



Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

TESIS PROFESIONAL

“Optimización de un proceso de fermentación artesanal para elaboración de vinagre y estudio del inóculo empleado (Madre del vinagre)”

Que para obtener el grado de:

Licenciatura en Ingeniería en Alimentos

Presenta:

Santiago Lemus Martínez

Directores de Tesis:

Dra. María del Carmen Gpe. Avelino Flores

Dr. Irving Israel Ruiz López

Puebla, Pue. Noviembre 2020

QUÍMICA

Índice

Introducción.....	9
<i>Objetivo general</i>	10
<i>Objetivos específicos</i>	10
1. ANTECEDENTES	11
1.1 Vinagre	11
1.1.1 Tipos de vinagre	14
1.2 Evolución de los métodos de producción de vinagre	16
Procesos artesanales.....	16
Procesos industrializados.....	18
1.3 Producción y consumo	20
1.3.1 Mundial	20
1.3.2 Nacional.....	22
1.4 Normatividad y legislación	22
1.4 Microorganismos usados en la producción de vinagre y su metabolismo ...	26
1.4.1 Levaduras	26
1.4.2 Bacterias del ácido acético.....	29
1.4.2.1 Metabolismo de carbohidratos.....	31
1.4.2.2 Metabolismo de etanol.....	33
1.5 Madre del vinagre	35
1.5.1 Morfología y microbiota de la madre del vinagre.....	36
1.5.2 Composición, estructura y funcionalidad de la matriz de la madre del vinagre	37
1.5.2.1 Producción de celulosa.....	39
1.5.3 Generalidades del secado.....	40
1.5.3.1 Difusividad	42
2. METODOLOGÍA	45
2.1 Recopilación bibliográfica	46
2.2 Obtención del inóculo	46
2.2.1 Cultivo de mantenimiento.....	46
2.3 Determinación de las condiciones óptimas de fermentación	46
2.4 Fermentación en condiciones óptimas.....	49
2.4.1 Determinación de parámetros fermentativos.....	49
2.4.2 Evaluación de rendimiento	52

2.4.3 Evaluación de productividad	53
2.5 Aislamiento de microorganismos	53
2.5.1 Toma de muestra	53
2.5.2 Aislamiento de bacterias	54
2.5.3 Aislamiento de levaduras	54
2.6 Caracterización óptica y espectroscópica del inóculo.....	55
2.6.1 Obtención y preparación de las muestras	55
2.6.2 Microscopía óptica simple	56
2.6.3 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	56
2.6.4 Difracción de rayos X	56
2.6.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	57
2.6.6 Microscopía de fuerza atómica (AFM).....	57
2.7 Evaluación de difusividad másica del agua en la estructura polimérica	58
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
3.1 Determinación de condiciones óptimas de fermentación.....	60
3.1.1 Fermentación de referencia	60
3.1.2 Prueba de fermentación: modificación de °Brix.....	61
3.1.3 Prueba de fermentación: modificación de Temperatura.....	62
3.1.4 Prueba de fermentación: modificación de °Brix y Temperatura	64
3.2 Fermentación en condiciones óptimas.....	68
3.2.1 Comportamiento de las fermentaciones en condiciones optimizadas ...	68
3.2.2 Cálculo de rendimiento y productividad.....	74
3.3 Aislamiento de microorganismos	77
3.3.1 Bacterias del ácido acético.....	77
3.3.2 Levaduras	82
3.4 Caracterización del inóculo.....	87
3.4.1 Pruebas espectroscópicas	87
3.4.1.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	87
3.4.1.2 Difracción de rayos X.....	89
3.4.2 Pruebas ópticas.....	91
3.4.2.1 Microscopía óptica simple	91
3.4.2.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	93
3.4.2.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM)	97
3.4.3 Evaluación de difusividad del agua en la matriz polimérica	99

Conclusiones	102
Perspectivas del proyecto	103
Referencias	104
Anexos	111

Índice de tablas

Tabla 1: Principales países exportadores de vinagre en el mundo (2012).....	21
Tabla 2: Límite en propiedades fisicoquímicas del vinagre según la NMX-F-122-1968 Calidad de vinagres.....	26
Tabla 3: Resultados de las mediciones de los parámetros para la fermentación de referencia.	60
Tabla 4: Resultados de las de los parámetros de acidez en la prueba con modificación de °Brix.....	61
Tabla 5: Resultados de las mediciones de los parámetros de acidez en la prueba con modificación de Temperatura	62
Tabla 6: Resultados de las mediciones de los parámetros de acidez en la prueba con modificación de °Brix y Temperatura.....	64
Tabla 7: Comparación NMX-F-122-1998 contra valores de fermentación optimizada.	66
Tabla 8: Valores de seguimiento, fermentación en condiciones optimizadas 1	69
Tabla 9: Valores de seguimiento, fermentación en condiciones optimizadas 2. ...	70
Tabla 10: Porcentajes residuales en pruebas de fermentación a condiciones óptimas.....	75
Tabla 11: Asignación de las vibraciones de los enlaces moleculares a los números de onda que se observan en los espectros IR de la ilustración 27.....	87
Tabla 12: Seguimiento. Primera prueba de fermentación en condiciones óptimas.	111
Tabla 13: Seguimiento. Segunda prueba de fermentación en condiciones óptimas.	112

Índice de figuras

Ilustración 1. Pintura de ejemplificación de producción de vinagre en Milán, Italia, al rededor del año 1550 (Solieri & Giudici, 2009).....	12
Ilustración 2. Ejemplo de un proceso de fermentación por retroceso (Solieri & Giudici, 2009).	17
Ilustración 3: Microscopía electrónica de barrido de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Solieri & Giudici, 2009).....	28
Ilustración 4: Vía de producción de etanol por levaduras. Tomado y traducido de (Querol & Fleet, 2006).....	28
Ilustración 5: Microscopía electrónica de barrido de distintas bacterias del ácido acético (Solieri & Giudici, 2009).	30
Ilustración 6: Representación sistemática de la cadena respiratoria de las bacterias del ácido acético (Matsushita et al., 2016).	34
Ilustración 7: Estructura de la celulosa (Esa, Tasirini, & Rahman, 2014).	38
Ilustración 8: Ruta biosintética de producción de celulosa por bacterias del ácido acético (Matsushita et al., 2016).....	39
Ilustración 9: Curva clásica de secado.	42
Ilustración 10: Diagrama general de trabajo. Metodología.	45
Ilustración 11: Comportamiento de parámetros de acidez de la fermentación de referencia.	61
Ilustración 12: Comportamiento de parámetros de acidez de la fermentación con modificación de °Brix.....	62
Ilustración 13: Comportamiento de parámetros de acidez de la fermentación con modificación de Temperatura.	63
Ilustración 14: Comportamiento de parámetros de acidez de la fermentación con modificación de °Brix y temperatura.....	65
Ilustración 15: Gráfico de cambios en °Brix para pruebas de fermentación en condiciones óptimas.....	68
Ilustración 16: Gráfico de cambio en el porcentaje de Azúcares reductores totales para las pruebas de fermentación en condiciones óptimas.....	72
Ilustración 17: Gráfico de cambios en concentración de acidez para las pruebas de fermentación en condiciones óptimas. a) Fermentación 1, b) Fermentación 2.	72
Ilustración 18: Cambio de la productividad de las fermentaciones a condiciones óptimas a través del tiempo.....	76
Ilustración 19: Colonias de BAA GEY 1, después de ser incubadas por 48 h a 28 °C.	77
Ilustración 20: Micrografía simple tinción de Gram, medio GEY 1 a 100x de aumento, realizadas a las 24 h de cultivo a 29°C.	78

Ilustración 21: Colonias de BAA GEY 2, después de ser incubadas por 48 h a 28 °C.	78
Ilustración 22: Micrografía simple de tinción de Gram, de GEY 2 a 100 X de aumento, realizadas a las 24 h de cultivo a 29°C.	79
Ilustración 23: Colonias de BAA GEY 20, después de ser incubadas por 48 h a 28 °C.	79
Ilustración 24: Micrografía simple de tinción de Gram, medio GEY 20 a 100x de aumento, realizadas a las 24 h de cultivo a 29°C.....	80
Ilustración 25: Análisis microscópico de <i>Komagataeibacter xylinus</i> (Matsushita et al., 2016).	81
Ilustración 26: Micrografía 400X de <i>Gluconacetobacter xylinus</i> (Zhang et al., 2018).	81
Ilustración 27: Colonias de levaduras ASN 1, después de ser incubadas por 48 h a 28 °C.	82
Ilustración 28: Microscopías simples de tinción de Gram, medio ASN 1, 100X de aumento, realizadas a las 24 h de cultivo a 29°C.....	83
Ilustración 29: Colonias de levaduras ASN 2, después de ser incubadas por 48 h a 28 °C.	83
Ilustración 30: Micrografía simple de la tinción de Gram de ASN 2, con aumento 100X, realizadas a las 24 h de cultivo a 29°C.	84
Ilustración 31: Colonias de levaduras PDA, después de ser incubadas por 48 h a 28 °C.	84
Ilustración 32: Micrografía simple de la Tinción de Gram de PDA 1 a 100X de aumento, realizadas a las 24 h de cultivo a 29°C.....	85
Ilustración 33: Microscopía electrónica de barrido de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Solieri & Giudici, 2009).	86
Ilustración 33: Micrografía con Tinción de Gram, a 1000X de aumento, <i>Candida boidinii</i> (Salazar Alvarez, 2017).	86
Ilustración 34: Espectros IR.....	88
Ilustración 35: Patrones de Difracción de Rayos X de las secciones de la matriz "Madre del vinagre".	90
Ilustración 36: Micrografías simples de tinción de Gram del inóculo, A1), A2) Capa superior de la matriz; B1), B2) Capa intermedia; C1), C2) Capa inferior. Aumento 100X.	92
Ilustración 37: Microscopía simple, líquido de fermentación.	92
Ilustración 38: SEM (A1), (A2), (A3) capa superior. (B1), (B2), (B3) sección intermedia. (C1), (C2), (C3) capa inferior.	94
Ilustración 39: Imágenes SEM de polisacáridos obtenidos del rizoma de bletillas a diferentes temperaturas (Long et al., 2019).....	95

Ilustración 40: Imágenes SEM de polisacáridos liofilizados (Fimbres-Olivarría et al., 2016). 96

Ilustración 41: Diagramas de fase por difracción de rayos X y marcadores de medición por profundidad de fibras de celulosa 98

Ilustración 42: Reducción de la fracción de humedad de las placas de matriz a través del tiempo..... 99

Ilustración 43: Cambio de la difusividad de agua respecto a la fracción de humedad. 100

Introducción

El uso tradicional y la integración de vinagres en numerosas culturas se remonta a la antigüedad. De hecho, el patrimonio cultural de prácticamente todas las civilizaciones incluye uno o más vinagres producidos por la acción de grupos de microorganismos después de la fermentación alcohólica. Ha formado parte de la alimentación humana desde la antigüedad como condimento, conservador de alimentos y base para remedios sencillos en hombres y animales (Solieri & Giudici, 2009).

Los procesos artesanales que parten desde la fermentación alcohólica del sustrato con un mismo inóculo son poco conocidos y empleados, debido a los largos tiempos de producción a pesar de que se ha demostrado, generan productos de alto nivel sensorial. Con base en lo antes mencionado, el presente trabajo busca caracterizar un proceso de fermentación artesanal utilizando recursos tradicionales mexicanos, como es la “Madre del vinagre” cumpliendo la función de inóculo y la “panela” (o bien, “piloncillo”, conocido residuo mínimamente procesado, derivado del proceso de producción de azúcar de caña) como sustrato principal, obteniendo un vinagre artesanal de buena calidad; permitiendo además el estudio de la microbiota y de la matriz de celulosa que componen al inóculo.

La calidad de los vinagres está determinada por una red de factores, principalmente el sustrato, los microorganismos involucrados y el proceso de acetificación (Solieri & Giudici, 2009); temas que serán abordados en el presente trabajo recurriendo a una caracterización fisicoquímica de los procesos de fermentación y un estudio microbiológico, para explicar el orden del proceso y el papel de los involucrados en el mismo; además de cuestiones de caracterización estructural a través de pruebas espectroscópicas, ópticas y por medio de estudios de difusión estructural; buscando cuantificar la cantidad de material producido a lo largo del proceso de fermentación y resaltando su papel en el mismo.

Objetivo general

Optimizar el proceso artesanal de fermentación para la producción de vinagre y estudiar el inóculo empleado “Madre del vinagre”.

Objetivos específicos

- Comparar condiciones de temperatura y concentración del sustrato (panela) para la optimización de la producción artesanal de vinagre.
- Determinar parámetros fisicoquímicos propios de la fermentación para evaluar el rendimiento y consumo del proceso.
- Caracterizar microbiológica y estructuralmente el consorcio microbiano (“Madre del vinagre”).

1. ANTECEDENTES

1.1 Vinagre

El vinagre ha sido conocido como un agente condimento o conservante en aderezos para ensaladas, ketchup y salsas o ha sido diluido como bebida por la mayoría de las culturas. La palabra vinagre proviene etimológicamente de la palabra francesa "*vin-aigre*" que significa "vino agrio" (Bourgeois & Barja, 2009).

La producción de vinagre se regula a través de un amplio conjunto de estatutos, y la definición del vinagre en sí difiere de un país a otro, ya sea debido a la organización que regula la creación de las normas, o bien, a los parámetros establecidos por denominaciones de origen o costumbres del país.

Según la FAO/WHO, el vinagre es un líquido apto para el consumo humano y se produce exclusivamente a partir de productos adecuados que contienen almidón o azúcares o almidón y azúcares mediante procesos de doble fermentación (Joint FAO/WHO Food Standards Programme, 1998). En los EE. UU., la Food and Drug Administration (FDA) exige que los productos de vinagre tengan un mínimo de 4% de acidez. Esta calificación garantiza la resistencia mínima de digestión de los vinagres vendidos en el mercado minorista (Solieri & Giudici, 2009). De acuerdo con la Ley de Alimentos de Malasia de 1983 y la Regulación de Alimentos de 1985, el vinagre se define como un producto líquido preparado a partir de la fermentación alcohólica y la posterior fermentación acética de cualquier alimento adecuado. La ley también dicta que el vinagre en sí no deberá contener menos del 4% en peso por volumen de ácido acético y no deberá contener ningún ácido mineral.

Según la Comisión del Codex Alimentarius, el vinagre es un líquido apto para el consumo humano y producido exclusivamente a partir de productos adecuados que contienen almidón o azúcares o almidón y azúcares mediante procesos de doble fermentación, alcohólica y acética. El vinagre no debe contener más del 0.5% de alcohol, y el estabilizador no está permitido para su uso en vinagres fermentados de acuerdo con la legislación europea. El vinagre en sí no deberá contener menos de 50 g/l de ácido acético (Comisión Codex Alimentarius, 2000).

