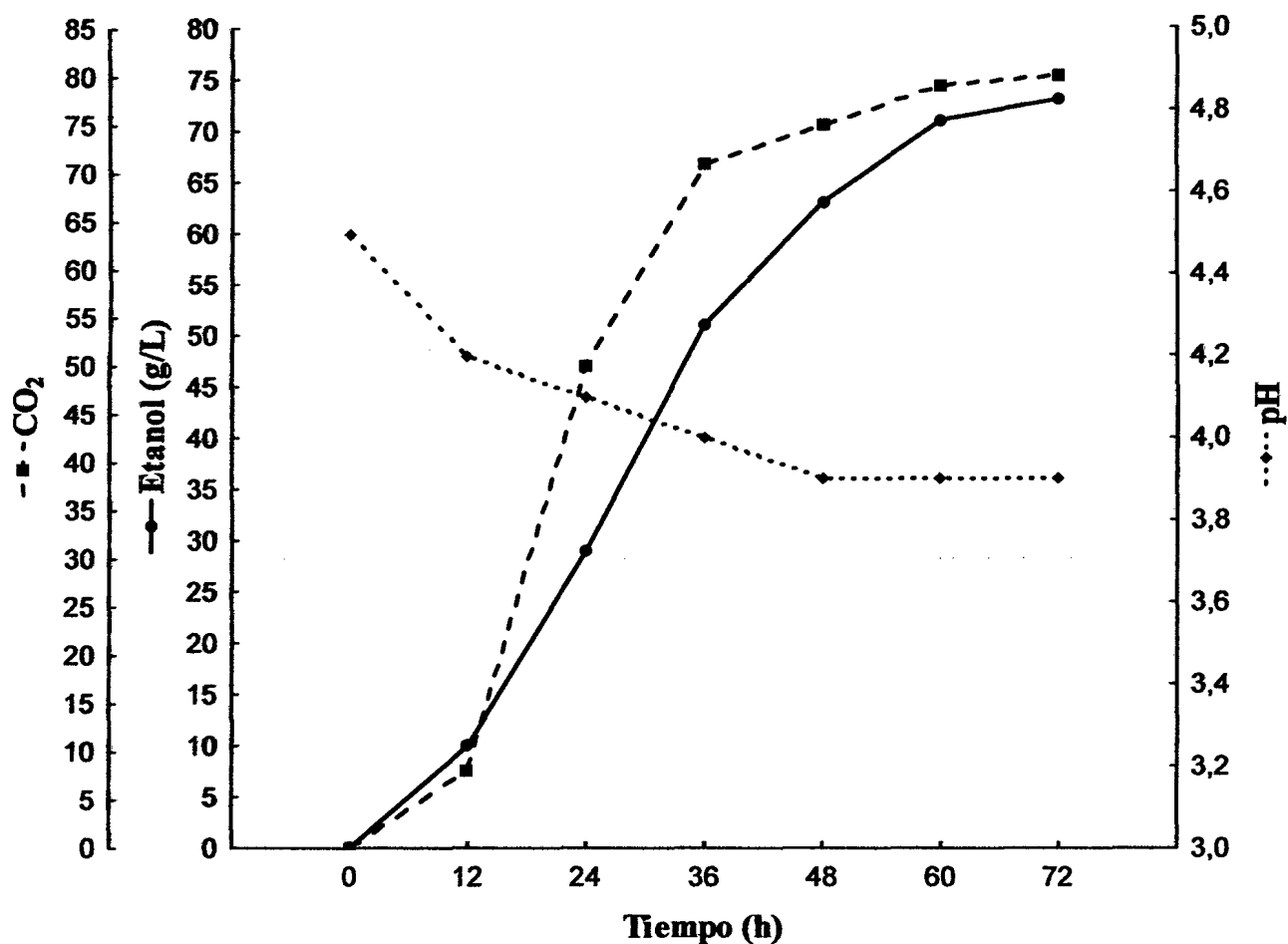


Figura 04: Cinética de la producción de etanol por la cepa Sc BA-IA-2009-I.

La producción de etanol está relacionada con la producción de CO₂, desde que la fermentación de los azúcares fermentables conduce a la formación de etanol, CO₂ y otros componentes en menor proporción. La producción de CO₂ puede controlarse indirectamente, midiendo la pérdida en peso del medio de fermentación; mediante esta técnica puede obtenerse la tasa de producción de CO₂ y así saber en qué momento la fermentación ha concluido. En los resultados se puede observar que la fermentación concluyó a las 72 horas cuando no se observó variabilidad en los pesos de los medios de fermentación.

En la figura 04, se puede observar que la levadura produce 69g/L de etanol, por lo que se confirma una vez más que el efecto inhibitorio del etanol endógeno es mayor que el efecto inhibitorio del etanol exógeno, esto es debido a que el etanol producido por la levadura actúa directamente en el aparato enzimático expuesto en el citoplasma y así mismo en la membrana citoplasmática como lo indican Calderón, 2007 y Suarez, 1997. Referente a la variación del pH en las figuras 04 se observan que durante las primeras 36 horas hay una disminución marcada del pH hasta alcanzar valores de 3,9. La disminución del pH se debe a la síntesis de ácido acético y ácido pirúvico principalmente manifestado por Abad, 2006.

4.2.2. Proceso de fermentación alcohólica

El procedimiento para el proceso de fermentación alcohólica se detalla en la sección 3.2.2. Durante la fermentación alcohólica de los mostos de frutas en descarte se midió el pH, acidez, sólidos totales y la producción de etanol y los resultados se muestran en la figura 05 y figura 06, los datos se muestran en el anexo 02.

En los resultados de la figura 05, se puede observar que la fermentación alcohólica completa del mosto de frutas en descarte duró en promedio 84 horas encontrando similitud con lo reportado por Gómez *et al.*, 2006 quienes reportan 82,3 horas para alcanzar una concentración de etanol de 47,8 g/L; así como también Godina, 2004 encontró una concentración de etanol de 55g/L durante 82 horas. La variación del tiempo transcurrido y la concentración de etanol conseguido durante la fermentación alcohólica se deben a la

influencia de un conjunto de factores tales como la composición del medio de fermentación, la naturaleza de la cepa, la temperatura de fermentación y concentración de biomasa responsable de la fermentación.

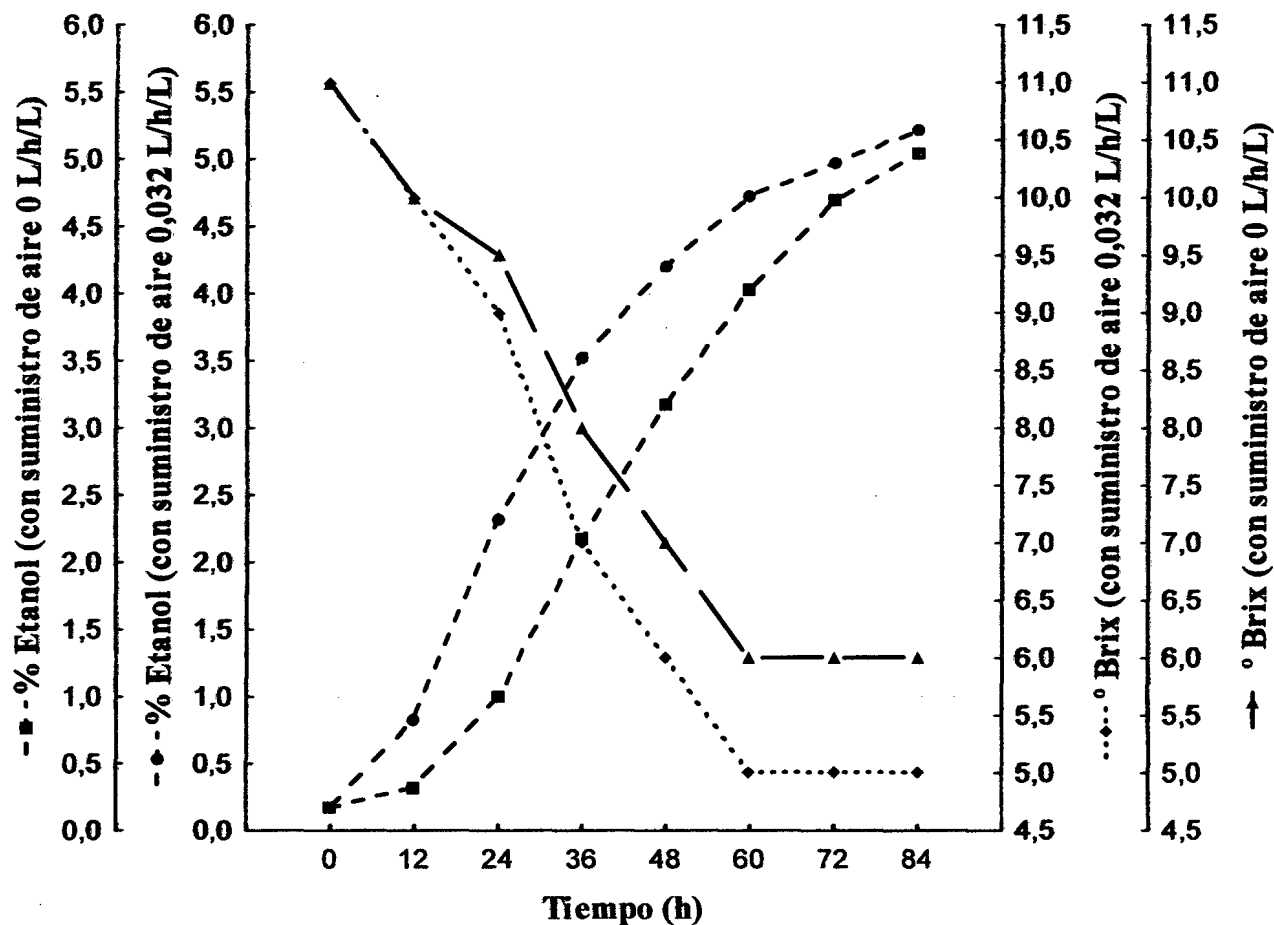


Figura 05: Cinética del etanol y °Brix en la fermentación alcohólica.