El origen del vinagre está ciertamente relacionado con el descubrimiento del vino. Curiosamente, en la antigüedad, el vinagre se consideraba un subproducto alimenticio del deterioro del vino debido al contacto con el aire (Ho et al., 2017).

La primera mención registrada de vinagre fue alrededor de 3000 a. C., cuando los babilonios utilizaron la fruta y la savia de la palmera datilera como materia prima para producir bebidas alcohólicas, las cuales se transformaron naturalmente en vinagre en contacto con el aire (Conner, 1999), en Egipto se encontraron residuos de vinagre en urnas que datan de 3000 a. C. Textos sobre vinagre que datan de 1200 a. C. también se han encontrado en China y en la antigua Grecia, alrededor del año 400 a. C. (Bourgeois & Barja, 2009).

El primer uso conocido del vinagre ya como un subproducto alimenticio ocurrió hace más de 1000 años cuando Hipócrates (460 - 377 a. C.) recomendó el vinagre para limpiar las ulceraciones y para el tratamiento de las llagas.

Los métodos utilizados en los tiempos prehistóricos y antiguos eran ciertamente crudos, y el clima cálido y seco del desierto alentaban una fermentación rápida, convirtiendo rápidamente el jugo de uva en una bebida alcohólica ácida indeterminada (vinagre). Los primeros enólogos solían controlar la fermentación agregando arcilla como tapón, para evitar que el vino u otra bebida alcohólica se convierta en vinagre (Solieri & Giudici, 2009), evitando el contacto con el aire y por tanto, reduciendo las condiciones óptimas del proceso de acetificación.

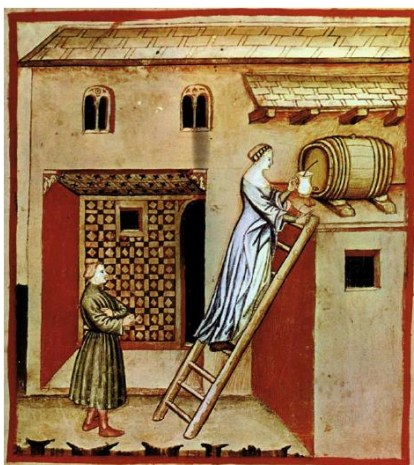


Ilustración 1. Pintura de ejemplificación de producción de vinagre en Milán, Italia, al rededor del año 1550 (Solieri & Giudici, 2009).

El vinagre ha sido mencionado en distintos textos antiguos que muestran el uso y consumo de este producto como en la biblia y más adelante en textos de la edad media en los países europeos desde Italia (Ilustración 1) hasta Alemania (Conner, 1999; Kortlandt, 2002). En los países orientales, el uso del vinagre era tan importante que incluso en China existían catadores especiales para los vinagres que eran consumidos por personas de la realeza.

En cuanto a la tecnología de producción, el primer método utilizado se conocía como el "proceso déjalo solo" donde el vino, dejado en recipientes abiertos, se convirtió en vinagre siendo las bacterias nativas de las frutas, o transportadas por los contenedores o en el aire, convertían el etanol en ácido acético. Más tarde, en el viejo "proceso de campo", los barriles de vino se colocaban en campos abiertos para favorecer el procedimiento.

En 1822, el científico holandés Christian Persoon identificó en un microorganismo el principal agente de acetificación, al que llamó *Mycoderma aceti*. Justus von Liebig (1803-1873) se opuso a esta teoría, manteniendo que la causa de la fermentación era estrictamente inorgánica, pero en 1862 Louis Pasteur (1822-1895) confirmó definitivamente la efectividad de los estudios de Persoon. En su trabajo con la levadura, Pasteur descubrió que, aunque se debía evitar que el aire fermentara el vino, era necesario para la producción de vinagre, confirmó que *Mycoderma aceti*, ahora sistematizado como *Acetobacter aceti*, oxida el alcohol en ácido acético. y sugirió que la producción de vinagre podría mejorarse agregando una cantidad definida de microorganismos a la mezcla de fermentación.

La industria del vinagre de 1800 y principios de 1900 aprovechó estos descubrimientos científicos se aplicaron rápidamente a los procesos productivos y se registraron numerosas patentes, aunque la fabricación de vinagre experimentó pocas mejoras hasta el siglo XX (Solieri & Giudici, 2009).

Finalmente, el verdadero mecanismo de elaboración del vinagre solo se entendió cuando Pasteur publicó en 1864 sus famosas memorias sobre la fermentación acética; identificó científicamente los cinco criterios indispensables para la producción de vinagre: (1) alcohol: en vino, sidra u otras bebidas alcohólicas, (2) oxígeno: el del aire, (3) el fermento: *Mycoderma aceti*, un microorganismo de

milésimas de milímetro, (4) los nutrientes: como el azúcar y las proteínas presentes naturalmente en el vino, mejorando el crecimiento de la bacteria, (5) la temperatura: entre 20 y 35 °C (Bourgeois & Barja, 2009).

1.1.1 Tipos de vinagre

Muchas especies vegetales pueden usarse para la producción de vinagre ya que solo necesitan tener dos atributos básicos principales; siendo en primer lugar seguras para el consumo humano y animal, y en segundo ser una fuente directa o indirecta de azúcares fermentables. Las materias primas más comunes para la elaboración de vinagres son manzanas, peras, uvas, miel, jarabes, cereales, almidones hidrolizados, cerveza y vino. (Solieri & Giudici, 2009). Existen algunos tipos de vinagres, clasificados según sus materias primas y el proceso de fermentación. Los sustratos se pueden clasificar de la siguiente manera:

1. Ácidos y fácilmente fermentables. Tienen un pH menor a 3.5, con glucosa, fructosa y sacarosa como componentes principales, por ejemplo, bayas, uvas, manzanas y ciruelas.
2. Moderadamente ácidos y fácilmente fermentables. Tienen un pH en el rango de 3.5 a 4.5, por ejemplo, higos y dátiles.
3. Baja acidez y fácilmente fermentables. Tienen un pH mayor a 4.5, por ejemplo, savia de palma.
4. No fermentables. Se requiere hidrólisis antes de la fermentación, por ejemplo, semillas.

Además, cabe mencionar que muchos autores difieren del número aproximado de vinagres existentes alrededor del mundo, por lo que a continuación se mencionarán algunos de los más importantes de los cuales hay un registro más amplio y específico.

- **Vinagre de arroz:** es un condimento sazonador tradicional utilizado en China, Japón y Corea (Solieri & Giudici, 2009), está hecho de vino de arroz fermentado (sake), que se produce mediante dos pasos de procesamiento, sacarificación por moho koji (*Aspergillus oryzae*) a partir de arroz al vapor y fermentación de alcohol por levadura de sake (*Saccharomyces cerevisiae*) (Matsushita et al., 2016). Existen tres tipos de vinagre de arroz chino/japonés: ámbar (ámbar claro/pálido usado en platos agrdulces), rojo (acompañamiento del cangrejo hervido y al vapor) y negro (condimento de mesa y bebida saludable) (Solieri & Giudici, 2009). Se produce mediante fermentación tradicional de superficie estática o fermentación moderna continua o sumergida en lotes. La acidez final del vinagre suele ser inferior al 10% en p/v de ácido acético. Las bacterias dominantes del ácido acético son *Acetobacter pasteurianus* en cultivo de superficie y *Acetobacter xylinum* (*Komagataeibacter xylinus*) en cultivo sumergido (Ho et al., 2017).
- **Vinagre de vino:** Es el vinagre más común para fermentaciones caseras en países mediterráneos, países de Europa central (Italia, Francia, Oeste de Alemania, España, Portugal) y se tienen algunos registros de Sudáfrica (Conner, 1999; Solieri & Giudici, 2009). Estos pueden provenir de vinos tintos, blancos, rosados, etc.; y usualmente se fermentan y maduran en barricas de madera por tiempos prolongados que pueden llegar incluso a los 2 años, dándoles un rango de calidad mayor por dicho proceso de maduración al amplificar su complejo sabor (Matsushita et al., 2016; Conner, 1999). Algunos estudios sobre la caracterización de este tipo de vinagres lograron identificar a los microorganismos responsables de la generación del producto como son *Komagataeibacter europaeus*, *Komagataeibacter oboediens*, *Acetobacter pomorum* y *Acetobacter pasteurianus* (Sievers, Sellmer, & Tcuber, 1992; Sokllek, Hertel, & Hammes, 1998; Andres-Barrao & Barja, 2008).
- **Vinagre de sidra:** El vinagre de manzana o vinagre de sidra está hecho a partir de jugo o concentrado de manzana a través de un proceso de

doble fermentación: alcohólica y acética (Bourgeois & Barja, 2009; Solieri & Giudici, 2009; Matsushita et al., 2016).

De acuerdo con la legislación mexicana especificada para la calidad de los vinagres en la NMX-F-122-1968. ALIMENTOS PARA USO HUMANO. CALIDAD PARA VINAGRE ENVASADO PARA CONSUMO PÚBLICO. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS, se maneja una clasificación siendo vinagres grado "A" los derivados de jugos de frutas, vinos, cereales, entre otros y los vinagres grado "B" los derivados de alcohol etílico potable desnaturalizado. Para legislaciones de amplitud mundial como la mostrada en el BOE - Real Decreto 661/2012, de 13 de abril, por el que se establece la norma de calidad para la elaboración y la comercialización de los vinagres, la clasificación se limita a vinagres de vino y algunas bebidas alcohólicas, y otros vinagres.

1.2 Evolución de los métodos de producción de vinagre

Hay dos etapas del proceso de fermentación requeridas para la producción de vinagre, las cuales son la fermentación alcohólica y la acética, además, dependiendo de la variedad tecnológica y de los materiales empleados para este proceso, se puede anexar una clasificación de los vinagres según si son de origen industrial o artesanal.

La fermentación puede ser inducida ya sea por **fermentación espontánea**, por **decantación** (también llamada **fermentación por retroceso**) o por la **adición de cultivos iniciadores**, si hablamos de estos métodos sin el uso de algunas tecnologías avanzadas, fueron las técnicas principales en la antigüedad para procesar el vinagre artesanal.

Procesos artesanales

Fermentación espontánea. La materia prima se procesa y las condiciones ambientales modificadas fomentan la microflora indígena más apropiada. Cuanto más estrictas son las condiciones de crecimiento, mayor es la presión selectiva

ejercida sobre los microorganismos autóctonos. La fermentación espontánea es adecuada para la producción a pequeña escala y solo para bebidas muy específicas, debido a la posible contaminación con microorganismos indeseables para la fermentación. Sin embargo, el método es difícil de controlar y existe un gran riesgo de deterioro. En la mayoría de las fermentaciones espontáneas, tiene lugar una sucesión microbiana, y muy a menudo dominan bacterias ácido-lácticas y levaduras inicialmente. Estos consumen azúcares y producen ácido láctico y etanol, respectivamente, que inhiben el crecimiento de muchas especies de bacterias, determinando la prolongación de la vida útil de los productos (Solieri & Giudici, 2009).

Fermentación de retroceso. Utiliza parte de un lote previamente fermentado para inocular un nuevo lote. Este procedimiento aumenta el número inicial de microorganismos deseables y asegura un proceso más confiable y rápido que la fermentación espontánea. El retroceso es un precursor primitivo del método de cultivo iniciador, porque las especies mejor adaptadas se siembran sobre la población nativa (De Vuyst, 2000). Aunque mejora el crecimiento de levaduras útiles, al tiempo que inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos y reduce el deterioro, y además se evita el laborioso y lento proceso de selección de iniciadores, los productos manufacturados aún están expuestos al riesgo de falla de la fermentación, ya que puede producirse el crecimiento de moho o el deterioro por bacterias dañinas. En algunos procesos, al menos un tercio del vinagre se deja en el fermentador para inocular el vino nuevo, mientras que en la fermentación de capa superficial se puede realizar fácilmente un trasplante físico de la película BAA para preservar la integridad de la capa celular, como se muestra en la Ilustración 2.



Ilustración 2. Ejemplo de un proceso de fermentación por retroceso (Solieri & Giudici, 2009).

Cultivo de inicio. Preparación microbiana de una gran cantidad de células de un microorganismo que se agrega a la materia prima para producir un alimento fermentado al acelerar y dirigir su proceso de fermentación (Leroy & De Vuyst, 2004), esto asegura que los cultivos no sean una mezcla de diferentes individuos desconocidos. Con respecto a la fermentación acética, el uso de cultivos iniciadores está muy lejos de aplicarse a gran escala, por dos razones principales: primero, las BAA son microorganismos nutricionalmente exigentes, que son difíciles de cultivar y mantener en medios de laboratorio, o de preservar como un inóculo seco; y, en segundo lugar, el vinagre es generalmente un producto económico y, por lo tanto, su fabricación no garantiza una costosa selección de cultivo iniciador (Solieri & Giudici, 2009).

Procesos industrializados

Existen de igual forma métodos modificados con el uso de tecnologías simples y avanzadas que ayudan a controlar los procesos de fermentación para optimizar estos procesos, con la finalidad de hacer más rentables y en menor tiempo los productos obtenidos; estos casos han tenido una evolución sistemática a lo largo de los años, algunos de los métodos se mencionan a continuación.

Proceso de Orleans. Es uno de los procesos comerciales más antiguos de vinagre. El equipo consiste en un barril grande con un agujero de 2 pulgadas perforado justo por encima del centro en un extremo del barril, y en el otro extremo se perfora otro agujero del mismo tamaño aproximadamente una pulgada, estos agujeros se cubren con tamices y se usa una espita para retirar el producto, y un tubo pasa a través del tapón hasta el fondo del barril con el fin de agregar vino u otro licor alcohólico, para que la película superficial de bacterias no se altere. La inoculación se hace generalmente de un lote anterior. El líquido en el barril es generalmente un vino de baja calidad mezclado con aproximadamente el 20% de su volumen de vinagre fresco, que sirve como inóculo y aumenta la acidez. En lugar de colocarlos en los campos, los barriles se almacenan en un edificio con calefacción o en una bodega subterránea. La eficiencia es baja según los

estándares actuales (77 a 84%) (Joslyn, 1970). Las características objetables de este método fueron el llenado gradual del barril con limo o "madre del vinagre" y la lenta velocidad de reacción (Mitchell, 1926).