La concentración promedio de etanol encontrado en la investigación es de 5,225% para los tratamientos con suministro de aire de 0,032 L/h/L y, 5,050% para los tratamientos con suministro de aire de 0 L/h/L. O'Connor et al., 1990; Van et al., 1995 y Estela, 2004

manifiestan la importancia del oxígeno para mejorar la estabilidad de la membrana celular de las levaduras a causa de la síntesis de ergosterol favorecida por la presencia de oxígeno. Por lo tanto, la variación de la concentración de etanol por efecto del suministro de aire está relacionada básicamente a la estabilidad celular que presentan las levaduras al efecto inhibitorio del etanol y a la biomasa adicional producido por la incorporación de oxígeno.

Por otra parte, en la figura 05 se puede observar que la velocidad de fermentación presenta diferencias, donde los tratamientos con suministro de aire de 0,032 L/h/L. presenta mayor velocidad de fermentación en comparación a los tratamientos con suministro de aire de 0 L/h/L. Esto sucede a efecto del incremento de biomasa en presencia del oxígeno, los resultados tienen relación con lo señalado por Bringer *et al*, 1995 y Ribéreau *et al.*, 2003 quienes indican para conseguir una población de biomasa adecuada y obtener una buena velocidad de fermentación es necesario incorporar oxígeno.

Con respecto a la concentración de sólidos totales se puede observar según los resultados de la figura 05 una tendencia típica del consumo de sustrato en fermentación alcohólica. Asimismo, se puede percibir que existe mayor consumo de sustrato en los tratamientos con suministro de aire de 0,032 L/h/L en comparación a los tratamientos con suministro de aire de 0 L/h/L, la causa para este efecto es la concentración de biomasa adicional producido en presencia de oxígeno y el incremento de tolerancia al etanol por parte de la biomasa, encontrándose concordancia con lo manifestado por Bringer *et al*, 1995 quienes indican que a mayores concentraciones de biomasa la velocidad de fermentación será mayor y naturalmente el consumo de sustrato será también mayor.

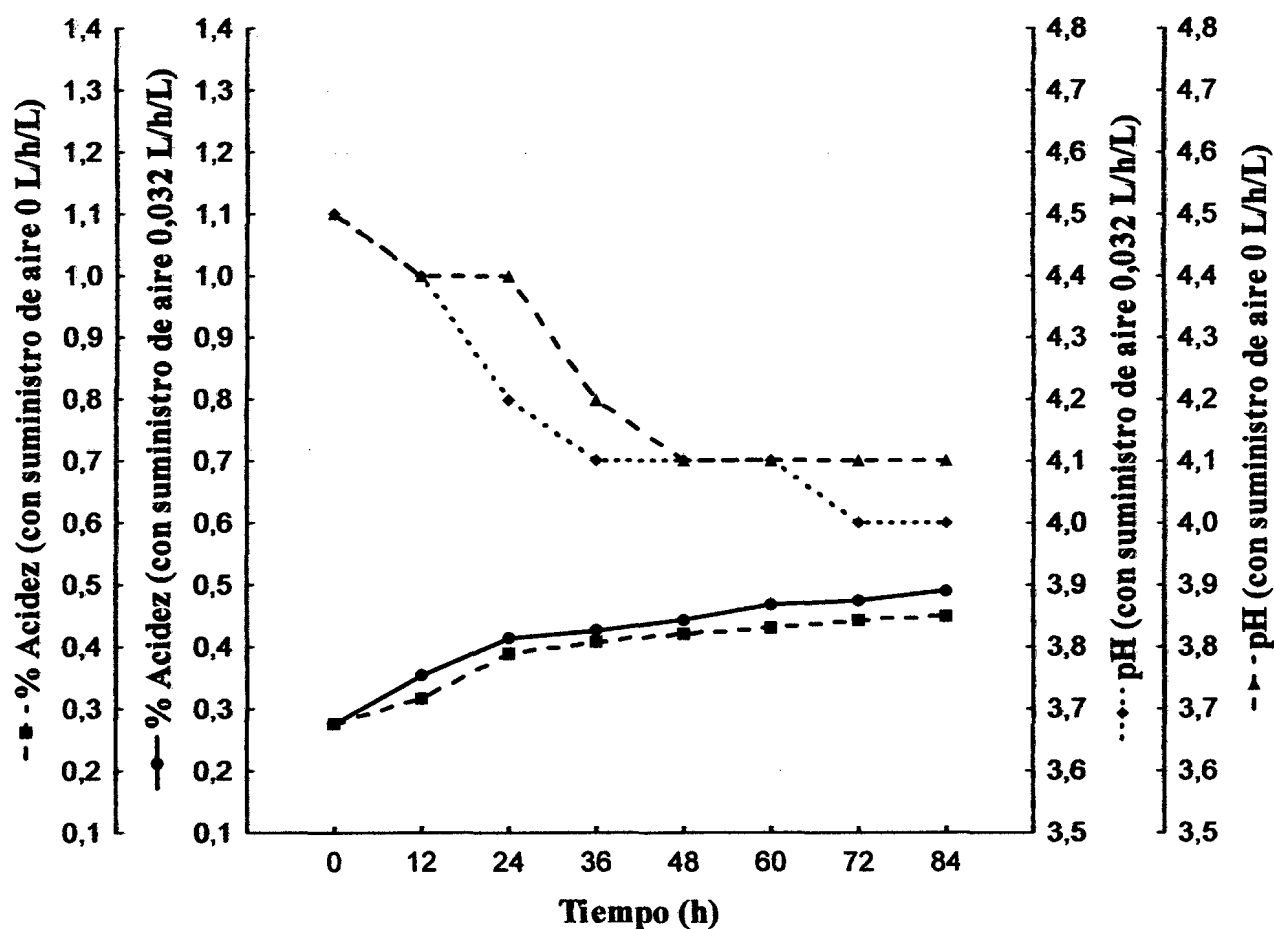


Figura 06: Cinética de la acidez y pH en la fermentación alcohólica.

En relación a la variación del pH en las figura 06 se observa que en los primeros 48 horas hay una disminución marcada del pH hasta alcanzar valores de 4,0 y 4,1 para los tratamientos 0,032 L/h/L y 0 L/h/L respectivamente; la disminución del pH se debe a la síntesis de ácido acético y ácido pirúvico principalmente como lo reporta Ramírez, 2006 y Abad, 2006. Asimismo, con respecto a la acidez se observa en la figura 06 que se obtuvieron concentraciones de 0,491% para los tratamientos con suministro de aire de 0,032 L/h/L y 0,449% para los tratamientos con suministro de aire de 0 L/h/L; estos valores

coinciden con lo reportado por Ramírez, 2006 y Ferreyra, 2006 quienes indican que la concentración de acidez producida durante la fermentación alcohólica puede alcanzar valores de 1%. Por otra parte, cabe indicar que los valores de la acidez tiene una relación directa con los valores del pH es decir el fermento que presenta mayor acidez presenta menor pH y esto se puede demostrar con los resultados que se presentan en la figura 06.

4.3. Obtención del vinagre de frutas en descarte

4.3.1. Producción de inóculo e identificación de bacterias acéticas

El procedimiento para la producción de inóculo e identificación de bacterias acéticas se detallan en las secciones 3.3.1.1 y 3.3.1.2 respectivamente. El mosto fermentado espontáneamente donde se cultivo las bacterias acéticas presentó una concentración de 9,4 % de ácido acético después de 10 meses de fermentación. Y observadas al microscopia de colonias representativas se consiguieron identificar como bacterias Gram positivas, esta característica coincide con lo señalado por De ley *et al.*, 1984 y Sokollek *et al.*, 1998 quienes indican que las bacterias acéticas pueden ser bacterias Gram positivas.

4.3.2. Proceso de fermentación acética

El procedimiento para el proceso de fermentación alcohólica se detalla en la sección 3.3.2. Durante la fermentación alcohólica de los mostos de frutas en descarte se midió el pH, acidez, acidez y % de etanol y los resultados se muestran en la figura 07 y figura 08, los datos se muestran en el anexo 03.

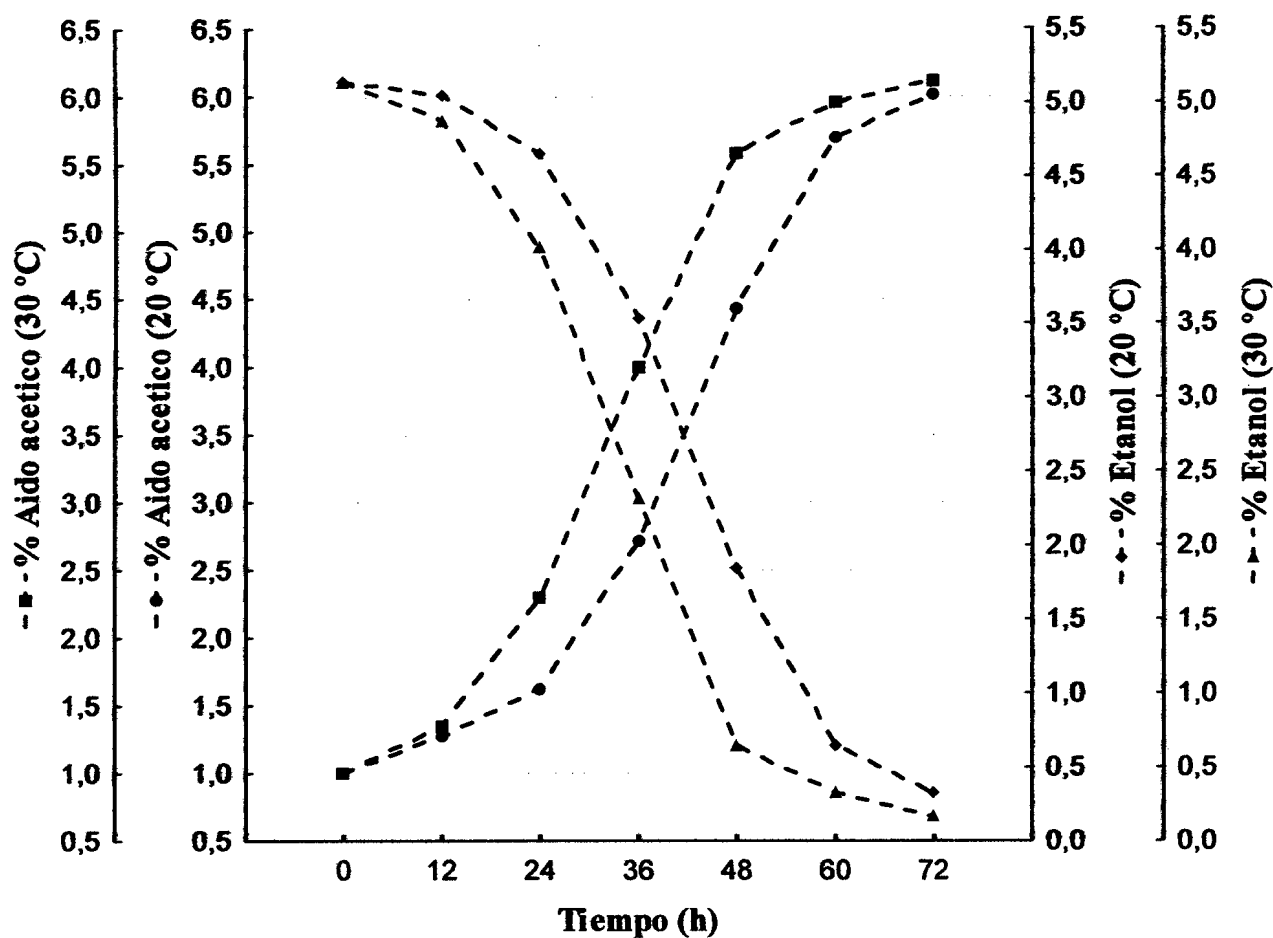


Figura 07: Cinética de etanol y ácido acético en la fermentación acética.

La evolución de la concentración del etanol y ácido acético en función del tiempo se muestra en la figura 07, observándose que el consumo de etanol por bacterias acética es acompañado de la producción de ácido acético. Esta fermentación acética del licor de frutas en descarte tuvo una duración de 72 horas encontrando similitud con lo reportado por Pizarro, 2005 presentando una concentración de 5,8% de ácido acético durante 4 días de fermentación a 28°C y así como también Silva *et al.*, 2007 quienes por su parte presentaron concentraciones de 6% de ácido acético a 20°C durante 72 horas, en tanto que Gómez *et al.*, 2006 obtuvieron vinagre con una concentración de 2,4% a una temperatura de 28°C en 99,5

horas esta diferencia en el tiempo de fermentación estaría relacionada con la concentración inicial de ácido acético como activador de las bacterias descrita por Bar citado pro De Ory *et al.*, 2002, quien afirma que el ácido acético tiene carácter de activador a la vez de inhibidor sobre la actividad de las bacterias acéticas, por lo que ha propuesto 10g/L de ácido acético como activador de las bacterias acéticas.

En los resultados presentados en la figura 07, se puede observar que el etanol disminuyo de 5,14 % a 0,325 % y 5,14 % a 0,175 %; la concentración de ácido acético aumento de 1% a 6,010% y de 1% a 6,110% para los tratamientos con temperatura de 20°C y 30°C respectivamente en cada caso. Esta variación se manifiesta a causa de la actividad cinética que presenta la temperatura sobre las enzimas alcohol deshidrogenasa y acetaldehído deshidrogenasa enzimas ubicadas sobre la pared celular de las bacterias así como lo demostró Van`t Hoff asegurando que al incrementar la temperatura en 10°C la intensidad fermentaria se duplicaría.

Por otro lado, en la figura 07 se muestra el comportamiento de etanol y ácido acético versus tiempo presentando una típica tendencia fermentativa, observándose una fase de latencia, que en términos generales podría ser resumido como una fase en la cual las bacterias consumen el máximo de su energía para la adaptación metabólica a las nuevas condiciones ambientales del cultivo y se observa claramente que en promedio los tratamiento a 20°C tiene mayor fase lag y por lo tanto la velocidad de acetificación es menor.

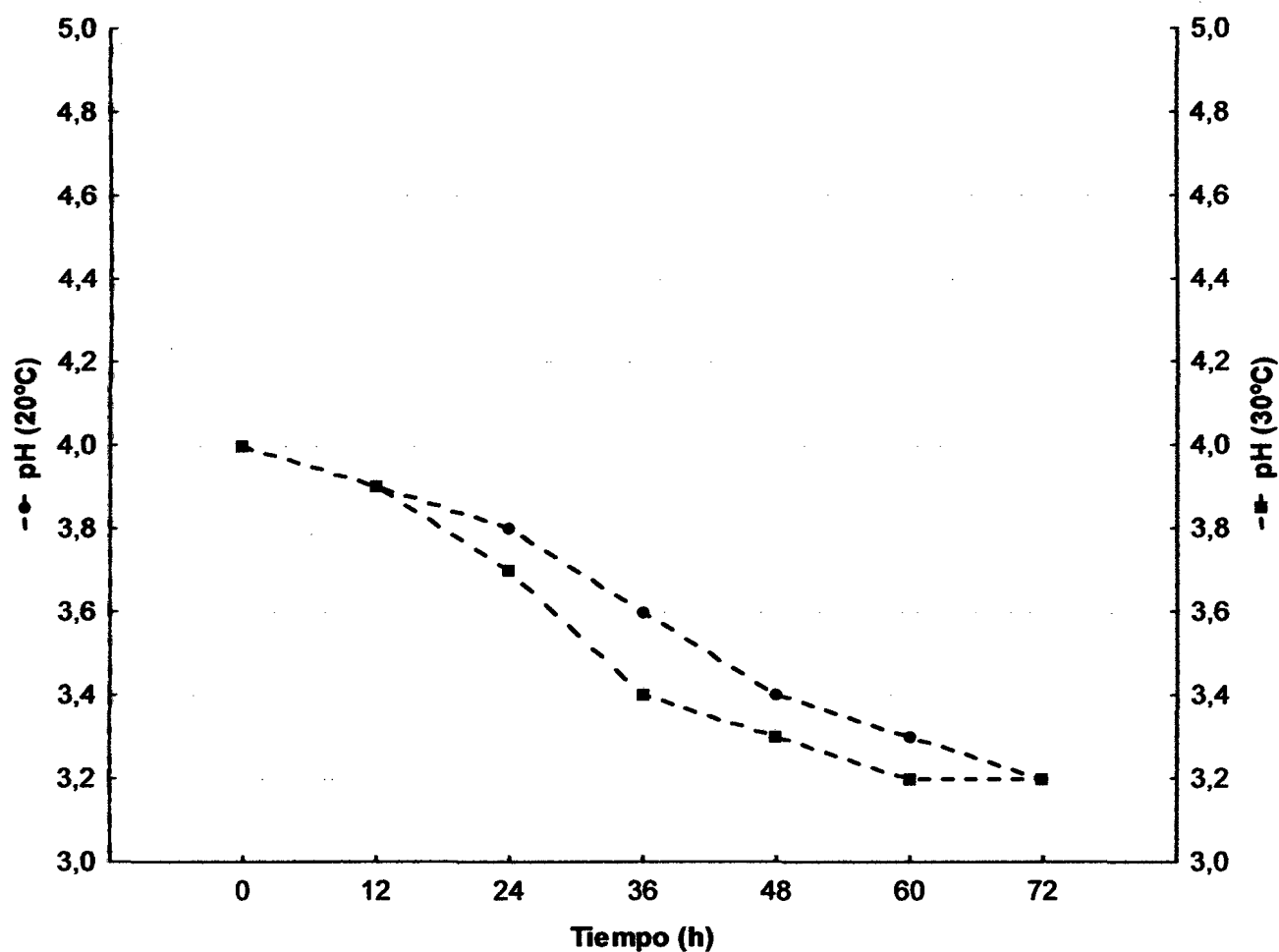


Figura 08: Cinética del pH en la fermentación acética.

En la figura 08 se muestra la variación de pH a 20°C y 30°C en el proceso de acetificación durante 72 horas. Donde se puede observar que el pH disminuyó a valores promedio de 3,2 en ambos casos. Estos valores se acercan a los valores reportados por Gomez, 2006, quien reporta pH promedio de 2,85. Al término de la fermentación se obtuvo un vinagre clara de apariencia agradable. Una vez obtenida el vinagre se realizaron los análisis fisicoquímico y sensorial.

4.4. Evaluación del producto final

4.4.1. Evaluación fisicoquímica del vinagre

La evaluación fisicoquímica incluye acidez total y acidez fija. Los valores promedios de los resultados se muestra en la tabla 07.

Tabla 07: Evaluación fisicoquímicas del vinagre obtenido.

Tratamientos	Propiedades fisicoquímicas	
	Acidez volátil (%)	Acidez fija (gr/Lt)
T1	5,5933 ± 0,0058 ^a	4,0333 ± 0,0058 ^a
T2	5,6600 ± 0,0140 ^b	4,1000 ± 0,0100 ^a
T3	5,6000 ± 0,0135 ^a	4,4166 ± 0,0126 ^b
T4	5,7033 ± 0,0153 ^c	4,4867 ± 0,0055 ^b

*Promedio ± D.E. de la evaluación de las propiedades fisicoquímicas/ letras distintas en las filas indican diferencia significativa entre tratamientos.