Procesos rápidos. Precursor: Mitchell (1926) dio una descripción ampliada de un método francés que utiliza generadores empaquetados, que se había publicado anónimamente en 1670. Se usan dos barriles grandes, cada uno equipado con un fondo falso y un grifo para extraer el líquido. Un barril está completamente lleno de vino; el otro solo medio lleno. A intervalos apropiados, la mitad del contenido del barril lleno se transfiere al barril medio lleno. Durante el clima cálido es necesario transferir el vino de barrica a barrica al menos dos veces al día para mantener la temperatura dentro de los límites adecuados para la producción de vinagre (Conner, 1999).

Posteriormente al tecnólogo holandés Boerhaave generalmente se le da crédito por construir el primer generador usando empaque y aplicando el principio de goteo para la producción de vinagre. Mitchell afirmó en 1926 que Schützenbach introdujo el uso de un tanque en lugar de un barril para el proceso de acetificación y proporcionó medios mecánicos para la distribución repetida del licor ácido sobre el empaque. Proporcionó agujeros para ventilación cerca del fondo del generador y se le atribuye el crédito por inventar el llamado proceso alemán (Conner, 1999).

Una mejora importante en el proceso de vinagre rápido se hizo cuando Frings en 1932 introdujo el generador de circulación, se produjeron vinagres de mayor concentración de ácido, que requieren un tanque de menor tamaño, y se logró una mayor velocidad de producción. La aireación forzada, el control de temperatura y la operación semicontinua producen una mayor eficiencia (Conner, 1999).

Fowler & Subramaniam (1923) estudiaron lo que ahora llamamos cultivo sumergido para la producción de vinagre, estos últimos investigaron la preparación de cultivos puros de *Acetobacter*, los efectos de la cantidad de inóculo, la concentración de etanol, la velocidad de aireación forzada, la temperatura, los estimulantes como el cieno activado y la acción de bacterias extrañas en acetificación sumergida, fue hasta finales de la década de 1940 que la tecnología utilizada en la producción de antibióticos condujo al nuevo método para la

producción de vinagre. Una vez descrita la acetificación sumergida por Haesler en 1942, las investigaciones condujeron al desarrollo del acetificador Frings. Que consiste en un tanque de acero inoxidable equipado con serpentines de enfriamiento internos y un agitador de alta velocidad que ingresa al fondo. Este último está diseñado para extraer aire de la habitación al fondo del tanque, donde el agitador lo dispersa finamente y lo distribuye por todo el líquido en el tanque. Los dispositivos automáticos controlan la velocidad de aireación y el flujo de agua de enfriamiento. El equipo se opera por lotes para vinagre blanco destilado. Se bombea alimento fresco para restaurar el nivel original y el ciclo comienza nuevamente. Es imperativo que el agitador y el suministro de aire funcionen continuamente durante el cambio. Los ciclos suelen durar entre 25 y 35 horas (Conner, 1999). Este último se considera el método de uso más común en sistemas de producción de vinagre y salvo modificaciones en sistemas de control e instrumentación de los equipos, la base es la misma.

1.3 Producción y consumo

1.3.1 Mundial

Según informes de consumo alimenticio emitidos por la OMS (Organización Mundial de la Salud, 2014) y la Administración del Mercado Español (2016), el vinagre es consumido principalmente por países europeos llegando hasta 3 litros por persona al año, caso contrario de países latinoamericanos donde no se llega ni al medio litro por año.

La producción de vinagre es una pequeña industria en la economía general de los países industrializados. Las acciones mundiales de los diferentes tipos de vinagre en 2005 fueron vinagre balsámico (34%), vinagre de vino tinto (17%), vinagre de sidra (7%), vinagre de arroz (4%), vinagre blanco (2%) y otros vinagres (36%) (Solieri & Giudici, 2009).

EE. UU. es el principal productor mundial de vinagre, con un volumen de 300 millones de litros, cerca del 70% de la población consume vinagres de alcohol de cereales; el resto, de manzana y de sidra. El mayor productor europeo es Alemania,

con 1.8 millones de hectolitros, de los que casi el 90% está compuesto por vinagres de alcohol. En segundo lugar, se sitúa Francia, con 1.1 millones de hectolitros siendo el porcentaje de los vinagres de alcohol de hasta el 63%. A continuación, aparecen el Reino Unido, con una producción de 747,000 hectolitros (55% de vinagres de alcohol) e Italia, con 660,000 hectolitros (mayormente vinagres de vino). España ocupa el quinto puesto en la producción de vinagre dentro de la Unión Europea. Los vinagres de vino suponen el 93% del total de su producción, seguidos por los vinagres de alcohol (6.5%) y en cantidades más pequeñas, los vinagres de manzana y miel. A menor escala, Holanda, con una producción de 291,000 hectolitros de vinagre, Portugal (65,000 hectolitros) y Finlandia, con 27,500 hectolitros (Carballo Cabrera et al., 2007).

En términos de exportación, en la Tabla 1 se muestra los principales países exportadores e importadores de vinagre, resaltando a México como uno de los principales importadores de vinagre proveniente de Estados Unidos.

Tabla 1: Principales países exportadores de vinagre en el mundo (2012).

País	Monto (USD)	Porcentaje %	Volumen (L)	Principales importadores
Italia	288,682.758	54	105,369.207	EE. UU., Alemania, Francia, Reino Unido
España	32,334.520	6	43,881.107	EE. UU., Francia, Reino Unido, Italia, Alemania
Alemania	28,843.685	5	34,568.584	Holanda, Francia, Italia, Austria
Francia	25,877.420	5	31,013.574	EE. UU., Bélgica, Holanda, Alemania, Japón
Estados Unidos	22,066.193	4	32,875.077	Canadá, Arabia Saudita, México
Otros	132,551.570	25	127,249.507	---
Total	530,356.146	100	344,731.495	---

(Grigolato, 2013)

1.3.2 Nacional

En los países en desarrollo, donde la conservación de alimentos y las opciones tecnológicas son limitadas, el vinagre es un agente importante para preservar las frutas y verduras frescas; además de que se considera más un ingrediente de otros platillos que un alimento tal cual por sí solo.

El vinagre producido en México está elaborado fundamentalmente mediante producción industrial a partir de manzana (sidra) y alcohol de caña, debido a la abundancia de caña en el país (Ancizu, 2002).

En México se importan vinagres extranjeros considerados como productos delicatessen, es decir de alta calidad y perfiles sensoriales amplios, estos son provenientes principalmente de Estados Unidos con un 44% y algunos de la Unión Europea (Italia 36%, España 15% y Francia 2%) alcanzando un valor aproximado de 5.75 millones de dólares anuales (OEC, 2017), con un comportamiento al alza en los volúmenes de importación principalmente de España debido a su alto grado de aceptación y óptimas condiciones de elaboración. En México, la producción de vinagre de mayor calidad es elaborado por Domecq con vinagre de vino tinto y Diener & Diener con vinagre de finas hierbas. Estos son los vinagres que compiten tanto en calidad, precio y presentación con los vinagres importados (Embajada de España en México – Oficina Económica y Comercial, 2002), otro tipo de producción de vinagre artesanal en México ha sido confinada básicamente a los hogares para el autoconsumo, pero es mínima y va en desuso constantemente.

1.4 Normatividad y legislación

La normativa empleada de manera común es la referida en el Codex Alimentarius donde se establece primeramente la definición de vinagre que se mencionó al principio de este capítulo, además, se realiza una aclaración sobre el nombre que se le asigna a los vinagres que provienen de un solo proceso de fermentación usando como base bebidas destiladas, estas se conocen como “*Spirit vinegar*”. Una vez mencionado esto, se aclaran los valores adecuados del contenido

de vinagre en cuanto a composición y contaminantes, que se permiten bajo esta norma, siendo los mismos que se establecen por la Organización Internacional de la Viña y el Vino, el principal organismo para normar y regular las características del vinagre en Europa y países de la unión europea. Algunas de dichas características se mencionan a continuación:

Prácticas permitidas.

1. La centrifugación, filtración y clarificación, con o sin coadyuvantes tecnológicos.
2. La utilización de sustancias orgánicas, en particular, preparaciones de malta, almidón líquido, glucosa y sustancias inorgánicas tales como fosfatos y sales de amonio.
3. Los tratamientos térmicos, como la esterilización, la pasteurización y la refrigeración.
4. La adición de agua al líquido alcohólico para rebajar su grado.
5. El tratamiento con carbón activo lavado de origen vegetal para atenuar su color.
6. El empleo de bacterias acéticas seleccionadas y cultivadas en estado de pureza.
7. La oxidación forzada por medio de aire u oxígeno puro.
8. En los vinagres de vino y de sidra, el empleo de ácido fítico y sus sales de reducción de contenido de hierro.
9. El envejecimiento, entendido como la operación que consiste en dejar que se desarrollen naturalmente en recipientes apropiados (madera de roble), ciertas reacciones que le confieren al vinagre cualidades sensoriales que no tenía anteriormente.

Prácticas prohibidas.

1. La mezcla de vinagres de distinta naturaleza.
2. La adición de alcohol a las materias primas y durante el proceso de elaboración de los vinagres, excepto en el vinagre de alcohol.
3. La adición de ácido acético.

Sustancias prohibidas.

- a) Aceites de pepitas de uva, naturales y artificiales.
- b) Residuos de destilación, residuos de fermentación y otros productos secundarios derivados de éstos.
- c) Sustancias extraídas de todo tipo de hollejo.

Materias primas e ingredientes facultativos.

1. Materias primas:

- a) Vinos
- b) Sidras.
- c) Zumos de frutas.
- d) Aguardientes, destilados de origen agrícola, alcoholes etílicos de origen agrícola y bebidas alcohólicas.
- e) Otros productos de origen agrícola que contengan almidón, azúcares o almidón y azúcares, incluyendo, entre otros, granos de cereales y malta de cebada.

2. Ingredientes facultativos:

- a) Plantas y/o sus partes aromáticas y/o especias y/o frutas y/o aromas que sean establecidos como ingredientes alimentarios con propiedades aromatizantes.
- b) Zumos de frutas.
- c) Mostos de uva.
- d) Miel.
- e) Azúcar.
- f) Sal.
- g) Aditivos autorizados por la normativa de aplicación horizontal.

- 3. Todas las materias primas e ingredientes utilizados en la elaboración de los vinagres deberán cumplir los requisitos que les exija la legislación alimentaria específica.

Características de los productos terminados.

- a) Un contenido de C14 correspondiente a su origen biológico.
- b) Un contenido de metanol que no exceda de 0.5 g/l.
- c) Acidez total, expresada en gramos de ácido acético por litro.
 - Vinagre de vino: Mínimo 60 g/l.
 - Otros vinagres: Mínimo 50 g/l.
- d) Alcohol residual.

Vinagre de vino: Máximo 1.5% V/V.

Otros vinagres: Máximo 0.5% V/V.

Como excepción, el alcohol residual máximo de los vinagres con denominación de origen protegida (DOP) o indicación geográfica protegida (IGP).

e) Extracto seco.

Vinagre de vino: Mínimo 1.2 g/l y grado de ácido acético.

f) Acetoína.

Vinagre de vino: Mínimo 30 mg/l.

Hablando ahora de la normativa nacional, en México el documento aplicable para vinagre es la NMX-F-122-1968. ALIMENTOS PARA USO HUMANO. CALIDAD PARA VINAGRE ENVASADO PARA CONSUMO PÚBLICO. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS, donde se explica de forma diferente las características propias para la calidad de vinagre siendo que:

- El vinagre debe ser límpido, brillante, transparente sin presentar turbidez.
- El vinagre es sometido a pasteurización.
- El vinagre hecho a partir de jugo de frutas, vino, cereales, etc. podrá ser añejado para mejorar su calidad, aroma y sabor.
- El sabor será el característico del producto, de acuerdo con la materia prima usada o los aromatizantes naturales empleados.
- En el caso de vinagres de vino y de alcohol, éstos podrán estar aromatizados con especias y condimentos: estragón, albahaca, jengibre, canela, clavo, laurel, comino, ajo, cebolla y otros que a juicio de la Secretaría de Salubridad y Asistencia se autoricen, señalándose en la denominación del producto la materia prima y el aromatizante empleado.
- No tendrá ningún sabor extraño, sino el característico de la materia prima de la que provenga.

Esta Norma establece dos grados de calidad:

Grado "A" o Vinagre de jugo de frutas, vinos, cereales, etc.

Grado "B" o Vinagre de alcohol etílico potable desnaturalizado con vinagre.

Tabla 2: Límite en propiedades fisicoquímicas del vinagre según la NMX-F-122-1968 Calidad de vinagres.

Especificaciones	Grado A		Grado B	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Densidad relativa a 15°C (g/cm³)	1.013	1.025	1.010	1.013
Extracto seco (%)	1.8	4.52	0.26	0.30
Cenizas (%)	0.25	0.45	0.03	0.05
Acidez total en % de ácido acético	4	8	4	8
Acidez fija (%)	0.06	0.41	0	0
Acidez volátil (%)	3.94	7.56	4	8

1.4 Microorganismos usados en la producción de vinagre y su metabolismo

1.4.1 Levaduras

Las levaduras se han utilizado durante milenios en la fabricación de pan y la producción de bebidas alcohólicas (Querol & Fleet, 2006), y en el caso de la fermentación acética, son los protagonistas de la primera etapa de fermentación.

Las levaduras pertenecen al reino fungi, tienen etapas vegetativas principalmente la reproducción por gemación o fisión, lo cual resulta en el crecimiento de muchas células individuales en conjunto (Solieri & Giudici, 2009). En general, las levaduras crecen bien a un pH de 3 a 5, y a veces crecen con dificultad a un pH neutro. Prefieren sustratos ácidos y generalmente fermentan los azúcares vigorosamente a concentraciones de hasta 20%, pero el metabolismo fermentativo se ralentiza a concentraciones más altas. Cuando la concentración de azúcar es superior al 50%, la presión osmótica se volverá excesivamente alta, lo que puede inhibir el crecimiento y el metabolismo de la mayoría de las especies de levadura (Sha et al., 2015).