Fuente: Elaboración propia, 2010.

a. Acidez volátil

El análisis de varianza para la concentración de acidez volátil reporta que existe una influencia estadística altamente significativa del factor temperatura de acetificación así como también del factor suministro de aire. Por otro lado, indica que existe una influencia significativa de la interacción de ambos factores sobre las medias de la variable respuesta, a un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$). Asimismo, el coeficiente R^2 obtenido para esta variable respuesta fue de 98,34%.

Por otra parte, el tratamiento estadístico de comparaciones múltiples de Duncan ($p < 0,05$) para la concentración de acidez volátil, reporta diferencia estadística significativa entre los tratamientos, donde los tratamiento T1 y T3 son estadísticamente iguales y los tratamientos T2 y T4 son estadísticamente distintos entre ellas y respecto al tratamiento T1 y T3. Asimismo, el análisis de Duncan indica que el tratamiento que presenta mayor concentración de acidez volátil es el tratamiento cuatro (T4) y los tratamientos que presentan menor concentración de acidez volátil son los tratamientos uno (T1) y tres (T3).

b. Acidez fija

De acuerdo al análisis de varianza encontramos que existe una influencia estadística altamente significativa del factor suministro de aire sobre las medias de la variable respuesta a un nivel de significación del 95% ($p < 0,05$), lo que demuestra que esta variable es independiente. El coeficiente R^2 para esta respuesta es de 98,10%.

Igualmente, el tratamiento estadístico del Test de comparación múltiple de Duncan ($p < 0,05$) para la concentración de acidez fija, reporta diferencia estadística significativa entre los tratamientos. Asimismo, muestra que los tratamientos T3 y T4 son estadísticamente iguales pero estadísticamente diferentes a los tratamientos T1 y T2 y estos últimos estadísticamente iguales entre ellos. Por otro lado, para obtener mayores concentraciones de acidez fija se deben trabajar con los tratamientos T3 y T4 y viceversa con los tratamientos T1 y T2.

4.4.2. Evaluación organoléptica del vinagre

La evaluación organoléptica realizada para valorar la calidad sensorial del vinagre obtenido a partir de frutas en descarte incluye pruebas afectivas (sabor, flavor, color y olor) y perfil sensorial del vinagre (frutal, astringente, agrio, alcohólico y acético).

4.4.2.1. Pruebas afectivas del vinagre

En la tabla 08 se observa la media para cada uno de los atributos, de las calificaciones que entregaron los 40 jueces que componen el panel sensorial para las pruebas afectivas.

Tabla 08: Evaluación de las pruebas afectivas del vinagre obtenido.

TRAT.	ATRIBUTOS			
	Color	Sabor	Olor	Flavor
T1	6,3556 ± 0,1018 ^c	4,3556 ± 0,1018 ^a	5,2667 ± 0,0666 ^a	4,3333 ± 0,1333 ^a
T2	6,2444 ± 0,1020 ^c	5,7333 ± 0,0667 ^b	5,8444 ± 0,0385 ^b	6,1556 ± 0,1678 ^c
T3	5,3333 ± 0,1155 ^b	5,5778 ± 0,1388 ^b	5,8000 ± 0,1155 ^b	5,2667 ± 0,1155 ^b
T4	4,7778 ± 0,1008 ^a	6,1111 ± 0,0385 ^c	6,6222 ± 0,0384 ^c	6,6222 ± 0,1018 ^d

*Promedio ± D.E. de las evaluaciones de los 40 jueces/ letras distintas en las filas indican diferencia significativa entre tratamientos.

Fuente: Elaboración propia, 2010

a. Aceptabilidad de color

Según el análisis de varianza ($p < 0,05$) se encontró influencia estadística altamente significativo para los factores suministro de aire, así como también para la temperatura de

acetificación, en cambio para la interacción de factores se encontró influencia estadística significativo, esto quiere decir que los factores actúan en forma independiente. El coeficiente R^2 para esta respuesta es de 97,30%.

El análisis estadístico de Test de comparación múltiple de Duncan ($p < 0,05$) para la aceptabilidad de color reporta diferencia significativa entre los tratamientos, indica que los tratamientos T1 y T2 son estadísticamente iguales en tanto que los tratamientos T3 y T4 son estadísticamente distintos entre ellas y respecto a los tratamientos T1 y T2 y, presenta como el mejor tratamiento calificado por los jueces el tratamiento uno (T1) y dos (T2) mientras que el tratamiento con menor agrado de color es el tratamiento cuatro (T4).

b. Aceptabilidad de sabor

El análisis de varianza con un nivel de confianza de 95 % ($p < 0,05$) para la aceptabilidad de sabor muestra que existe una influencia estadística altamente significativa de los factores y su interacción, el coeficiente R^2 obtenida para esta respuesta es de 97,60%.

El análisis estadístico de Test de comparación múltiple de Duncan ($p < 0,05$) para la aceptabilidad de sabor reporta diferencia significativa entre los tratamientos, donde los tratamientos T2 y T3 son estadísticamente iguales en tanto que el tratamiento T1 y T4 son estadísticamente distintos entre ellas y respecto al tratamiento T2 y T3. Asimismo, el mejor tratamiento calificado por los jueces fue el tratamiento cuatro (T4) mientras que el tratamiento con menor agrado es el tratamiento uno (T1).

c. Aceptabilidad de olor

De acuerdo al análisis de varianza ($p < 0,05$) para la aceptabilidad de olor encontramos que existe una influencia estadística altamente significativa de los factores y una influencia estadística significativa de la interacción de los mismos, el coeficiente R^2 para esta respuesta fue de 97,50%. De igual forma, el análisis estadístico de Test de comparación múltiple de Duncan ($p < 0,05$) para la aceptabilidad de olor muestra diferencia estadística significativa entre los tratamientos, reporta que los tratamientos T2 y T3 son estadísticamente iguales en tanto que el tratamiento T1 y T4 son estadísticamente distintos entre ellas y respecto al tratamiento T2 y T3, e indica que el mejor tratamiento calificado por los jueces fue el tratamiento cuatro (T4) mientras que el tratamiento con menor agrado es el tratamiento uno (T1).

d. Aceptabilidad de flavor

El análisis de varianza ($p < 0,05$) para la aceptabilidad de sabor muestra que existe una influencia estadística altamente significativa de los factores y una influencia estadística significativa de la interacción de los mismos, el coeficiente R^2 para esta respuesta fue de 97,51%. El análisis estadístico de Test de comparación múltiple Duncan ($p < 0,05$) para la aceptabilidad de flavor reporta diferencia significativa entre los tratamientos, los tratamientos T1, T2, T3 y T4 son estadísticamente distintos entre ellas y, el mejor tratamiento calificado por los jueces fue el tratamiento cuatro (T4) mientras que el tratamiento con menor agrado es el tratamiento uno (T1).

4.4.2.2. Perfil sensorial del vinagre

En la tabla 09 se observa la media de los tratamientos para cada uno de los atributos, de las calificaciones que entregaron los 15 jueces semi-entrenados que componen el panel sensorial.

Tabla 09: Evaluación de los perfiles sensoriales del vinagre obtenido.

Tratamientos	Perfil sensorial del vinagre de frutas en descarte				
	Acético	Alcohólico	Agrio	Astringente	Frutal
T1	4,1767 ± 0,0153 ^a	1,5933 ± 0,0150 ^c	4,2267 ± 0,0252 ^a	2,9267 ± 0,0251 ^a	2,3643 ± 0,0214 ^d
T2	4,6300 ± 0,0252 ^c	1,2167 ± 0,0116 ^a	4,6300 ± 0,0200 ^c	3,3300 ± 0,0190 ^c	1,8800 ± 0,0265 ^b
T3	4,4733 ± 0,0265 ^b	2,0000 ± 0,1000 ^d	4,5267 ± 0,0305 ^b	3,2200 ± 0,0200 ^b	2,1533 ± 0,0153 ^c
T4	4,7067 ± 0,0153 ^d	1,4700 ± 0,0100 ^b	4,7400 ± 0,0300 ^d	3,5167 ± 0,0153 ^d	1,7500 ± 0,0115 ^a

*Promedio ± D.E. de las evaluaciones de los 15 jueces/ letras distintas en las filas indican diferencia significativa entre tratamientos.

Fuente: Elaboracion propia, 2010

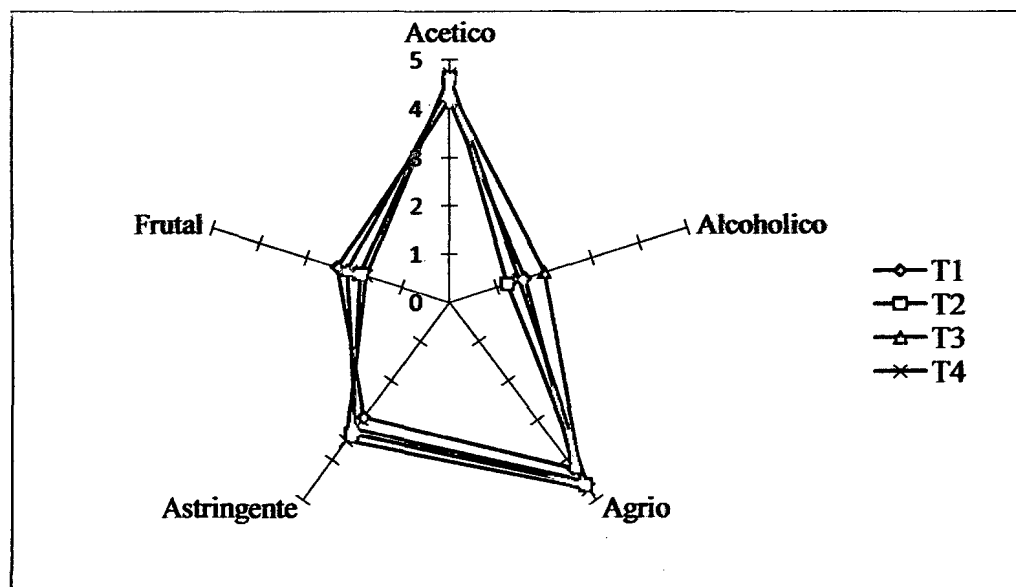


Figura 09: Expresión grafica de los perfiles sensoriales del vinagre.

El reporte de los atributos seleccionados se observa en la figura 21 representada en un gráfico de araña. El tratamiento mejor evaluado por los jueces fue el tratamiento cuatro (T4) el cual obtuvo las mejores calificaciones. El panel encontro diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) para todo los atributos, en los cuales los jueces detectan diferencias entre muestras, estableciendo un criterio de calidad para la elaboración de vinagre a partir de frutas en descarte.

a. Intensidad de sabor frutal

Según el análisis de varianza ($p < 0,05$) para la intensidad de sabor frutal existe una influencia altamente significativa de los factores y una influencia estadística significativa de la interacción de los mismos, el coeficiente R^2 para esta respuesta fue de 98,30%.

Por otra parte, el análisis estadístico de Test de comparación múltiple de Duncan para la intensidad de sabor frutal indica que el tratamiento T1, T2, T3 y T4 son estadísticamente distintos entre ellas y, reporta que el tratamiento calificado por los jueces con menor intensidad sabor frutal fue el tratamiento cuatro (T4) mientras que el tratamiento con mayor intensidad de sabor frutal es el tratamiento uno (T1).

b. Intensidad de sabor astringente

El análisis de varianza ($p < 0,05$) para la intensidad de sabor astringente presenta una influencia estadística altamente significativa de los factores y una influencia estadística

significativa de la interacción de los mismos, el coeficiente R^2 para esta respuesta es de 98,5%.

Por otro lado, el análisis estadístico de Test de comparación múltiple de Duncan ($p<0,05$) para la intensidad del sabor astringente indica que los tratamientos T1, T2, T3 y T4 son estadísticamente distintos. Asimismo, se puede observar que el tratamiento calificado por los jueces que presenta menor intensidad de sabor astringente fue el tratamiento uno (T1) mientras que el tratamiento con mayor intensidad de sabor astringente es el tratamiento cuatro (T4).

c. Intensidad de sabor agrio

El análisis de varianza ($p<0,05$) para la intensidad de sabor agrio muestra que existe una influencia estadística altamente significativa de los factores y su interacción, el coeficiente R^2 para esta respuesta es de 98,7%.

Asimismo, el análisis estadístico de Test de comparación múltiple de Duncan ($p<0,05$) para la intensidad de sabor agrio indica que los tratamientos T1, T2, T3 y T4 son estadísticamente distintos. Asimismo, el tratamiento calificado por los jueces que presenta menor intensidad de sabor agrio fue el tratamiento uno (T1) mientras que el tratamiento con mayor intensidad de sabor agrio es el tratamiento cuatro (T4).

d. Intensidad de sabor alcohólico

Según el análisis de varianza a un nivel de confianza de 95 % ($p < 0,05$) para la intensidad de sabor alcohólico muestra que existe una influencia estadística altamente significativa de los factores y una influencia estadística significativa de la interacción de los mismos, el coeficiente R^2 para esta respuesta fue de 98,00%. Por otra parte, el análisis estadístico de Test de comparación múltiple de Duncan ($p < 0,05$) para la intensidad de sabor alcohólico indica que los tratamientos T1, T2, T3 y T4 son estadísticamente distintos y, el tratamiento calificado por los jueces que presenta menor intensidad de sabor alcohólico fue el tratamiento dos (T2) mientras que el tratamiento con mayor intensidad de sabor alcohólico es el tratamiento tres (T3).

e. Intensidad de sabor acético

De acuerdo al análisis de varianza ($p < 0,05$) para la intensidad del sabor acético encontramos que existe una influencia estadística altamente significativa de los factores y su interacción, el coeficiente R^2 para esta respuesta fue de 98,20%.

Por otra parte, el análisis estadístico de Test de comparación múltiple de Duncan ($p < 0,05$) para la intensidad de sabor acético indica que los tratamientos T1, T2, T3 y T4 son estadísticamente distintos y, reporta que el tratamiento calificado por los jueces que presenta menor intensidad de sabor acético es el tratamiento uno (T1) mientras que el tratamiento con mayor intensidad de sabor acético es el tratamiento cuatro (T4).

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en las condiciones que se llevó a cabo este estudio, se puede concluir que:

Las frutas en descarte se pueden utilizar para la producción de vinagre con características fisicoquímicas y sensoriales aceptables. El vinagre obtenido consiguió alcanzar concentraciones por encima de 6% de ácido acético y concentraciones por debajo de 0,4% de alcohol residual, estas concentraciones son adecuadas según la norma técnica donde se indica que el vinagre de frutas debe contener concentraciones de ácido acético por encima del 5% y como máximo 0,5% de alcohol residual. Con respecto a las características organolépticas, en forma global el vinagre obtenido de frutas de descarte presenta aceptabilidad según las calificaciones otorgadas por los jueces.

Se encontró diferencia significativa del factor suministro de aire sobre las medias de los atributos evaluados del vinagre obtenido ($p < 0,05$); en los atributos evaluados en la presente investigación, con el nivel alto de la variable suministro de aire se consiguió mejores las características de los atributos: acidez volátil, concentración de acidez fija, aceptabilidad de sabor, aceptabilidad de olor, aceptabilidad de flavor, disminuir la intensidad de sabor frutal, intensidad de sabor astringente, intensidad de sabor agrio y la intensidad de sabor acético. En tanto, con el nivel bajo de esta variable se consigue mejorar la aceptabilidad de color y disminuir la intensidad de sabor alcohólico. En función a lo

indicado se plantea trabajar con el nivel más alto de este factor para la producción de vinagre de frutas en descarte.

Se encontró diferencia estadística significativa del factor temperatura sobre las medias de los atributos evaluados en el vinagre obtenido excepto en la concentración de acidez fija ($p < 0,05$). A temperatura de 30°C se mejoró la intensidad y aceptabilidad de los atributos: concentración de acidez volátil, aceptabilidad de sabor, aceptabilidad de olor, aceptabilidad de flavor, disminuir la intensidad de sabor frutal, intensidad de sabor astringente, intensidad de sabor agrio, disminuir la intensidad de sabor alcohólico y mejorar la intensidad de sabor acético. Sin embargo, a temperatura de 20°C se consiguió mejorar aceptabilidad de color. Proponiendo de esta forma que se debería de trabajar con el nivel más altos de este factor. Según lo observado se plantea que se debería trabajar con el nivel más alto de este factor para la producción de vinagre de frutas en descarte.

5.2. RECOMENDACIONES

Se sugiere realizar la identificación de la especie a la cual pertenece la cepa Sc BA-IA-2009-II y las bacterias mixtas, utilizadas durante la fermentación alcohólica y acética respectivamente. Asimismo, se recomienda realizar estudios de cuantificación de los componentes aromáticos presentes en el vinagre obtenido a partir de frutas en descarte.

Por otra parte, se sugiere realizar pruebas con distintos niveles de estos factores con fines de optimizar el proceso. Asimismo, evaluar el efecto de la temperatura y la concentración de inóculo durante la fermentación alcohólica.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abad, E. 2006. Selección de levaduras autóctonas para la elaboración de vinos tintos en bodegas y viñedos de Trujillo S.L. Departamento de Tecnología de los Alimentos. Universidad Politécnica De Madrid. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, 115p.
- Abeles, F (1972). Biosynthesis and mechanism of action of ethylene. En: Ann. Rew. Plant. Physiol. Vol. 23; 259-284p.
- Acevedo, A; Godoy, R. y Bolaños, G. 2003. Incremento de la producción de alcohol, en fermentación de melazas mediante la utilización del complejo enzimático Rhyzozyme. 13-15p.
- Aguilar, B y FranYios, J. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. 268 – 274p.
- Aguilera López, Andrés (1983). Genética y fisiología de la tolerancia al etanol en *Saccharomynces cerevisiae*. Sevilla, Tesis Dr. Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, 159p.
- Aguirre, M. (1994). Efectos del anhídrido carbónico y atmósfera controlada en la calidad de postcosecha de frutos de (*Persea americana* Mill.) cv. Fuerte. Tesis Ms.Sc. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 103p.
- Amerine, M.A. (1965). Priciples of Sensory Evaluation of Foot. Academic Press. New York. U.S.A.
- Anzaldúa-Morales, A. (1994). La evaluación Sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. España.



- Asai, T. (1968). *Acetic Acid Bacteria Classification and Biochemical Activities*. University of Tokyo Press. Tokyo.
- ASTM. (1968). *Manual of sensory testing methods*. American Society for Testing and Materials. Philadelphia. Pa. ASTM 434.
- Azcón, B. y Talón, M (2003). *Fundamentos de fisiología vegetal*. España: McGraw Hill, 522 p.
- Baleiras Couto, M.M. y Huis in't Veld, J.H.J. (1995) Influence of ethanol and temperature on the cellular fatty acid composition of *Zygosaccharomyces bailii* spoilage yeasts. *J. Appl. Bacteriol*, 327-334p.
- Barnett, J. A.; Payne, R. W.; Yarrow, D. (1990). *Yeasts: characteristics and identification*. (2nd ed.). Cambridge University Press, Cambridge.
- Bellissimi, E y Ingledew, W. 2004. Metabolic acclimatization: preparing active dry yeast for fuel ethanol production. *Process Biochemistry*. Vol 40. 2205-2213p.
- Berger, H. y Galleti, L. (1996). Nuevas opciones en el manejo de fruta después de cosecha. In: *Cultivo del palto y perspectivas de mercado*. Santiago. Universidad de Chile, Facultad de Agronomía, 93-98p.
- Bisson, L.F. (1999). Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 107-119p.
- Bortolini, F; Sant, Anna E.S. y Torres, R.C. (2001). Comportamiento de la fermentación alcohólica y acética de zumos de kiwi (*Actinidia deliciosa*); composición de mostos y métodos de fermentación acética. *Cienc.Tecnol.Aliment.*, 236-243p.