S. cerevisiae, es probablemente uno de los microorganismos de mayor uso biotecnológico (mostrado en la Ilustración 3), bajo condiciones de anaerobiosis, utiliza el ácido pirúvico generado por la glucólisis como un oxidante de la coenzima NADH, el cual, por la glucólisis se reoxida a NAD⁺. Entonces, el ácido pirúvico es convertido en acetaldehído al sufrir una descarboxilación y posteriormente es reducido a etanol, con el paso final (catalizado por la enzima alcohol deshidrogenasa) regenerando el NAD⁺ para habilitar la glucólisis y continuar la producción de ATP. En esta conversión de glucosa a etanol y dióxido de carbono durante la fermentación, están involucradas un total de 12 enzimas de la levadura: 10 para degradar la glucosa en piruvato con la generación de ATP para el crecimiento de la levadura, y 2 enzimas más para convertir el piruvato en los productos finales de la fermentación, mientras que la levadura mantiene su balance óxido-reductor (Wlaker & Walker, 2018). La piruvato-deshidrogenasa tiene una afinidad diez veces mayor por el piruvato que la piruvato-descarboxilasa, pero su actividad en la célula es bastante baja. Por lo tanto, las bajas concentraciones de piruvato favorecen su oxidación a través de la piruvato-deshidrogenasa, mientras que las altas concentraciones de piruvato (que ocurren cuando el flujo a través de la glucólisis es alto, como durante el crecimiento en altas concentraciones de glucosa) dan como resultado un metabolismo fermentativo de "desbordamiento" a través de la descarboxilasa de piruvato y el alcohol deshidrogenasa con la formación resultante de etanol (Querol & Fleet, 2006). Estas últimas dos enzimas clave, tienen cofactores de iones metálicos que requieren de magnesio y zinc, respectivamente. Por lo tanto, la viabilidad de estos iones metálicos en el medio de fermentación puede impactar de manera directa la eficiencia de la conversión de azúcar en etanol y en general con el progreso de la fermentación (Wlaker & Walker, 2018).

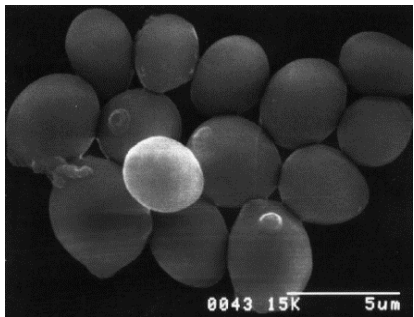


Ilustración 3: Microscopía electrónica de barrido de *Saccharomyces cerevisiae* (Solieri & Giudici, 2009).

Fundamentalmente la razón por la que las levaduras hacen alcohol es porque las células de levaduras necesitan producir energía y así mantener el balance óxido-reductor cuando consumen azúcares bajo condiciones anaeróbicas. La disponibilidad de nutrientes tendrá un impacto significativo en el crecimiento de la levadura y su tolerancia al estrés, rendimiento de etanol, y la síntesis de metabolitos secundarios de la fermentación (Wlaker & Walker, 2018).

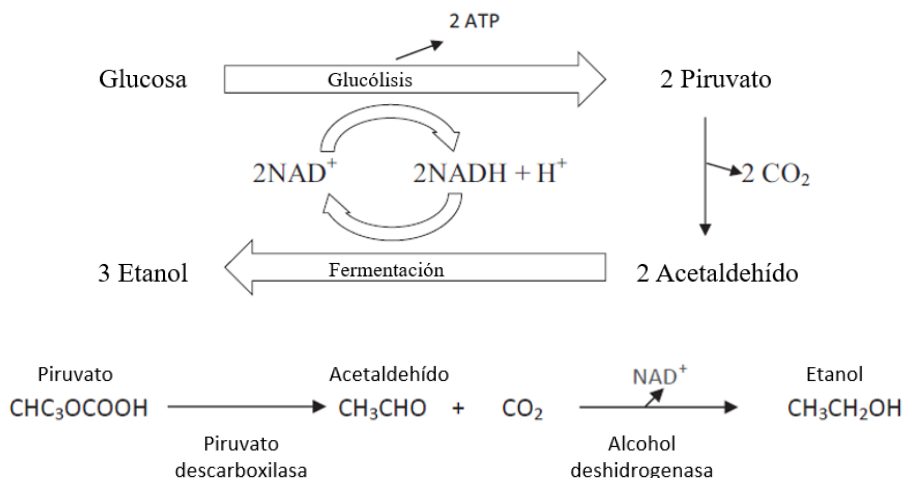


Ilustración 4: Vía de producción de etanol por levaduras. Tomado y traducido de (Querol & Fleet, 2006).

En el metabolismo de las levaduras (Ilustración 4) la sacarosa se convierte en glucosa y fructosa. Esta transformación ocurre por medio de la enzima sacarasa o invertasa, o de manera más específica, la β-D-fructofuranosidasa. La especificidad de la enzima por la sacarosa se debe a un residuo β-D-fructofuranosil terminal de la sacarosa, generando la separación del disacárido y permitiendo el paso de la molécula a la ruta metabólica propia.

Además, cabe recalcar que se debe proporcionar a las levaduras no solo una fuente de carbono fermentable sino también una variedad de otros nutrientes. Estos incluyen amino nitrógeno libre, minerales (p. Ej., K, S, Mg), oligoelementos (p. Ej., Zn, Ca, Fe, Cu), vitaminas (p. Ej., Biotina, riboflavina, ácido pantoténico) y factores de crecimiento accesorios (p. Ej., esteroides, ácidos grasos). El oxígeno también es un factor de crecimiento esencial. Esto se debe a que *S. cerevisiae* es auxotrófico para el oxígeno en condiciones estrictamente anaeróbicas, ya que el oxígeno es absolutamente esencial para la biosíntesis de los componentes clave de la membrana, como el ergosterol y el ácido oleico. Después de la aireación u oxigenación antes del inicio de la fermentación, las membranas de levadura se enriquecen con esteroides y ácidos grasos insaturados y, como consecuencia, las células son mucho más fermentativas y tolerantes al estrés. En consecuencia, para lograr un buen rendimiento de fermentación, los productores de alcohol deben asegurarse de que los medios de fermentación estén adecuadamente aireados u oxigenados antes del inicio de la fermentación anaeróbica (Walker & Walker, 2018).

1.4.2 Bacterias del ácido acético

Las bacterias del ácido acético (BAA) incluyen 17 géneros de bacterias todas localizadas dentro de la familia *Acetobacteraceae* (Ilustración 5). Estos son microorganismos aerobios estrictos, pueden oxidar etanol a ácido acético en un ambiente aerobio, el cual ha sido el principal método de producción de vinagre (Li et al., 2015), a este proceso también se le conoce como fermentación oxidativa.

A continuación, se presenta una breve descripción de las especies más comunes presentes en procesos de fermentación para producción de vinagre.

- *Acetobacter*

El género *Acetobacter* es el más antiguo en la clasificación de las bacterias del ácido acético y el género tipo de la familia *Acetobacteraceae*. Las células son gramnegativas, elipsoidales en forma de barra, midiendo 0.4–1.0 μm por 1.2–3.0 μm , pudiendo poseer flagelos peritricos o polares. Las colonias son

generalmente circulares, lisas, enteras, convexas, de color crema a beige, opacas y butirosas en agar glucosa/etanol/extracto de levadura/peptona. La temperatura óptima de crecimiento es de alrededor de 30°C. La mayoría de las especies pueden crecer a 37°C, pero no a 45°C. Crece a pH 3.5 (Matsushita, 2016).

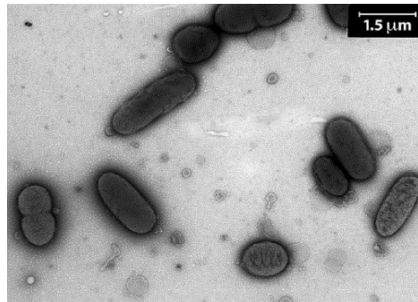


Ilustración 5: Microscopía electrónica de barrido de distintas bacterias del ácido acético (Solieri & Giudici, 2009).

- *Gluconobacter*

Las células son gramnegativas, elipsoidales en forma de varilla, miden 0.4–1.2 μm por 1.0–3.0 μm y están flageladas polarmente cuando son móviles. Las colonias son lisas, elevadas a convexas, completas y relucientes en agar etanol/glucosa/extracto de levadura/carbonato de calcio. Algunas cepas producen colonias rosadas. Es estrictamente aeróbico, catalasa positiva y oxidasa negativa. El ácido acético se produce a partir de etanol. El acetato y el lactato no se oxidan (Matsushita, 2016) su temperatura óptima para el crecimiento es de 25-30°C. Muchas especies crecen a 35°C, y algunas especies crecen a 37°C, su pH óptimo para crecimiento es alrededor de 5.5 (Matsushita, 2016).

- *Acidomonas*

El género *Acidomonas* se introdujo para la bacteria facultativamente metilótrofa. Las células son gramnegativas, barras cortas, que miden 0.5–0.8 μm por 1.5–2.0 μm . Las células se producen individualmente, en pares, o raramente en cadenas cortas, y son móviles con un solo flagelo polar o no móviles. Las colonias son brillantes, lisas, circulares, convexas, enteras, de color beige a rosa y de 1–3

mm de diámetro en agar glucosa/peptona/extracto de levadura/extracto de malta (PYM) (pH 4.5) después de 5 días a 30°C (Matsushita, 2016).

- *Gluconacetobacter*

El género *Gluconacetobacter* estaba formado por dos grupos: el grupo *Gluconacetobacter liquefaciens* y el grupo *Gluconacetobacter xylinus* (Matsushita, 2016). Las células son barras gramnegativas, que miden 0.6–0.9 µm por 1.2–2.0 µm con flagelos peritricos cuando son móviles, y se presentan individualmente o en pares. Las colonias son generalmente de color marrón claro a marrón. La mayoría de las especies crecen en un 30% de D-glucosa (w / v). Crece entre 15 y 30°C, con una temperatura óptima de 30°C, pero no a 37°C. Crece a pH 3.0 y su pH óptimo de crecimiento es de aproximadamente 5.5 (Matsushita, 2016).

- *Komagataeibacter*

Las características fenotípicas de las células del género *Komagataeibacter* son barras gramnegativas, que miden 0.5–0.8 µm por 1.0–3.0 µm que ocurren individualmente, en pares o en cadenas, generalmente no móviles. Las colonias son circulares, lisas o ásperas, elevadas a convexas o umbonadas, enteras, brillantes y de color blanco cremoso a beige. Crece generalmente en presencia de ácido acético al 0.35% (v/v). Algunas especies requieren ácido acético para su crecimiento. Crece a pH 3.0, no producen 2,5-diceto-D-gluconato a partir de D-glucosa, ni pigmento marrón soluble en el medio de glucosa/peptona/extracto de levadura/carbonato de calcio (Matsushita, 2016).

1.4.2.1 Metabolismo de carbohidratos

Las bacterias del ácido acético pueden metabolizar varios carbohidratos como fuentes de carbono, siendo la glucosa la más utilizada (Gerard, 2015). Como en otros microorganismos, la glucosa actúa como fuente de carbono para la mayoría de las cepas de bacterias del ácido acético. Sin embargo, a diferencia de las levaduras, esta glucosa no se metaboliza como parte de la glucólisis. Aunque la

mayoría de las reacciones individuales son funcionales, la vía completa está inactiva como resultado de la falta de la enzima fosfofructoquinasa. En consecuencia, las bacterias del ácido acético deben utilizar vías alternativas para emplear los carbohidratos como fuentes de carbono y energía (Guillamón & Mas, 2014).

- 1) El sistema de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa transforma un mol de glucosa-6-fosfato en un mol de ribulosa-5-fosfato con la formación de dos moles de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) a través de tres reacciones. En todos los casos, la producción de energía tiene lugar como consecuencia de la oxidación de NADPH a través de la cadena respiratoria y la producción de adenosina trifosfato (ATP) por fosforilación oxidativa.
- 2) La vía Entner-Doudoroff, que debe considerarse como una extensión del sistema de glucosa-6-fosfato, convierte la glucosa-6-fosfato en gluconato-6-fosfato. Luego se hidroliza mediante una aldolasa para formar piruvato y gliceraldehído-3-fosfato. Ambas moléculas se convierten en acetato por descarboxilación. Esta reacción es característica de algunas cepas de *Gluconobacter oxydans*.
- 3) La ruta de Warburg-Dickens o el ciclo de hexosa monofosfato es la ruta más común para el metabolismo de la glucosa y está presente en todas las especies de bacterias del ácido acético. Incluye las tres reacciones que comprenden el sistema de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y produce monosacáridos de tamaño variable que finalmente se convierten en triosa fosfatos, que luego se pueden metabolizar en la vía Embden-Meyerhoff-Parnas.

Los productos finales de estas vías se pueden oxidar por completo para producir dióxido de carbono y agua a través del ciclo de Krebs (Guillamón & Mas, 2014). Las aldosas son oxidadas en ácidos aldónicos; así la glucosa es oxidada a ácido glucónico, reacción catalizada por la glucosa oxidasa. Además, las BAA pueden utilizar otras fuentes de C: fructosa, galactosa, arabinosa, manosa, ribosa, xilosa,

así la galactosa es oxidada a ácido galactónico y la arabinosa a ácido arabinónico. Las cetosas no son fácilmente oxidadas por las BAA. La oxidación de la fructosa puede conducir a ácido glucónico y a ceto-5-fructosa y en algunos casos la cadena carbonada se escinde y se acumulan ácidos glicéricos, glicólico y succínico (Gerard, 2015).

Los productos finales de todas las rutas descritas pueden ser oxidados completamente hasta CO₂ y H₂O a través del ciclo de Krebs, excepto en las especies del género *Gluconobacter*, que son incapaces de oxidar completamente estas moléculas por no tener funcional dicho ciclo. En cambio, los géneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter* y *Komagataeibacter* pueden llevar a cabo la oxidación completa, aunque la presencia de glucosa/fructosa o etanol reprimen el funcionamiento de esta ruta metabólica y, por tanto, ésta se dará sólo cuando se hayan consumido completamente las fuentes de carbono presentes en el medio (Gerard, 2015).

1.4.2.2 Metabolismo de etanol

La fermentación oxidativa es un proceso de oxidación incompleta donde los sustratos son oxidados por las deshidrogenasas primarias de la cadena respiratoria y los productos oxidados se liberan al medio de cultivo. Los electrones son extraídos del sustrato por la deshidrogenasa primaria, y luego transferidos a la oxidasa terminal a través de la ubiquinona. Estas deshidrogenasas primarias están ubicadas específicamente en el lado periplásmico de la membrana citoplasmática. Las enzimas se clasifican aproximadamente en dos categorías: una es la quinoproteína unida a la membrana que tiene pirroloquinolina quinona (PQQ) como el grupo protésico, y las otras son un complejo de tres subunidades que consiste en la subunidad deshidrogenasa. La cadena respiratoria genera una fuerza motriz de protones solo en la oxidasa terminal que podría utilizarse para la síntesis de ATP o algún otro trabajo energético. Por lo tanto, dicha fermentación oxidativa es crítica en la generación de energía para el crecimiento celular, además de la acumulación de los productos oxidativos de las células (Matsushita et al., 2016).