- Bottalico, A. y A. Logrieco (1992), *Alternaria Plant diseases in Mediterranean Countries and Associated Mycotoxins*, volumen 3, 209-232p.
- Bourne, M. (1977). *The neglected dimension in increasing de world food supply*. Univ., Ithaca, NY.
- Bradford, K.J. and Yang, S.F. (2008). *Pioneer in plant ethylene biochemistry*. En: *Plant Sci.* Vol. 175, No. 1-2, 2-7p.
- Bringer, S. y Sahn, H. *Jetzi industriereif (1995): Ethanol production durch Bakterien*. *BioEngineering* 1/85, 30 – 36p.
- Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, ed (2002). *Molecular Biology of the Cell*, Chapter 4, pages 191-234p.
- Bu'lock, John y Kristiansen, Bjorn (1991). *Biotechnología básica: Alcohol industrial* 1a. ed. Zaragoza, Ed. Acribia S.A., 557p.
- Calderón, N. M. 2007. *Evaluación del uso de antibióticos como mecanismo para el control de contaminantes bacterianos en la fermentación para la producción de alcohol etílico*. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial. Bogotá.
- Carballo, F. (2000). *Microbiología industrial: microorganismos de interés industrial*. Editorial Acribia. España. 20-31p.
- Carril Fernández, Víctor B. y Cruz Martínez, José (1996). *Alcohol obtenido de diferentes variedades de plátano*, 1 (2): 10p.
- Casey, G.P. y Ingledew, W.M. (1986). *Ethanol tolerance in yeasts*. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 13, 219-280p.



- Castro M., Natera Marín R., García M^a. y García F. (2002). Optimisation of headspace solid-phase microextraction analysis of aroma compounds in vinegar. *J. of Chromatography*; 7-15p.
- Cervantes, E. (2002). Ethylene: new interactions, still ripening. En: *Plant Science*. Vol. 7, No. 8; 334-335p.
- Cheftel, Jean – Claude (1987). *Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos*. 2a. ed. España, Ed. Acribia, 333p.
- Coursey D.G. and Proctor F. (1975). Toward the quantification of postharvest Losses in horticultural production. *Acta Horticulturae*, Vol. 49.
- D'Amore, T. y Stewart, G.G. (1987). Ethanol tolerance of yeast. *Enz. Microb. Technol.* 9, 322-330p.
- De ley, J.; Gillis, M.; Swings, J. (1984). Family VI. *Acetobacteraceae*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1 ed. Krig N.R and Holt J.G. 267-278p.
- De Ory I; Romero L. y Cantero D. (2004). Optimum starting- up protocol of a pilot scale acetifier for vinegar production. *J. of Food Engineering*, 31-37p.
- De Rosa, T. (1997). *Tecnología de los vinos blancos*. 1a. ed. Madrid, Ed. Mundi – Prensa, 527p.
- Downes FP, Ito K, eds. (2001). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. APHA, Washington, 515, 533 y 561p.



- Eaton, L.C., Tedder, T.F. y Ingram, L.O. (1982). Effects of fatty acid composition on the sensitivity of membrane functions to ethanol in *Escherichia coli*. *Substance and Alcohol Actions/Misuse* 3, 77-87p.
- Ebner H., Sellmer S. y Follmann H. (1993). Acetic Acid. Capítulo 12. En: *Biotechnology. A multi-Volume Comprehensive Treatise. Volumen 6. 2 Ed.* Editado por Rehm H., Alemania, 739 p.
- Ebner H.; Sellmer S. y Follmann H. *Vinegar* (1999). En: *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation.* Editado por Flickinger M. Vol. 1 – 5, 2720 p.
- Espinosa Manfugas, Julia (2007). *Evaluación Sensorial de los Alimentos.* 1a. ed. Cuba, Ed. Universitaria, 129p.
- Estela E. W. (2004). *Study and analysis of metabolites of sensorial importance produced by Saccharomyces and non-Saccharomyces yeasts.* Tesis de Doctorado Capítulo I. Universidad de Tecnología Química. Praga – República Checa.
- Eunice Ríos V.; Germán A Giraldo G.; Alba Lucia Duque C. (2007). *Predicción de la actividad de agua en frutas tropicales.* Universidad de Quindío, Armenia, p 27-32.
- Ferreira, María (2006). *Estudio del proceso biotecnológico para la elaboración de una bebida alcohólica a partir de jugo de naranjas.* Valencia, Tesis Dr. Departamento de Tecnología de Alimentos, Facultad de ciencias de la alimentación, Universidad Politécnica, 268p.
- Fleet, G.H. y Heard, G.M. (1993) *Yeast growth during fermentation.* In: *Wine Microbiology and Biotechnology.* Ed. G.H. Fleet, 27-54p.



- Flores, G. (1994). Manejo postcosecha de frutas y hortalizas en Venezuela. San Carlos: Cojedes, 317 p.
- Fregapane G., Rubio-Fernández H., Nieto J. y Salvador M. (1999). Wine vinegar using a noncommercial 100- litre column reactor equipped with a novel type of dynamic sparger. *Biotechnology and Bioengineering*; 141-146p.
- Gallo, F. (1993). Índice de madurez para piña cayena lisa, guanábana, pitaya amarilla y maracuyá. *Agro-Desarrollo* 4(1-2):194- 200.
- García López, Emilio (1983). Conservación de la producción agrícola. 1a. ed. Barcelona, Ed. Aedos, 182p.
- Geneix, C., Lafon-Lafourcade, S. y Ribéreau-Gayon, P. (1984). Relation entre les difficultés de fermentations et certaines activités enzymatiques de la levure. 205-217p.
- Godina, G.G. (2004). Fermentación alcohólica de maracuyá (*Pasiflora edulis Sims*. F. *flavicarpa* Degener). Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Tepic.
- Gómez Avelar, Francisco; Calderón Santoyo, Montserrat y Ragazzo Sánchez, Juan Arturo (2006). Propuesta tecnológica para la elaboración de vinagre de maracuyá (*pasiflora edulis f. flavicarpa*). Laboratorio integral de investigación en alimentos, Instituto Tecnológico de Tepic, Tepic, Vol. I, 5p.
- Guerrero, L. (1995). Métodos descriptivos de análisis sensorial. Alimentación, Equipos y Tecnología.
- Henschke, P.A. and Jiranek, V. (1991). Hydrogen sulfide formation during fermentation: Effect of nitrogen composition in model grape must. In: Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wines. Ed. J.M. Rantz; 172-184p.



- Horiuchi J., Tada K., Kobayashi M., Kanno T. y Ebie K. (2004). Biological approach for effective utilization of worthless onions- vinegar production and composting. *Resources, Conservation and Recycling*. 97-109p.
- Hough, J.S. (1982). *Biología de la cerveza y de la malta*. 1a. ed. España, Ed. Acribia, 187p.
- Kader, A. (2002). *Postharvest technology of horticultural crops*. Agriculture and Natural Resources. California : University of California, 535 p.
- Karini, K., Emtiazi, G y Taherzadeh, M. (2006). Production of etanol and mycelial biomasa from rice straw hemicelluloses hydrolyzate by *Mucor Indicus*. *Process Biochemistry*. 653-658p.
- Karp, (2005). Gerald. *Biología celular y molecular*. 4a. ed. México, 865p.
- King, A.D. Jr. y J.E. Schade (1984), *Alternaria toxins and their importance in food*. 886-901p.
- Kreger-Van Rij, N.J.W. (1984). *The yeast, a taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam.
- Lafon-Lafourcade, S., Larue, F. y Ribéreau-Gayon, P. (1979). Evidence for the existence of "survival factors" as an explanation for some peculiarities of yeast growth, especially in grape must of high sugar concentration. 1069-1073p.
- Lagos E.M., (1999). *Levaduras autóctona aisladas en vinos de la comarca del la de Laujar de Andarax (Almería)*. Tesis doctoral. Universidad de Granada. Departamento de la nutrición el bromatología de y. Facultad de la farmacia. Granada. 265 p.
- Larmond, E. (1977). *Laboratory methods for sensory evaluation of foods*. Cam. Dept. Agr. Publ. 1637.



- Leao C; Van Uden N. (1984). Effect of etanol and other alkanols on the general amino acid pernmease of *Saccharomyces cerevisiae*; 403-405p.
- Llaguno Marchena, C y Polo, M.C. (1991). El vinagre de vino. Consejo Superior de Investigación Científica. Madrid. España,238p.
- Leopold, A.C; Kriedemann P.E. (1975). Plant Growth and developement. Ed. McGraw Hill, N. Y.,16-34p.
- Levonen E. y Llaguno C. (2003). Tecnología de la fabricación del vinagre. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment. 289-296p.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. y Komagata, K. (2002). Acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. 813-818p.
- Lisdiyanti, P., Katsura, K., Potacharoen, W., Navarrol, R., Yamada, Y. Uchimura, T. y Komagata, K. (2003). Diversity of Acetic Acid Bacteria isolated from South-east Asian Sources. snt.
- Lodish, H; Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J. (2004). Molecular Cell Biology. 5a. ed. New York.
- López, F. (2004). Unitat d'Enologia del centre de referencia de tecnologia d'aliments. Dept. Enginyeria Química. Facultat d'Enologia de Tarragona. Universidad Rovira y Virgilia. España.
- Lu S., Lee F. y Chen H. (1999). A thermotolerant and high acetic acid producing bacterium *Acetobacter*; 55-62p.



- Lucangeli, C. y Murray, R. (1998). Tecnología de postcosecha. El etileno, un gas para tener en cuenta. San Pedro-Buenos Aires-Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 4p.
- Madigan, Michael T.; Martinko, Jhon M. y Parker, Jack (2004). Biología de los microorganismos. 10a. ed. Madrid, Ed. Capella, 963p.
- Martínez N. (2000). Termodinámica y Cinética de Sistemas Alimento Entorno, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia España.
- Mejía Giraldo, L.F.; Martínez Correa, H.A.; Betancourt Gutiérrez, J.E. y Castrillón Castaño, C.E. (2002). Aprovechamiento del residuo agroindustrial del mango común (*Mangifera indica* L.) en la obtención de azúcares fermentables. Ingeniería y Ciencia (Universidad EAFIT), Vol. 3 (6): 41-62.
- Mitchel, G. y Dinamarca, A. (1988). Almacenamiento de productos hortofrutícolas frescos, In: Curso de tecnología de la postcosecha de frutas y hortalizas. Santiago, Fundación Chile, p 1.9-1.1.
- Morales, A. (1991). Aspectos Técnicos sobre cuarenta y cinco cultivos agrícolas de Costa Rica. San José: Dirección General de Investigación y Extensión Agrícola. Ministerio de Agricultura y Ganadería, 560 p.
- Morales M., Tesfaye W., García-Parrilla M., Casas J. y Troncoso A. (2001). Sherry wine vinegar: physicochemical changes during the acetification process. 611-619p.
- Morales, M; Berger, H. y Luza, J. (1979). Identificación de hongos causantes de pudriciones en almacenaje refrigerado de paltas (*Persea americana* Mill.) cv. Fuerte y Negra de la Cruz. *Inv. Agr.* 5(1): 1-4p.



- Murtagh, J.E. (1986). Fuel ethanol production – the US experience. *Proc. Biochem*, 61–65p.
- Navarre, C. (1994). *L'oenologie*. 4ª ed. Ed. Lavoisier Tec. & Doc., París.
- O'Connor-Cox, E.S.C. y Ingledew, W.M. (1990) Effect of timing of oxygenation on very high gravity brewing fermentations; 26-32p.
- Pantastico, E. (1981). *Postharvest physiology handling and utilizations of tropical and subtropicals fruits and vegetables*. 663 p.
- Pesarakli, M. (2002). *Handbook of plant and crop physiology*. New York; 973 p.
- Peynaud, E. (1989). *Enología práctica. Conocimiento y elaboración del vino*. 3a. ed. Ed. Mundi Prensa, Madrid.
- Pizarro Cáncer, Olivia Andrea (2005). *Obtención de Condiciones de Elaboración de Vinagre de Arándanos (*Vaccinium corymbosum*) Utilizando Torta de Prensa*. Valdivia – Chile, Tesis Br., Escuela de Ingeniería en Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, 92p.
- Querol, A., Barrio, E. y Ramón, D. (1992). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. 439-446p.
- Quesada, M.P. y Cenis, J.L. (1995). Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) in the characterization of wine yeasts. 204-208p.
- Quillama Polo, Elena (2007). *Manual de Practicas de Microbiología Industrial*. 1a. ed. Lima-Peru, 114p.



- Ravaglia, S. y Delfini, C. (1993). Production of MCFA and their ethyl esters by yeast strains isolated from musts and wines. 21-36p.
- Ramírez Niño, Miguel Ángel (2006). Caracterización de vinos de piña (Variedad española roja) pasteurizados y sin pasteurizar elaboradas con diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Ms. Programa de Ciencia y Tecnología, Recinto Universitario de Mayaguez, Universidad de Puerto Rico, 71p.
- Reid, S.M. and Pratt, H.K. (1970). Ethylene and the respiration climacteric. En: Nature. Vol. 226; 976-977p.
- Romero, Félix; Riquelme, Fernando; Pretel, Teresa; Martínez, Gracia; Serrano, María; Lozano, Pedro (2006). Nuevas tecnologías de conservación de frutas y hortalizas. México, Ed. Mundi – Prensa, 220p.
- Reybert, G. y Furlani, M. (1995). Daños en postcosecha y su efecto sobre la madurez y la calidad. Frutícola. 85-88p.
- Ribereau-Gayon, Pascal; Dubourdieu, Denis; Doneche, Bernard y Lonvaud, Aline (2003). Tratado de enología. Argentina, Ed. Hemisferio sur, 569p.
- Richardson K. (1967). Submerged acetification of a vinegar base produced from waste pineapple juice. 171-186p.
- Roger, P.L.; Lee, K.J.; Skotnicki, M.L. y Tribe, D.E. (1982). Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. 37-48p.
- Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A. and Guillamon, J.M. (2000). Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR- amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. 1981-1987p.



- Salisbury, F. y Ross, C. (1992). Fisiología vegetal. México: Iberoamérica, 759 p.
- Silva, M.E.; Torres Neto, A.B.; Silva, W.B.; Silva, F.L.H. y Swarnakar, R. (2007). La producción de vinagre de anacardo: La fermentación alcohólica y acética. Campina Grande (Brasil), 1 (2): 7p.
- Sokollek S., Hertel C. y Hammes W. (1998). Cultivation and preservation of vinegar bacteria. 195-206p.
- Soo Y., Othake H. y Toda K. (1989). Acetic acid using a fermentor equipped with a hollow fiber filter module. 918-923p.
- Spivey, M.J. (1978). The acetone/ butanol/ ethanol/ fermentation. *Process Biochem*, 13, 4,25p.
- Steinkraus K. 1997. Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. 311-317p.
- Stryer, Lubert; Berg, Jeremy M.; Tymoczko (2002). *Bioquímico*. 5a. ed. Barcelona, Ed. Reverte, 954p.
- Suárez, JA. 1997. *Levaduras vínicas. Funcionalidad y uso en bodega*. Ed. Mundi-prensa.
- Suárez, J. A. (1997). *Levaduras vínicas. Funcionalidad y uso en bodega*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Suutari, M., Liukkonen, K. y Laakso, S. (1990). Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids, 1469-1474p.
- Tesfaye W., Morales M., Benítez B., García-Parrilla M. y Troncoso A. (2004). Evolution of wine vinegar composition during accelerated aging with oak chips. *Analitica Chimica*.



- Tomasso, Mauricio (2009). Tolerancia de las levaduras al etanol. Uruguay, Monografía de Biotecnología. Facultad de química, Universidad de la República de Uruguay, 15p.
- Torija Martínez, Jesús (2002). Ecología de las levaduras: selección y adaptación a fermentaciones vínicas. Tarragona, Tesis Dr. Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Facultad de Enología, Universidad Rovira y Virgili, 260p.
- Toricella Morales, Raúl y Huerta Espinoza Victor (2008). Análisis sensorial aplicado a la restauración. Cuba, Ed. El Vedado, 66p.
- Tucker, Gary S. (2008). Food Biodeterioration and Preservation. 1a. ed. Australia, Ed. Blackwell, 280p.
- Tudor, E.A.; Board, R.G. (1993). Food-spoilage yeasts. En Rose, A.H., Harrison, J.S. (eds.), *The Yeasts*, vol.5, *Yeast Technology*, 2nd ed., Academic Press, Londres, pp. 435-516.
- Ureña Peralta, Milder O. y Arrigo Huapaya Matilde D. (1999). Evaluación Sensorial de los Alimentos. 1a. ed. Lima, Ed. Agraria, 199p.
- Van der Rest, M.E., Kamminga, A.H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B. y Konings, W.N. (1995). The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and biogenesis. 304-322p.
- Valdés Duque, Beatriz Elena., Castaño Castrillón, José Jaime y Arias Zabala, Mario (2002). Obtención de etanol y una bebida alcohólica tipo aperitivo por fermentación de plátano maduro. *Cenicafé (Colombia)*, Vol. 53 (3): 239-251p.



- Versavaud, A., Dulau, L. y Hallet, J.N. (1993). Étude écologique de la microflore levurienne spontanée de vignoble des Charentes et approche moléculaire de la diversité intraspécifique chez *Saccharomyces cerevisiae*. 20-28p.
- Visser't Hooft F. Biochemical investigations on Acetobacter. Thesis Techn. Univ. Delft, 1925p.
- Wallace, D.H. (1969). Genetics environment and plant resources. Univ. Philippines, Col. Agric. Coll Laguna 80p.
- Watson, K. (1987). Temperature relations. In: The Yeast, vol. 2: Yeast and Environment. Eds. A.H. Rose y J.S. Harrison. 41-71p.
- Ward Owen, P. (1991). Biotecnología de la fermentación: fermentación de los alimentos. 1a. ed, Zaragoza, Acribia S.A., 265p.
- Weiser H. (1962). Practical Food Microbiology. The Avi Publishing Company, Inc. USA, 345 p.
- Wills, R. (1984). Fisiología y manipulación de frutas y hortalizas post-recolección. Zaragoza : Acribia, 262 p.
- Wills, Ron; McGlasson, Barry; Graham, Doug y Joyde, Daryl (1999). Introducción a la fisiología y manipulación poscosecha de frutas hortalizas y plantas ornamentales. 2a. ed. España, Ed. Acribia, S.A., 238P.
- White, J. (1995). Yeast Tecnology. Wiley y Sons. USA. 431 p.
- Wood B. (1985). Microbiology of fermented food. Vol 1. Elsevier Applied Science publisher LTD. New York. USA, 371 p.