La fermentación con ácido acético se lleva a cabo mediante oxidaciones secuenciales de etanol a ácido acético a través de acetaldehído. La pirroloquinolina quinona unida a la membrana (PQQ), dependiente de la alcohol-deshidrogenasa (ADH) y la aldehído-deshidrogenasa unida a la membrana (ALDH) constituyen la cadena respiratoria oxidante de etanol en la superficie externa de la membrana citoplasmática de las bacterias del ácido acético: *Komagataeibacter*, *Acetobacter*, y *Gluconobacter*. La PQQ-alcohol deshidrogenasa (ADH) unida a la membrana se considera la enzima clave en la producción de vinagre debido a su lugar esencial en la oxidación del etanol a acetaldehído, el intermedio que luego se oxidará por el MCD (dinucleótido de molibdopterina citosina) -aldehído deshidrogenasa (ALDH) a ácido acético (Matsushita et al., 2016).

Esta transformación implica dos reacciones bioquímicas: el etanol se transforma primero en acetaldehído en una reacción catalizada por la alcohol-deshidrogenasa y el acetaldehído se transforma en ácido acético por la aldehído-deshidrogenasa. Ambas reacciones implican transferencia de electrones a oxígeno molecular. La actividad de la alcohol-deshidrogenasa de *Acetobacter* es más estable en condiciones de vinificación que la de *Gluconobacter*, lo que puede explicar la mayor producción de ácido acético por parte de *Acetobacter*. La aldehído-deshidrogenasa es más sensible que la alcohol-deshidrogenasa a la concentración de etanol en el medio. Tanto el alcohol como la aldehído-deshidrogenasa se encuentran en la membrana celular con sus sitios activos orientados hacia afuera, y como consecuencia los productos de las reacciones que catalizan generalmente se encuentran en el medio y no dentro de la célula (Guillamón & Mas, 2014).

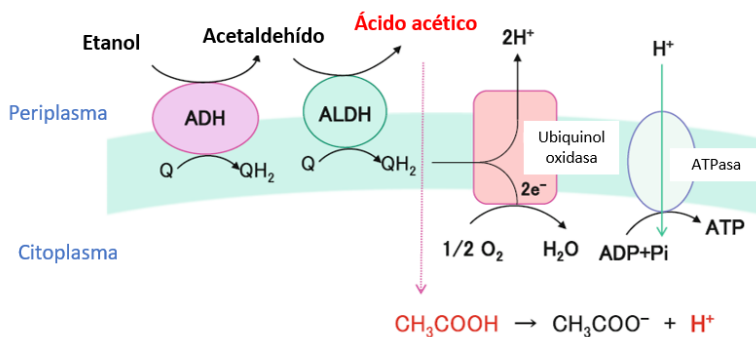


Ilustración 6: Representación sistemática de la cadena respiratoria de las bacterias del ácido acético (Matsushita et al., 2016).

En la ilustración 6 se muestra de manera sistemática el proceso de respiración de las bacterias del ácido acético donde se observa la generación del ácido acético y después se ilustra como el mismo ácido acético producido fuera de la célula pasa fácilmente a través de la bicapa de fosfolípidos de la bacteria y libera un protón en el citoplasma celular, además, la ubiquinol oxidasa ayuda con la generación de agua y como siguiente paso de la cadena respiratoria, la ATPasa transforma el ADP junto con fosfato inorgánico proveniente del medio y usando un protón de la cadena, ATP para los requerimientos energéticos de la célula.

La mayoría de los BAA son capaces de oxidar etanol como sustrato a ácido acético en medios neutros y ácidos (pH 3.0–4.0); sin embargo, estudios indican que el metabolismo de *Gluconacetobacter* también posee la capacidad de oxidar el etanol en ácido acético bajo altas concentraciones de alcohol y condiciones de alta acidez. Por ejemplo, *Gluconacetobacter saccharivorans* puede oxidar etanol a altas concentraciones de alcohol (más del 11.5% v/v) (Li et al., 2015)

Algunas especies de *Komagataeibacter* también están involucradas en la fermentación de vinagre industrial, y son la familia *Acetobacteraceae* más resistente a altas concentraciones de ácido acético, como *Komagataeibacter xylinus*, *Komagataeibacter hansenii*, *Komagataeibacter europaeus*, *Komagataeibacter saccharivorans*, *Komagataeibacter nataicolapos*, etc. (Li et al., 2015).

1.5 Madre del vinagre

En el método estático de producción de vinagre las bacterias del ácido acético están ubicadas en la interfase aire-líquido, donde se crea una biopelícula acumulable en contacto directo con el oxígeno (Valera et al., 2015), esto comienza como una película delgada en la superficie del medio de crecimiento, que se vuelve más gruesa y más gelatinosa con el tiempo, a medida que aumenta el crecimiento bacteriano (Matsushita et al., 2016), se le conoce como “madre del vinagre”, siendo uno de los vehículos principales que funge además como cultivo iniciador en fermentaciones para provocar la acetificación en la producción de vinagre

tradicional (Aykun et al., 2014; Yetiman & Kesmen, 2015). Además, el empleo de este tipo de consorcios produce vinagres de alta calidad, con propiedades organolépticas precisas y específicas, es un proceso lento y costoso, esto debido a que la población bacteriana es heterogénea.

Se le considera un consorcio microbiano debido a la simbiosis existente entre las levaduras y las bacterias que están inmersas en la matriz, la red de celulosa atrapa a las levaduras que producen etanol a partir de la fuente de los carbohidratos, las bacterias lo consumen produciendo ácido acético, algunos otros compuestos y más cadenas de la red, ampliando la matriz para permitir el crecimiento del consorcio (Matsushita et al., 2016).

1.5.1 Morfología y microbiota de la madre del vinagre

Se sabe que de acuerdo con las condiciones en las que se ha mantenido la matriz y su punto de origen, la microbiota inmersa puede ser variable. Yetiman & Kesmen (2015) logró aislar e identificar microorganismos presentes en la matriz de una muestra de madre de del vinagre empleada tradicionalmente, que fueron principalmente de los géneros, *Acetobacter* y *Komagataeibacter*. El género *Komagataeibacter* fue más dominante que el género *Acetobacter* y *K. hansenii* y *K. europaeus*. La especie *A. xylinus* se identificó como especie codominante seguido por *Acetobacter tropicalis* / *Acetobacter indonesiensis*., el 3.4% del total de aislamientos se identificó como *Asaia krungthepensis*.

Wu et al. (2012), en un estudio sobre la microbiota fermentadora de un vinagre tradicional chino demuestra la presencia de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia anomala* y *Candida berkhout spp.* además de bacterias lácticas y BAA (Bacterias del ácido acético). En algunas muestras de vinagres alrededor del mundo se han encontrado bacterias ácido-lácticas, sin embargo, por purificación del producto final, no se recomienda su presencia (Leroy & De Vuyst, 2004; Andres-Barrao & Barja, 2008; Wu J. J., 2012; Matsushita et al., 2016).

1.5.2 Composición, estructura y funcionalidad de la matriz de la madre del vinagre

La celulosa proporciona beneficios biológicos a la microbiota inmersa en la misma, como proporcionar un andamio para el contacto célula-célula, permitir su adherencia a superficies sólidas o ayudar a las bacterias a localizar la interfase aire-líquido (Hoiby, 2014). También puede proporcionar protección contra los productos químicos nocivos y desecación. Las bacterias que viven en esta biopelícula tienen acceso a nutrientes en la fase líquida y también suficiente oxígeno atmosférico. Se ha demostrado que la celulosa mejora el crecimiento de las bacterias, probablemente al promover la unión de las bacterias a la superficie, alejar a los competidores y al retener la humedad y proteger las bacterias contra la luz ultravioleta (Matsushita et al., 2016).

A diferencia de la celulosa extraída de las paredes celulares de las plantas, la celulosa bacteriana (CB) consiste en celulosa pura y no contiene ningún otro polímero (por ejemplo, hemicelulosa, lignina, pectina, etc.) (Pigaleva et al., 2019). Es un biopolímero de pureza relativamente alta, compuesto de β -D-glucosas a través de enlaces β -1,4-glucosídicos (Ilustración 7). Según algunos autores (Hosaku et al., 2017; Nakagaito et al., 2005; Moon et al., 2010) la red de fibras se presenta en nano escala, con una alta capacidad de retención de agua, biodegradabilidad, biocompatibilidad, características no alérgicas ni tóxicas, moldeable, entre otros; lo que se cree puede servir para la producción desde productos textiles, papel, sustitutos optoelectrónicos y hasta aditivo en otros sistemas alimenticios.

Acetobacter xylinum, *Gluconoacetobacter hansenii*, etc., producen dos formas de celulosa: (1) Celulosa I, el polímero en forma de cinta, y (2) Celulosa II, que es una forma de polímero amorfo termodinámicamente más estable. Celulosa I compuesta de cadenas paralelas β -1,4 de glucano que están dispuestas uniaxialmente con las fuerzas de Van der Waals, mientras que las cadenas β -1,4 de glucano de celulosa II están dispuestas de manera aleatoria. En su mayoría son antiparalelas y con una gran cantidad de enlaces de hidrógeno que dan como resultado una forma más estable. En la naturaleza, la estructura de celulosa I se encuentra en formas alomórficas $I\alpha$ o $I\beta$, dependiendo de la disposición de las

cadena entre sí. La celulosa que pertenece a las paredes celulares de las plantas muestra un mayor porcentaje de estructura I β , en comparación con la celulosa de algas y bacterias, que muestra un mayor porcentaje de estructura I α , que parece ser un desplazamiento menos estable. Normalmente, la celulosa de *A. xylinum* presenta características de celulosa altamente cristalina, rica en I α . La estructura microfibrilar de la CB es responsable de la mayoría de sus propiedades, tales como alta resistencia a la tracción, alto índice de cristalinidad y mayor grado de polimerización.

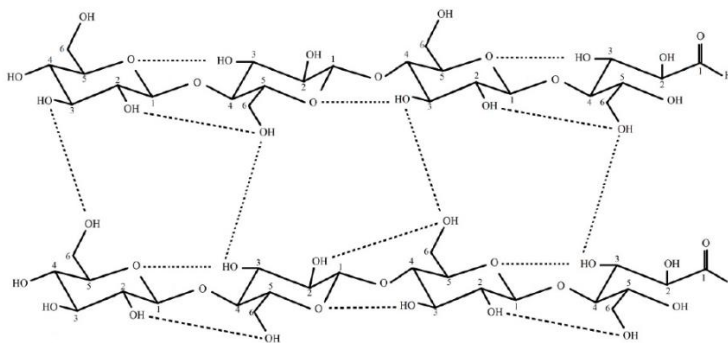


Ilustración 7: Estructura de la celulosa (Esa, Tasirini, & Rahman, 2014).

Para ambas películas CB, la celulosa característica I α e I β se identifica en los gráficos de difracción de rayos X mediante picos a $2\Theta = 14.7^\circ$, 16.3° y 22.6° (Linda Rozenbergaa et al., 2016). Los cristales de celulosas naturales son de tamaño pequeño (<10 nm) en comparación con los típicos sólidos cristalinos como metales o cerámicas. Debido a los pequeños cristales y las variaciones en las estructuras cristalinas dentro de las cadenas de celulosa, los análisis de DRX de la celulosa siempre producen picos de difracción amplios que son difíciles de distinguir de las difracciones de la celulosa amorfa y la dispersión de fondo (Xiaohui J., 2015).

La presencia de cristalinidad en la celulosa es una de las características más importantes que contribuyen a sus propiedades físicas, químicas y mecánicas. El índice de cristalinidad (Crl) es un parámetro comúnmente utilizado para cuantificar la cantidad de celulosa cristalina presente en los materiales celulosicos y también se ha aplicado para interpretar los cambios en las estructuras de celulosa después de tratamientos fisicoquímicos y biológicos. La celulosa cristalina está representada por varios picos intensos en (1 0 0), (1 1 0), (1 0 2), (2 0 0) y (0 0 4) para la celulosa

lβ. Las posiciones y áreas de estos picos pueden elegirse arbitrariamente (Garvey, Parker y Simon, 2005) o calcularse a partir de una estructura cristalina conocida (Ju et al., 2015).

1.5.2.1 Producción de celulosa

Cuando las BAA crecen sin agitación, forman una película superficial de celulosa, en la cual se desarrollan. La celulosa bacteriana (CB) formada no difiere significativamente de la celulosa vegetal; sin embargo, no forma parte de la pared celular, sino que se organiza como una matriz exterior a la pared, donde las bacterias se encuentran incrustadas en una maraña de microfibrillas. Dado que son aerobias estrictas, la capacidad de formar dicha película puede ser un medio para asegurarse la permanencia en la superficie del líquido, donde hay más oxígeno (Gerard, 2015).

El análisis microscópico ha revelado que se produce una única cinta de celulosa a partir de una célula bacteriana. Una sola cinta comprende una estructura ensamblada de microfibrillas de celulosa que se excretan de una fila de sitios sintéticos llamados complejos terminales (TC) ubicados a lo largo de un lado de la célula (Matsushita et al., 2016).

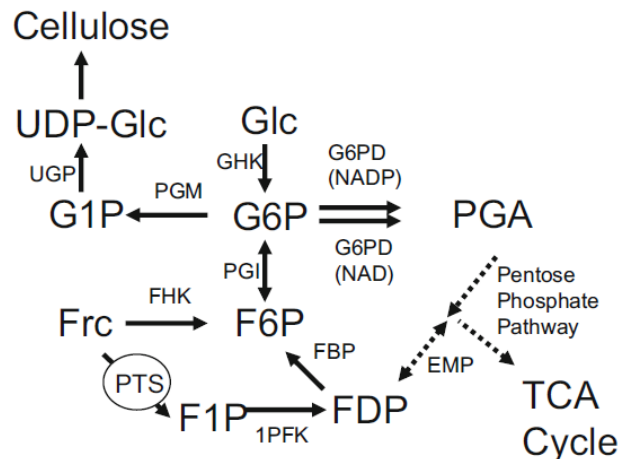


Ilustración 8: Ruta biosintética de producción de celulosa por bacterias del ácido acético (Matsushita et al., 2016).

La Ilustración 8 muestra la ruta biosintética que produce celulosa bacteriana (a partir de glucosa y fructosa). La glucosa es fosforilada por la glucosa hexoquinasa y no por el fosfoenolpiruvato (PEP) dependiente del sistema de fosfotransferasa (PTS). La glucosa-6-fosfato (G6P) resultante se metaboliza a través de la ruta de la pentosa, porque la actividad de la fructosa-6-fosfato (F6P) quinasa, que fosforila F6P a fructosa-1,6-difosfato (FDP), está ausente en las BAA. La G6P se metaboliza a UGP-glucosa (UDPG), el precursor directo de la celulosa. La biosíntesis de UDPG a partir de glucosa es un proceso enzimático de dos pasos que involucra fosfoglucomutasa y UDPGpirofosforilasa. La fructosa se metaboliza tanto por la fructosa hexoquinasa como por PTS (sistema fototransferasa). en F6P (hexoquinasa) o en fructosa-1-fosfato (F1P) a través de PTS. La F6P luego se convierte mediante fosfoglucomutasa en G6P, que posteriormente puede usarse para la síntesis de celulosa o metabolizarse a través de la vía de la pentosa fosfato. F1P se convierte en FDP por la quinasa F1P, y FDP se desfosforila posteriormente en F6P. La FDP también se puede metabolizar a través de la vía Embden-Myerhoff (EMP). La actividad de la fosfoglucosa isomerasa, que convierte F6P en G6P es muy alta en un medio de fructosa en comparación con un medio de glucosa.

Aykun, Budak, & Guzel-Seydim (2014) determinaron los componentes bioactivos de la Madre del vinagre generada durante la producción de varios vinagres, encontrando que junto con la fermentación acética, las BAA generan compuestos como ácido gálico, ácido clorogénico, catequina y ácido cafeico, lo cual dependen del tipo de sustrato que se utilice para la producción del vinagre.

Son pocos los estudios referentes a la caracterización de la madre del vinagre y su importancia en la producción y mantenimiento de los microorganismos por lo que a continuación se describen algunas pruebas que podrían ser de utilidad para su esclarecimiento.

1.5.3 Generalidades del secado

Al buscar realizar un estudio de la matriz que contiene al inóculo, y con el conocimiento de que se empleará un estudio de secado para evaluar la difusividad

de humedad a través del cuerpo de dicha matriz, se muestra a continuación la información teórica necesaria para entrar en tema.

Los alimentos generalmente se secan para eliminar la humedad hasta un cierto nivel en el cual se minimizan el deterioro microbiano y las reacciones químicas deteriorantes, se requiere una determinación precisa de los coeficientes de difusión y transferencia convectiva para facilitar diseños precisos de secado, la difusión de agua dentro del producto se considera generalmente el factor de control, muy a menudo descrito por un mecanismo de difusión basado en la segunda ley de Fick (Arranza et al., 2017; Banga & Singh, 1994; Ruiz-López et al., 2012).

Al calentar al producto por convección, el calor penetra hacia el interior del alimento a través de la superficie principalmente por conducción, mientras que la humedad debe salir a través de ella, por lo que el gradiente de temperatura es contrario al gradiente de humedad (Contreras Monzón, 2006). En consecuencia, únicamente se produce el secado o la reducción del contenido en agua cuando el interior ha alcanzado suficiente temperatura para que nuevamente emigre la humedad hacia la superficie y, finalmente, al exterior.

Para el secado de alimentos líquidos o sólidos se tiene el mismo comportamiento, inicialmente un material húmedo con cierto tamaño puede tener un alto contenido de humedad (X_0). Con la evaporación del agua libre en la superficie, ocurre un encogimiento visible, hasta que una estructura sólida es formada con un contenido de humedad promedio (X), el contenido de humedad está distribuido en el interior del cuerpo, pero el agua puede ser transportada del interior a la superficie (interfase) por mecanismos de difusión. La relación del agua promedio contenida en el sólido contra el tiempo es conocida como la curva de secado; es dividida en el periodo de velocidad de secado constante (primer periodo) marcado en tiempo (t_c) y el periodo de velocidad de secado decreciente (segundo periodo) con el contenido de humedad crítica X_c separando los dos periodos, marcado en tiempo (t_e) como se observa en la Ilustración 9.

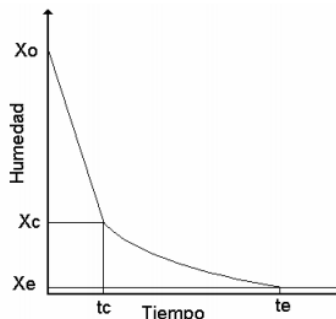


Ilustración 9: Curva clásica de secado.

El estudio de estos fenómenos de transmisión de calor y materia, precisa de la cuantificación de los flujos que ocurren durante el secado y, frecuentemente, del uso de modelos cinéticos que permitan predecir la evolución del proceso, lo cual puede llegar a ser de gran ayuda en el diseño y optimización de la operación a nivel industrial, en cambio, para cuestiones de investigación como es el caso de este trabajo de investigación, como apoyo para la evaluación de la matriz conocida como madre del vinagre siguiendo la metodología que se describe en el capítulo siguiente.

1.5.3.1 Difusividad

La transferencia de masa juega un papel clave en la creación de condiciones favorables para que los reactivos en un sistema se unan físicamente, permitiendo que ocurra una reacción particular. Una vez que los reactivos están cerca de un sitio particular, la reacción procederá a una velocidad óptima. En estas circunstancias, podemos encontrar que la reacción está limitada por el movimiento de los reactivos al sitio de reacción, o el movimiento de los productos finales fuera del sitio de reacción. En otras palabras, la reacción está limitada por transferencia de masa, en lugar de estar limitada por la cinética de la reacción. Esta y otras razones son por las que en sistemas complejos como son los consorcios microbianos se puede considerar como un parámetro importante el conocer el valor de estos parámetros y generar una aproximación sobre la influencia de las estructuras producidas por los microorganismos, en los procesos de fermentación.

Para que se considere como un mecanismo difusivo la migración de la humedad del sistema durante un proceso de secado, los valores de difusión deben ser menores a 10^{-7} m²/s. De lo contrario se podría considerar un sistema de efusión, entre otros.

Parte de la eliminación de humedad de un alimento ocurre durante un período de secado a velocidad de caída. Este período de secado comienza en el contenido crítico de humedad, X_c , y continúa hasta que el contenido de humedad disminuye hasta el contenido de humedad de equilibrio, X_e . Durante este período de secado, la temperatura del producto comienza a aumentar a magnitudes superiores a la temperatura del bulbo húmedo, y la difusión de la humedad desde la estructura interna del producto se convierte en un factor que controla la velocidad. Además, las expresiones utilizadas para describir el proceso de difusión de humedad dependen de la forma del producto. Para una geometría de placa infinita, el período de secado con velocidad de caída se describe de la siguiente manera (considerando un solo término de la solución analítica):

$$\Psi = \frac{X - X_e}{X_0 - X_e} = \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n-1)^2} \exp\left(-\frac{(2n-1)^2 \pi^2 Dt}{4L^2}\right) \quad (1)$$

donde L es la mitad del espesor como dimensión característica para la geometría de placa (m), D es el coeficiente de difusión aparente del agua (m²/s), Y es la fracción de humedad libre (adimensional) y t es el tiempo (s). Las expresiones correspondientes para las geometrías de un cilindro infinito y una esfera son, respectivamente (Ruiz-López & García-Alvarado, 2007):

$$\Psi = \frac{X - X_e}{X_0 - X_e} = 4 \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{\lambda_n^2} \exp\left(-\frac{\lambda_n^2 Dt}{R^2}\right) \quad (2)$$

$$\Psi = \frac{X - X_e}{X_0 - X_e} = \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \exp\left(-\frac{n^2 \pi^2 Dt}{R^2}\right) \quad (3)$$

donde R es el radio (m) y λ_n es la enésima raíz positiva de la función

$$J_0(\lambda_n) = 0 \quad (4)$$

siendo J_0 la función de Bessel de primera clase de orden cero.

El parámetro clave en las tres ecuaciones de predicción para el período de secado con tasa de caída es la difusividad de masa efectiva para el movimiento de humedad dentro de la estructura del producto. La magnitud de esta propiedad se acercará a un valor para la difusión del vapor de agua en el aire, pero estará influenciada por la estructura del producto (Singh & Heldman, 2009).

2. METODOLOGÍA

Para cumplir con los objetivos planteados, se establece la siguiente metodología de acuerdo con el siguiente diagrama general de trabajo:

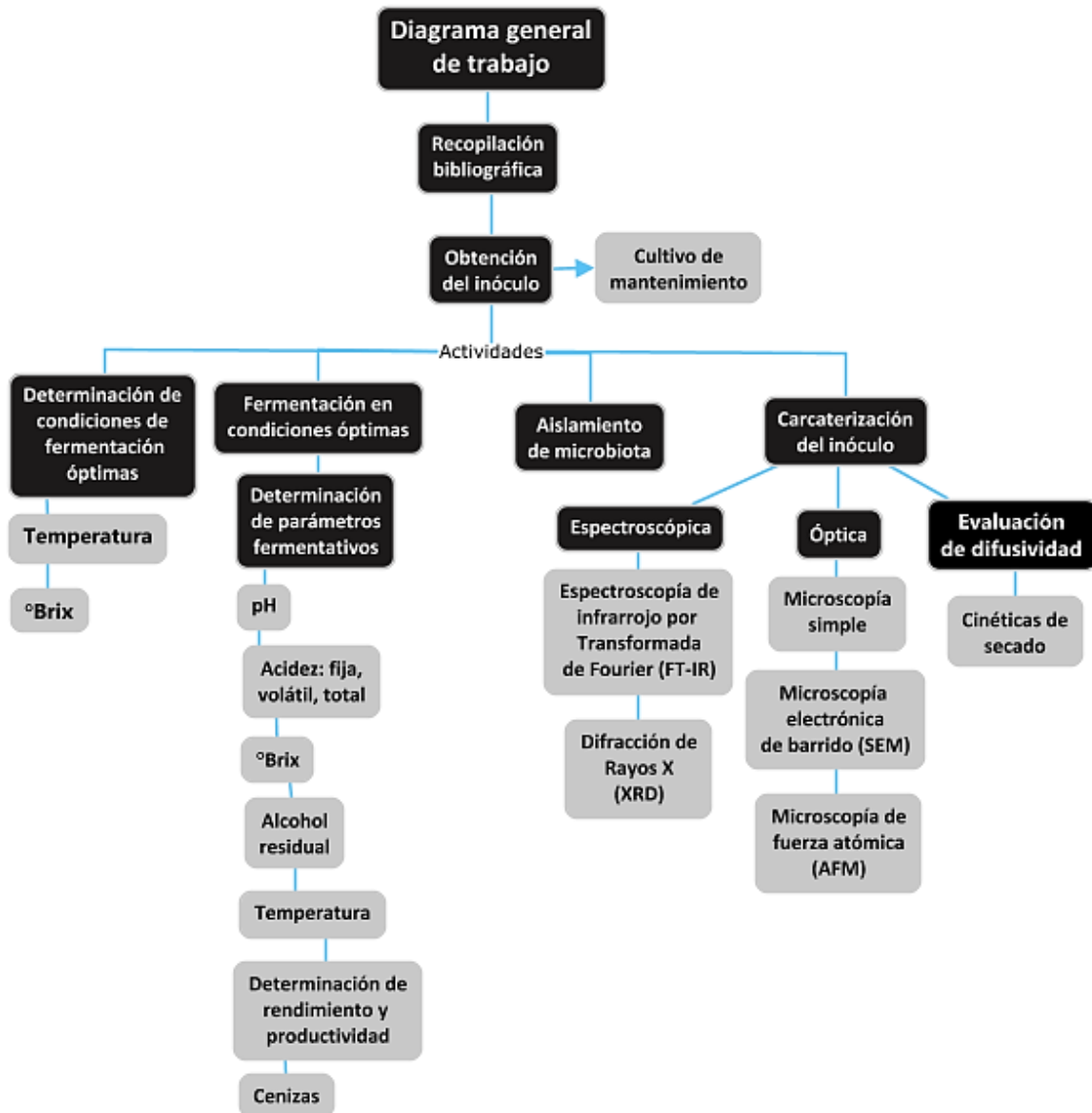


Ilustración 10: Diagrama general de trabajo. Metodología.

2.1 Recopilación bibliográfica

Se investigó y recopiló información de los temas necesarios a lo largo de todo el proyecto para complementar los puntos de este trabajo de investigación a partir de documentos diversos (libros, artículos científicos, tesis, etc.).

2.2 Obtención del inóculo

El inóculo se obtuvo del utilizado en fermentaciones domésticas. La madre del vinagre en inicios de su acumulación se muestra como una película flotante en el medio de fermentación, generalmente de manera opaca, conforme esta se va engrosando aumenta el aspecto gelatinoso y tiende a volverse más cristalina, al no establecer una estructura ordenada en cuanto a su acumulación de manera macroscópica, esta tomará la forma del recipiente en que se encuentre.

2.2.1 Cultivo de mantenimiento

Se mantuvo el inóculo bajo condiciones de cultivo en que se conservaban de manera corriente para asegurar su apto desarrollo de la matriz y la microbiota, empleando panela como sustrato y a temperatura ambiente en un recipiente cerrado.

2.3 Determinación de las condiciones óptimas de fermentación

Para poder identificar las condiciones que favorecen la fermentación acética por el inóculo empleado, se llevaron a cabo fermentaciones con diferentes condiciones, específicamente de concentración de sustrato y temperatura (de acuerdo a las condiciones artesanales y a lo reportado en la bibliografía) (Budhiono et al., 1999; Casner, 2005; Ching-Ting et al., 2018; López-Rojo et al, 2017), monitoreándose a lo largo de las mismas, los parámetros que nos permitan valorar la producción de

ácido acético con respecto al tiempo y detener la fermentación, las condiciones son las siguientes:

- Inóculo al 7.5% peso/volumen (peso en húmedo), previamente lavar con agua purificada, para no tener ingreso de material ya fermentado al sistema y escurrir (Catalán-Garrido & García-Guerra, 2016; López-Rojo et al., 2017).
- Concentración inicial de sustrato: panela (piloncillo) verificada por el valor de sólidos solubles a 8 y 15°Bx, las mediciones se harán empleando un refractómetro manual.
- Temperatura de fermentación a 22°C (ambiental aproximada) y 29°C por reporte de bibliografía (Guillamón & Mas, 2014; Catalán-Garrido & García-Guerra, 2016; Ho et al., 2017).
- Agua purificada para preparar la solución de piloncillo (500 mL).
- Tiempo: La fermentación se estuvo monitoreando con respecto a los diferentes parámetros a evaluar y en base a los valores de ácido acético, deteniéndose de acuerdo con los mismos.

Parámetros determinados a lo largo de las fermentaciones (por triplicado): Las evaluaciones de acidez para vinagres se realizaron con base al compendio de normas para vinagre de la Organización internacional de la viña y el vino (2018); y tomando valores de referencia por la norma española de calidad para la elaboración y la comercialización de los vinagres (2012).

°Brix: Determinación de sólidos solubles empleando un refractómetro de mano (CIVEQ-4013) con escala a grados °Brix, colocando una gota y mirando la escala por el ocular a contraluz.