- Yahia, Elhadi M. y Higuera C. Inocencio (1992). Fisiología y tecnología postcosecha de productos hortícolas. Colombia, Ed. Limusa, 302p.
- Yamamoto, N., Yamamoto, N., Amemiya, H., Yokomori, Y., Shimizu, K. y Totsuka, A. (1991). Electrophoretic karyotypes of wine yeasts. 358-363p.
- Yamada, Y., Hoshino, K. I. & Ishikawa, T. (1997). The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. 1244-1251p.
- Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T. Uchimura, T. y Komagata, K. (2000). *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. 823-829p.
- Yamada, Y. (2003). Taxonomy of Acetic Acid Bacteria utilized for vinegar fermentation. Comunicación personal en: The First International Symposium on Insight into the World of Indigenous Fermented Foods for Technology Development and Food safety.
- Youings, A. y Rose, A.H. (1989). Sterol uptake by anaerobically grown *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 459-463p.
- Zarate, M. (1993). Manejo postcosecha de frutas y verduras. En: Agricultura Tropical. Vol. 28, No. 2; 22-27p.
- Zambonelli, C. (1988). Microbiología y biotecnología del vino. Ed. Edagricole, Bolonia.



ANEXOS



ANEXO 01

Tabla 10: Cinética de la producción de etanol por la cepa Sc BA-IA-2009-I.

Tiempo (h)	Sc BA-IA-2009-I		
	pH	CO ₂ (g/L)	Etanol (g/L)
0	4,5	0	0
12	4,2	8	10
24	4,1	50	29
36	4,0	71	51
48	3,9	75	63
60	3,9	79	69
72	3,9	79	69

ANEXO 02

Tabla 11: Cinética de la fermentación alcohólica.

Cinética de fermentación alcohólica								
Tiempo (h)	suministro de aire de 0 L/h/L.				suministro de aire de 0.032 L/h/L.			
	°Brix	% Etanol	% Acidez	pH	°Brix	% Etanol	% Acidez	pH
0	11	0,175	0,276	4,5	11	0,175	0,276	4,5
12	10	0,325	0,318	4,4	10	0,825	0,354	4,4
24	9,5	1,000	0,390	4,4	9	2,325	0,414	4,3
36	8	2,175	0,408	4,2	7	3,525	0,426	4,1
48	7	3,175	0,420	4,1	6	4,200	0,444	4,1
60	6	4,025	0,432	4,1	5	4,725	0,468	4,1
72	6	4,700	0,444	4,1	5	4,975	0,475	4,0
84	6	5,050	0,449	4,1	5	5,225	0,491	4,0

ANEXO 03

Tabla 12: Cinética de la fermentación acética.

Cinética de fermentación acética						
Tiempo (h)	A 20°C			A 30°C		
	pH	% de etanol	% acidez	pH	% de etanol	% acidez
0	4,0	5,140	1,000	4,0	5,140	1,000
12	3,9	5,050	1,270	3,9	4,875	1,355
24	3,8	4,650	1,620	3,7	4,025	2,305
36	3,6	3,540	2,710	3,4	2,325	4,000
48	3,4	1,850	4,430	3,3	0,650	5,580
60	3,3	0,640	5,690	3,2	0,325	5,953
72	3,2	0,325	6,010	3,2	0,175	6,110

ANEXO 04

Puntuación y cartillas de evaluación sensorial del vinagre

Puntuación de los niveles de los atributos:

Las muestras de cinco puntos se evaluarán en función a la siguiente escala:

1 = Imperceptible

2 = Ligero

3 = Moderado

4 = Fuerte

5 = Muy fuerte

En tanto que las muestras de siete puntos se evaluarán en función a la siguiente escala:

1 = Me desagrada muchísimo

2 = Me desagrada mucho

3 = Me desagrada poco

4 = Me agrada más o menos

5 = Me agrada poco

6 = Me agrada mucho

7 = Me agrada muchísimo

Ficha 01: pruebas afectivas del vinagre

Nombre del juez: _____ Fecha: _____

Usted está recibiendo 12 muestras codificadas de vinagre. Sírvase a evaluar la intensidad de olor a vinagre de las muestras haciendo girar la copa en forma circular y luego inclinarla en un ángulo de 45° respecto a la nariz para capturar el olor, luego marque con círculo sobre el número con el índice de percepción que mejor describa su opinión sobre el producto que acaba de probar. Recuerde que la evaluación debe ser realizada en intervalo de un minuto entre cada muestra.

ESCALA DE ACEPTABILIDAD DE OLOR						
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7



Ficha 02: pruebas de perfil de sabor del vinagre

Nombre del juez: _____ Fecha: _____

Usted está recibiendo 12 muestras codificadas de vinagre. Sirvase a evaluar la intensidad de sabor a frutal de las muestras haciendo girar la copa en forma circular y luego inclinarla en un ángulo de 45° respecto a la nariz para capturar el olor, luego marque con círculo sobre el número con el índice de percepción que mejor describa su opinión sobre el producto que acaba de probar. Recuerde que la evaluación debe ser realizada en intervalo de un minuto entre cada muestra.

ESCALA DE INTENSIDAD DE SABOR FRUTAL						
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7
1	2	3	4	5	6	7



ANEXO 05

Fotografías del biorreactor y agitador

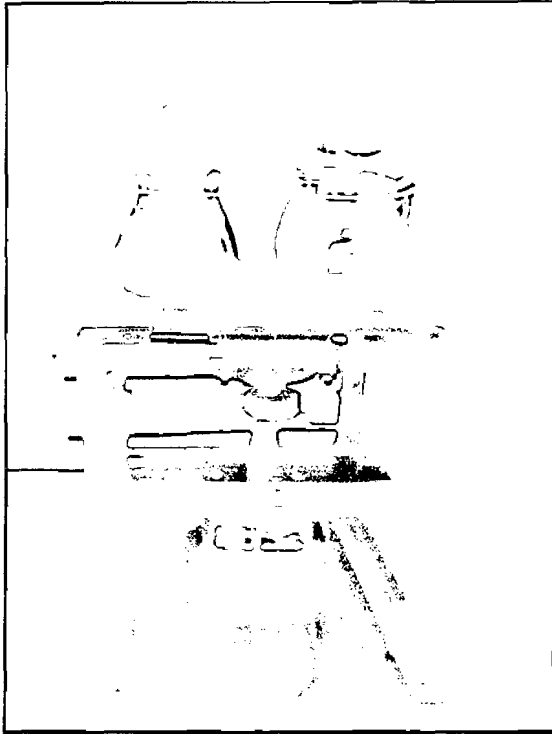


Figura 10: Fotografías del agitador

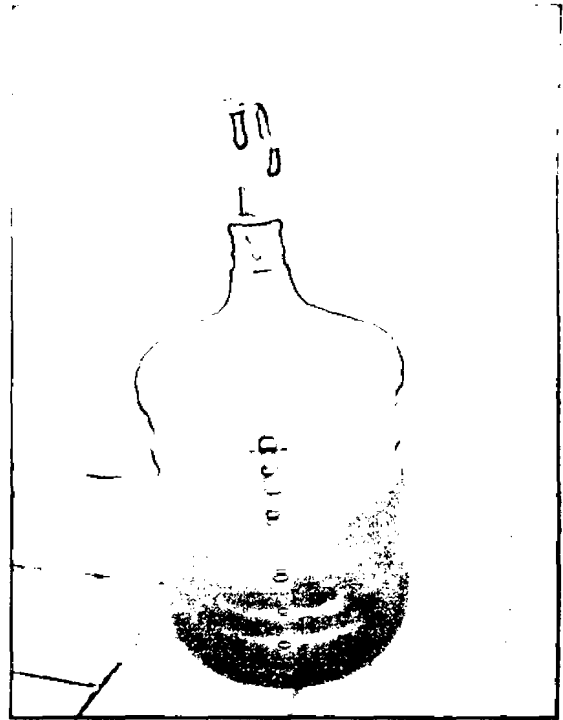


Figura 11: Fotografías de la cuba para la fermentación alcohólica

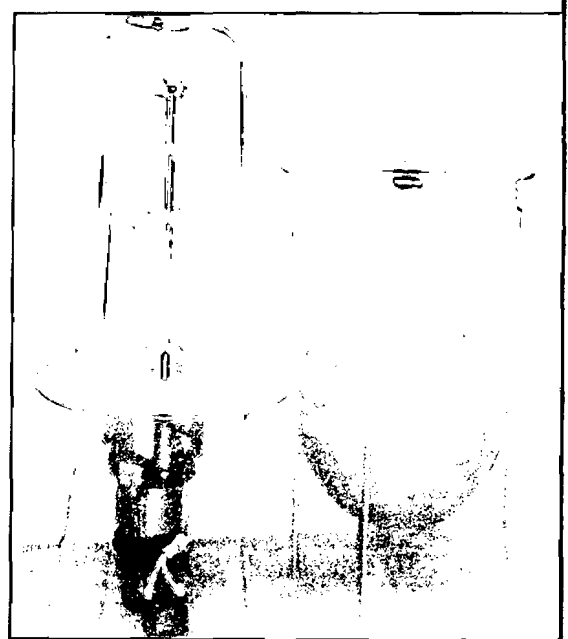
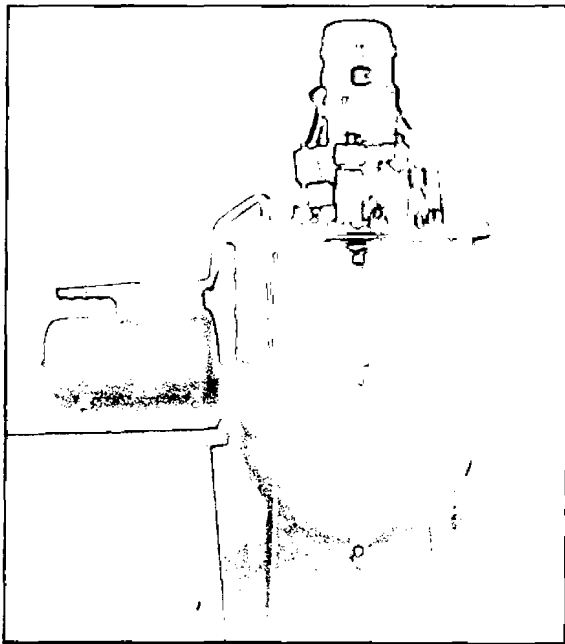


Figura 12: Fotografías de birreactor