Acidez total: Se denomina acidez total de un vinagre a la acidez valorable en presencia de fenoltaleína en solución alcohólica, como indicador. En un matraz Erlenmeyer de 250 ml, introducir 10 ml de vinagre. Adicionar agua recientemente

hervida y fría para que la solución esté apenas coloreada. Añadir algunas gotas del indicador y valorar con la solución de hidróxido de sodio 0.5 M hasta coloración rosa persistente; donde: V el volumen de la solución de hidróxido de sodio utilizado en la valoración (ml).

$$A_T = 3V \quad (1)$$

Acidez fija: Se denomina acidez fija de un vinagre al conjunto de sus ácidos fijos (no volátiles), valorados en presencia de fenolftaleína en solución alcohólica como indicador, por el tipo de sistema, se considera al ácido láctico como al compuesto principal para la acidez fija. En una cápsula de porcelana de 200 ml, introducir 10 ml de vinagre. En un baño de agua a 100°C, evaporar a sequedad. Añadir de 5 a 10 ml de agua y evaporar de nuevo a sequedad. Repetir esta operación cinco veces. Adicionar 180 ml aproximadamente de agua recientemente hervida y fría, añadir algunas gotas del indicador y valorar con la solución de hidróxido de sodio 0.1 N hasta coloración rosa persistente. Donde: V el volumen de la solución de hidróxido de sodio utilizada en la valoración (ml).

$$A_F = 0.6V \quad (2)$$

Acidez volátil: Se denomina acidez volátil de un vinagre a la diferencia entre la acidez total y la acidez fija. Esto debido a que los ácidos orgánicos volátiles más comunes son el ácido acético, ácido fórmico, ácido málico, ácido propiónico; pero por la naturaleza y origen de la fermentación se descarta la presencia de algún otro que no sea el acético para este sistema. Donde: A_T el contenido en acidez total (g de ácido/L) y A_F el contenido en acidez fija (g de ácido/L).

$$\text{Acidez volátil} = A_T - A_F \quad (3)$$

Para determinar las diferencias entre los experimentos de esta prueba se realiza un análisis estadístico por comparación de medias mediante un ANOVA por método

de Tukey, con IC 95% y $\alpha=0.05$. Este análisis se realizará en lo concerniente a los valores de acidez total, fija y volátil.

2.4 Fermentación en condiciones óptimas

Una vez establecidas las condiciones óptimas de concentración de sustrato y temperatura se realizaron pruebas de fermentación por duplicado a mayor escala (4 litros) y se llevaron a cabo el seguimiento de estas.

2.4.1 Determinación de parámetros fermentativos

Cada prueba de fermentación llevó un seguimiento diario midiendo los parámetros que se mencionan a continuación, cada valor debe tomarse por triplicado., se miden los parámetros mencionados en el punto anterior (°Brix, acidez total, acidez fija, acidez volátil), además:

Densidad de la muestra (D) determinado por método del picnómetro (Dirección General de Normas, 1981) Donde: m es la masa de la muestra (g) y V el volumen de la misma (mL):

$$D = m/V \quad (4)$$

Los valores de azúcares reductores directos y azúcares reductores totales determinados en base a la metodología de la norma NMX-F-312-1978. DETERMINACIÓN DE REDUCTORES DIRECTOS Y TOTALES EN ALIMENTOS. METHOD OF TEST FOR TOTAL AND DIRECT REDUCING SUBSTANCES IN FOOD. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.

En los reactivos del método se tiene reactivo Fehling A (Solución sulfato de cobre) siendo el compuesto principal para que se lleve a cabo la reacción donde en presencia del compuesto reductor y a una temperatura aproximada de 75°C se produce Óxido de cobre para después precipitarse y observarse un cambio de color

de azul a rojo ladrillo; y Fehling B (NaOH 40% y tartrato de sodio-potasio) la cual sirve para estabilizar la reacción y evitar que al mezclarse las soluciones A y B, se produzca de manera inmediata Hidróxido cúprico y genere un error en la prueba.

Para realizar la medición es necesario preparar una solución de azúcar invertido al 1% P/V, la cual se obtiene pesando 9.5 g de sacarosa y disolviendo en 50 ml de agua, añadir 5 mL de HCl concentrado y diluyendo con agua a 100 ml, se guarda por algunos días a temperatura ambiente y después de la inversión se completa volumen a 1000 ml.

Se procede a una titulación donde se neutralizan 10 ml de disolución de azúcar invertido con hidróxido de sodio 1N, en un matraz volumétrico de 100 ml y se completa el volumen con agua, transferir a una bureta y titular contra una solución caliente de 50 mL de agua destilada con 5mL de solución A y 5 mL de solución B, una vez observado el primer cambio de color, añadir 1 ml de azul de metileno al 0.2% y se detiene la titulación al observar la reducción total del cobre observando una coloración naranja, registrar el gasto y calcular el título de la disolución mediante la fórmula (9) esperando el valor en un rango de 0.0505 a 0.0525.

$$\text{Título de la disolución} = \text{mL de gasto} * \text{Concentración de la solución} \left(\frac{\text{g}}{\text{ml}}\right) \quad (5)$$

Azúcares reductores directos: Medir 10 mL de la muestra y añadir a un matraz Erlenmeyer de 250 mL, añadir 100 mL de agua y agitar para disolver la muestra; añadir el reactivo secuestrante necesario para sedimentar impurezas (0.5 g de Óxido de Aluminio) y aclarar la solución, filtrar, transferir a una bureta y titular contra una solución caliente de 50 mL de agua destilada con 5mL de solución A y 5 mL de solución B, registrar el gasto y calcular con la fórmula (9).

Azúcares reductores totales: Medir 10 mL de la muestra y añadir a un matraz Erlenmeyer de 250 mL, añadir 100 mL de agua y agitar para disolver la muestra; añadir el reactivo secuestrante necesario para sedimentar impurezas y aclarar la solución, filtrar y lavar el matraz 3 veces con 20 mL de agua cada una, añadir 10 mL de ácido clorhídrico concentrado y calentar a 65°C durante 15 minutos, dejar

enfriar para poder neutralizar con hidróxido de sodio 1N y completar volumen con agua, transferir a una bureta y titular contra una solución caliente de 50 mL de agua destilada con 5mL de solución A y 5 mL de solución B, registrar el gasto y calcular con la fórmula (10).

$$\%Azúcares\ reductores = \frac{25000*T}{V*P} \quad (6)$$

Donde T =Título de la disolución en gramos de azúcar invertido, V =Volumen de la disolución problema, empleado en la titulación de 10 ml; y P =Peso de la muestra en gramos.

Alcohol residual: A partir de una muestra de un litro del líquido restante de las pruebas de la fermentación, colocar a ebullición para separación por fases en un rotavapor Heidolph Hei-VAP digital a 39°C bajo condiciones de vacío y separar hasta verificar que se detenga la separación; medir valor final y sacar en proporción al líquido inicial.

Determinación de cenizas: Según la norma NMX-F-066-S-1978 DETERMINACIÓN DE CENIZAS EN ALIMENTOS. FOODSTUFF DETERMINATION OF ASHES. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS. Para ello en un crisol a peso constante, se coloca una muestra de 3 a 5 g, esto procederá a quemarse lentamente en una parrilla hasta que la muestra no desprenda humos, una vez realizado esto, se llevará a calcinación total en una mufla (FURNACE 48000, Barnstead Thermolyne), por último, se dejará enfriar y se pasará a un desecador para después determinar la masa final del crisol con cenizas. El resultado se calcula utilizando la siguiente fórmula:

$$\%Cenizas = \frac{(P-p)*100}{M} \quad (7)$$

Donde P es la masa del crisol con cenizas, p es la masa de crisol vacío y M es la masa original de la muestra, todos en gramos.

2.4.2 Evaluación de rendimiento

A partir de los resultados que se obtuvieron de los valores finales de acidez y la concentración de panela adicionada, el rendimiento se calcula utilizando:

$$Rendimiento = \frac{g_{producto}}{g_{reactivo}} = \frac{C_{AA}V_{RX0}}{C_{PAN}V_{RX0}} = \frac{g_{AA}}{g_{PAN}} \quad (8)$$

Donde C_{AA} Y C_{PAN} son las concentraciones en gramos por litro de ácido acético y panela respectivamente, mientras que V_{RX0} es el volumen de reacción inicial en litros. Tomando en cuenta que la panela no es un sustrato puro, es necesario llevar a cabo una medición que permita establecer una equivalencia promedio de la sacarosa que esta contiene, por lo que se procederá a medir la cantidad de sacarosa que contienen distintas muestras de panela por método Lane-Eynon (Método usado para medir azúcares reductores) para así utilizar un gráfico que permita establecer una ecuación de la recta que permita hacer el cálculo de equivalencia, lo que cambiaría la ecuación de cálculo de rendimiento quedando de la siguiente forma:

$$Rendimiento = \frac{g_{producto}}{g_{reactivo}} = \frac{g_{AA}}{g_{SAC}} \quad (9)$$

Para calcular el rendimiento de biomasa seca generada de manera aproximada en el sistema, recordando que esta incluye la producción de la matriz en general, es decir, tanto de microbiota como de celulosa, se utiliza la siguiente fórmula:

$$Rendimiento_{biomasa} = \frac{g_{biomasa\ seca}}{g_{reactivo}} = \frac{m_{pf}(1-Y_f) - m_{p0}(1-Y_0)}{C_{SAC}V_{RX0}} \quad (10)$$

Donde m_{pf} y m_{p0} se refieren a la masa seca de la matriz después de un proceso de secado mediante una estufa de convección, antes y después de la fermentación respectivamente; y Y_f y Y_0 son las fracciones de humedad de la matriz antes y después de la fermentación respectivamente.

2.4.3 Evaluación de productividad

Para el cálculo de la productividad de producto se emplea la siguiente fórmula:

$$Productividad = \frac{g_{producto}}{Tiempo} \quad (11)$$

Pero al obtenerse valores específicos para cada punto de la fermentación, es necesario generar una curva donde se registren los valores de masa de ácido acético contra el tiempo para cada punto y empleando la siguiente fórmula:

$$\frac{\Delta m_{AA}}{\Delta t} = \frac{m_{AAf} - m_{AA0}}{t - t_0} \quad (12)$$

Donde m_{AAf} y m_{AA0} son la masa de ácido acético al final y al inicio de la fermentación respectivamente, se puede calcular una productividad general para el sistema.

2.5 Aislamiento de microorganismos

2.5.1 Toma de muestra

Para el aislamiento de los microorganismos de la madre del vinagre, sembrar por extensión en placa, 100 μ L del líquido en el que se encuentra inmersa la matriz. La suspensión se absorbe en el agar, dejando las células microbianas sobre la superficie (Normas Oficiales Mexicanas, 1994).

2.5.2 Aislamiento de bacterias

La temperatura óptima para el crecimiento de las bacterias del ácido acético es de 25°C a 30°C. Existe una categoría de especies poco comunes que incluso pueden oxidar el etanol de 38°C a 40°C, sin embargo, no es lo recomendable para procesos simultáneos junto con fermentación alcohólica (Ho, 2016). El medio GEY (2% glucosa, 5% etanol, 1% extracto de levadura), que puede ser usado como caldo de enriquecimiento y como medio sólido con el agregado de 1,5% de agar (Gerard, 2015), se modifica para agregar carbonato de calcio (CaCO_3) al medio GEY convierte a estos últimos en medios diferenciales para BAA, ya que pone en evidencia el metabolismo de la fuente de carbono (glucosa, etanol respectivamente) con producción de ácido acético, el cual disuelve el CaCO_3 , formando un halo transparente alrededor de la colonia (Budhiono et al., 1999; Bahavna & Satish, 2014; Gerard, 2015).

Tomando en cuenta lo anteriormente descrito, se llevó a cabo el aislamiento de las BAA bajo las siguientes condiciones de cultivo:

Cultivo en medio GEY con proporciones distintas de etanol para hacerlo más selectivo

- GEY (2% glucosa, 5% etanol, 1% extracto de levadura, 2% agar, 0.12% CaCO_3) (MCD-LAB).
- GEY 20 (2% glucosa, 20% etanol, 1% extracto de levadura, 2% agar, 0.12% CaCO_3) (MCD-LAB).

En cultivos por estría cruzada en dilución, incubados a 29°C por 24 – 48 h, dando seguimiento al aislamiento mediante observación microscópica con tinciones de Gram y con resiembras periódicas.

2.5.3 Aislamiento de levaduras

Se utilizará Agar Papa Dextrosa (Potato Dextrose Agar, PDA, por sus siglas en inglés) (MCD-LAB) siendo un medio de propósito general para levaduras y mohos;

y agar Suero de Naranja (MCD-LAB) que se emplea para el cultivo de microorganismos acidúricos asociados con el deterioro de productos en un entorno de laboratorio. Las placas se incuban por 24 – 48 h a 29°C dando seguimiento al aislamiento mediante observación microscópica con tinciones de Gram.

Tinción de Gram. Después de cada siembra realizar una tinción de Gram para observar la distribución y morfología microscópica de al menos 5 colonias. La pared celular de las bacterias Gram negativas está constituida por una capa fina de peptidoglicano y una membrana celular externa, mientras que las bacterias Gram positivas poseen una pared celular gruesa constituida por peptidoglicano, pero no cuentan con membrana celular externa (López-Jacome, 2014). Se coloca en un portaobjetos una gota de agua, se toma una pequeña cantidad de la colonia seleccionada con un asa estéril para hacer un frotis, una vez secada y fijada la muestra, proceder a la tinción: teñir 1 minuto con cristal violeta y enjuagar, colocar Lugol como fijador durante 1 minuto y enjuagar, decolorar con alcohol cetona y enjuagar, posteriormente teñir con safranina durante 15 s y enjuagar. Una vez secas las tinciones, se procede a la observación microscópica a 100x con aceite de inmersión.

Se seleccionaron las colonias pertinentes para continuar con el aislamiento y así sucesivamente hasta llegar a la purificación de estas.

2.6 Caracterización óptica y espectroscópica del inóculo

2.6.1 Obtención y preparación de las muestras

Seguir las condiciones óptimas de cultivo hasta obtener una matriz con crecimiento de 3 cm de grosor. Cortar en 3 secciones desde la parte inferior a la superior, nombradas fondo, centro y superficie, respectivamente. Lavar las piezas continuamente con agua purificada hasta observar cristalina el agua de lavado, para eliminar la posible presencia de azúcares y ácidos orgánicos residuales; secar completamente a 110 ° C durante 1 día (Rubio-Fernández et al., 2004; Wu et al., 2012; Li et al., 2015 López-Rojo et al., 2017).

2.6.2 Microscopía óptica simple

Para realizar la observación y distribución de los microorganismos que están embebidos en la madre del vinagre, se tomaron muestra con un asa estéril de siembra a diferentes niveles de la matriz (fondo, centro y superficie), además del líquido en el que se encuentra inmersa ésta y se realizaron frotos para su posterior tinción de Gram. La observación se realizará en un microscopio biológico VE-B1 VELAB MICROSCOPES a 100X con aceite de inmersión.

2.6.3 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Para este análisis de espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier se usó un espectrofotómetro marca BRUKER modelo VERTEX 70, operando en el infrarrojo medio (4000-400 cm^{-1}) y se utiliza el accesorio ATR, colocando únicamente una pequeña porción de las muestras en el detector, posteriormente se analizaron los espectros empleando referencias a números de onda encontrados en la literatura para los enlaces correspondientes a la composición del consorcio (Yang et al., 2013; Vazquez et al., 2013).

2.6.4 Difracción de rayos X

Para este análisis de difracción de rayos X, utilizar un difractómetro BRUKER modelo 8D Discover con radiación $\text{CuK}\alpha_1$ y detector ocular de lince. Analizar en un rango de 5-89 ° con un tamaño de paso de 0.04 y una velocidad de exploración de 0.6 segundos. Pulverizar las muestras en un mortero de ágata. La celulosa cristalina está representada por varios picos intensos en (1 1 0 p), (1 1 0), (2 0 0) y (0 0 4) para el pico amorfo (Ju et al., 2015) El índice de cristalinidad (o cristalinidad aparente (%)) se calcula utilizando la ecuación:

$$X = \frac{I_{110p} + I_{110} + I_{200}}{I_{110p} + I_{110} + I_{200} + I_{am}} \times 100 \quad (13)$$

Donde, I_{110p} , I_{110} e I_{200} son la intensidad máxima cristalina de los planos (110p), (110) y (200), e I_{am} es la intensidad máxima amorfa. Aplicar el método de deconvolución (ajuste de curva) para encontrar las áreas de pico individuales. La deconvolución se realiza utilizando el software PeakFit v4.12 (AutoFit Peaks II Deconvolution, Baseline Linear D2) (Hosakun et al., 2017). El tamaño del cristal se determina utilizando la ecuación de Scherrer de la siguiente manera:

$$\tau = \frac{K\lambda}{\beta_{\tau} \cos\theta} \quad (14)$$

Donde τ es el tamaño del cristal, K es el factor de forma (0.9), λ es la longitud de onda de los rayos X (0.15418 nm), β_{τ} es el ancho completo a la mitad de la altura máxima y θ es el ángulo de Bragg, el cual se obtiene del equipo de medición (Rozenberga et al., 2016).

2.6.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para la microscopía electrónica de barrido se usó un microscopio JEOL modelo JSM-6610LV con filamento de tungsteno. Se analizó en alto vacío a 20 kV. Las muestras se montan en cinta de carbón y se recubren con oro. Para el mapeo EDX, el tiempo de exploración es de 180 segundos con una amplificación de 500x, la observación de diferentes campos debe realizarse en al menos 3 campos diferentes con zonas elegidas de manera aleatoria y a diferentes escalas (Bahavna & Satish, 2014).

2.6.6 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Para la microscopía de fuerza atómica se utilizó un microscopio de la marca JEOL modelo JSPM-5200 en modo sin contacto y punta tipo voladizo, la velocidad de exploración fue de 166,67 μ s y un área de 206x206 nm. La muestra se monta en una oblea de silicio monocristalino con orientación específica en la dirección 100.

Se procede a la medición por análisis topográfico y se establecen marcadores de medición en caso de requerirse (Juniao & Shaoping, 2019)

2.7 Evaluación de difusividad másica del agua en la estructura polimérica

A 30°C, en una solución acuosa de panela al 15%, se cultivó una pequeña porción de la estructura generada por el consorcio previamente obtenida de experimentos de 6 semanas, esto en un recipiente previamente sanitizado y de amplias dimensiones buscando formas de placas planas, agregando 20 ml de agua purificada diariamente y cada semana una porción de aproximadamente 10 g de panela, hasta obtener un espesor de aproximadamente 1 cm. Se corta en placas de 10 cm de largo por 5 cm de ancho.

Las muestras resultantes se someten a secado por convección a temperaturas de aire de 45, 60 y 75 °C, realizando una prueba tomando el peso de la muestra de manera continua bajo una escala de tiempo creciente. Mientras tanto, la contracción del producto se determina midiendo los cambios en el espesor del producto con un micrómetro durante pruebas adicionales realizadas en las mismas condiciones que anteriormente. La temperatura se debe corroborar cada 10 min.

La solución correspondiente para el contenido medio de humedad promedio expresado de forma adimensional en una geometría de placa plana está dado por la ecuación (1).

Si se considera un solo término de la sumatoria en la ecuación (1) esta se vuelve:

$$\Psi = \frac{X - X_e}{X_0 - X_e} = \frac{8}{\pi^2} \exp\left(-\frac{\pi^2 Dt}{4L^2}\right) \quad (19)$$

La derivada de la ecuación (19) produce:

$$\frac{d\Psi}{dt} = -\frac{\pi^2 D}{4L^2} \Psi \quad (20)$$

El coeficiente de difusión del agua en el sólido se calcula arreglando a la ecuación (20) como

$$D = -\frac{4L^2}{\pi^2\Psi} \frac{d\Psi}{dt} \quad (21)$$

El término dY/dt se evalúa utilizando la fórmula para datos desigualmente espaciados (Chapra & Canale, 2007):

$$f'(x) = f(x_{i-1}) \frac{2x - x_i - x_{i-1}}{(x_{i-1} - x_i)(x_{i-1} - x_{i+1})} + f(x_i) \frac{2x - x_{i-1} - x_{i+1}}{(x_i - x_{i-1})(x_i - x_{i+1})} + f(x_{i+1}) \frac{2x - x_{i-1} - x_i}{(x_{i+1} - x_{i-1})(x_{i+1} - x_i)} \quad (15)$$

Una vez calculada la difusividad para cada punto, se procede a ocupar una fórmula que permite conocer el valor de difusividad promedio D_{prom} en el proceso de secado que es:

$$D_{prom} = \frac{\int_{\psi_1}^{\psi_2} D d\Psi}{\psi_2 - \psi_1} \quad (16)$$

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación de condiciones óptimas de fermentación

3.1.1 Fermentación de referencia

Los resultados de la prueba control a temperatura ambiente y un valor de 8° Brix como valores de referencia indicados por bibliografía (Budhiono et al., 1999; Casner, 2005; Ching-Ting et al., 2018; López-Rojo et al., 2017), muestra una producción mínima de ácido acético, estos valores se pueden observar en la Tabla 3 (los resultados muestran el promedio del triplicado de las pruebas y su desviación estándar).

Tabla 3: Resultados de las mediciones de los parámetros para la fermentación de referencia.

Día	pH	°Brix	Acidez total (g/L)	Acidez fija (g/L)	Acidez volátil (g a.a./L)
0	5.02 ± 0.0	8.00 ± 0.0	0.25 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.02
1	4.68 ± 0.02	7.50 ± 0.0	0.60 ± 0.05	0.37 ± 0.03	0.23
2	4.31 ± 0.01	7.00 ± 0.1	0.95 ± 0.03	0.46 ± 0.03	0.49
5	3.32 ± 0.02	5.33 ± 0.06	1.80 ± 0.05	0.76 ± 0.06	1.04
8	3.21 ± 0.01	3.33 ± 0.1	2.80 ± 0.03	0.93 ± 0.05	1.87
12	3.48 ± 0.03	2.03 ± 0.06	3.15 ± 0.05	1.11 ± 0.05	2.04
14	3.14 ± 0.01	1.53 ± 0.06	3.35 ± 0.03	1.18 ± 0.06	2.17
16	3.32 ± 0.02	1.46 ± 0.06	3.65 ± 0.03	1.48 ± 0.06	2.17

Se alcanza una acidez total y volátil máximas de 3.65 g/L y 2.17 g a.a./L, respectivamente estos no alcanzan los valores indicados por la NMX-F-122-1968. ALIMENTOS PARA USO HUMANO. CALIDAD PARA VINAGRE ENVASADO PARA CONSUMO PÚBLICO. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS. La Ilustración 11 muestra la cinética de producción del ácido acético como acidez volátil con respecto al tiempo, de la información de la tabla y de la ilustración se puede observar que es en los días 2 a 8 que se efectúa la mayor producción de acidez tanto total como volátil con su correspondiente descenso en los °Brix, en los días 14 a 16 ya no se observa aumento de la acidez volátil ni disminución significativa de °Brix por lo que la fermentación se detuvo en ese momento.

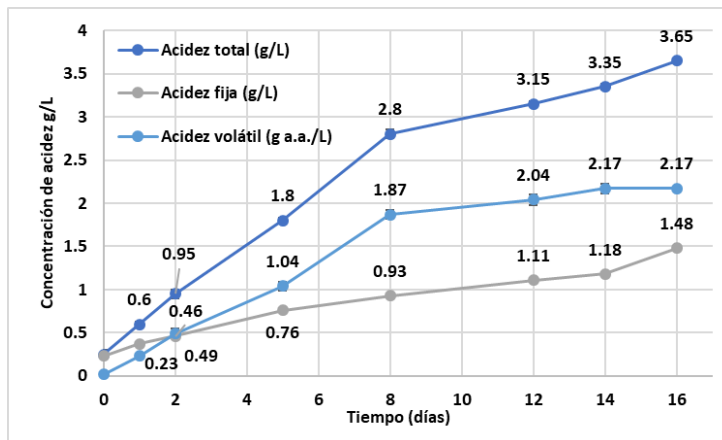


Ilustración 11: Comportamiento de parámetros de acidez de la fermentación de referencia.

3.1.2 Prueba de fermentación: modificación de °Brix

Se realizó modificación en el valor de °Brix a 15, que es el sugerido por algunas referencias como concentración óptima de azúcares sin sobrepasar el valor límite de tolerancia de mediciones microorganismos. La Tabla 4 (los resultados muestran el promedio del triplicado de las pruebas y su desviación estándar) y la Ilustración 12 muestran los resultados experimentales obtenidos.

Tabla 4: Resultados de las de los parámetros de acidez en la prueba con modificación de °Brix

Día	pH	°Brix	Acidez total (g/L)	Acidez fija (g/L)	Acidez volátil (g a.a./L)
0	5.36 ± 0.1	15.00 ± 0.0	0.90 ± 0.0	0.76 ± 0.06	0.14
1	4.59 ± 0.2	13.53 ± 0.06	1.30 ± 0.06	0.97 ± 0.03	0.33
4	3.5 ± 0.0	11.83 ± 0.06	3.65 ± 0.03	1.89 ± 0.09	1.76
6	3.32 ± 0.1	8.02 ± 0.08	4.90 ± 0.06	2.81 ± 0.03	2.69
8	3.31 ± 0.2	5.03 ± 0.06	5.70 ± 0.0	3.45 ± 0.05	2.25
10	3.32 ± 0.0	4.00 ± 0.0	5.80 ± 0.06	3.26 ± 0.06	2.54
13	3.35 ± 0.1	3.56 ± 0.06	5.15 ± 0.03	2.49 ± 0.05	2.66

Comparando los resultados con la fermentación control, se llegó a una acidez volátil ligeramente mayor que en el experimento anterior, obteniendo una concentración de 2.66 g a.a./L en menor tiempo, con 3 días de diferencia; el descenso en los °Brix y su correspondiente aumento en acidez fija y volátil ocurrieron entre los días 4 a 8, observándose una diferencia en el comportamiento de la fermentación puesto que la acidez fija es mayor que la volátil prácticamente

todo el tiempo, disminuyendo en los últimos días al contrario que en el control. La fermentación no muestra resultados por debajo de la norma mexicana para calidad de vinagres ya que no se alcanza el valor del rango de referencia (4-8 g a.a./L). Se muestra, además, una reducción de acidez fija de un valor de 3.26 g/L en el día 10 a un valor de 2.49 g/L en el día 13, hecho que impacta en el valor de la acidez total, más no en el contenido de acidez volátil. Además, se comprueba que el aumento de °Brix no genera una diferencia estadística significativa ($0.41 > \alpha$) refiriéndose a los valores de acidez volátil, en cuanto a los valor de acidez total ($0.057 > \alpha$) de igual forma no representa un cambio; para acidez fija ($0.004 < \alpha$) si existe una diferencia significativa, pero es indeseable ya que esta no representa concentraciones de ácido acético.

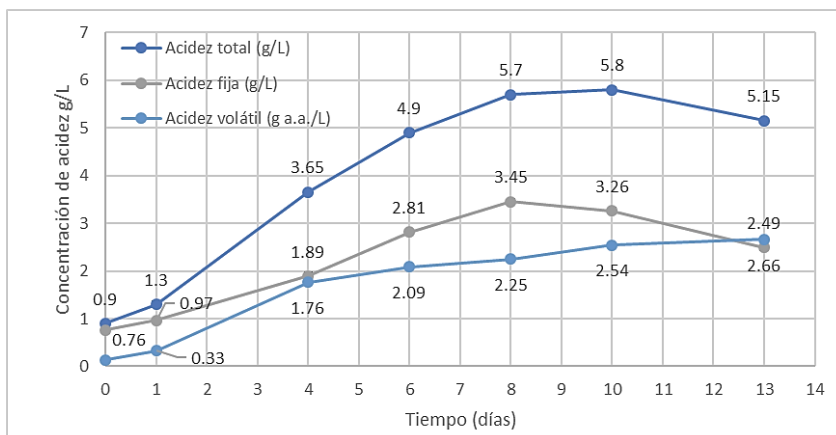


Ilustración 12: Comportamiento de parámetros de acidez de la fermentación con modificación de °Brix.

3.1.3 Prueba de fermentación: modificación de Temperatura

La evaluación se realizó modificando la Temperatura a un valor de 29°C, que es el empleado por referencias como temperatura óptima, sin sobrepasar el valor límite de tolerancia de los microorganismos de 32 °C. La Tabla 5 (los resultados muestran el promedio del triplicado de las pruebas y su desviación estándar) y la Ilustración 13 muestran los resultados experimentales obtenidos.

Tabla 5: Resultados de las mediciones de los parámetros de acidez en la prueba con modificación de Temperatura

Día	pH	°Brix	Acidez total (g/L)	Acidez fija (g/L)	Acidez volátil (g a.a./L)
-----	----	-------	--------------------	-------------------	---------------------------

0	5.41 ± 0.1	8.000 ± 0.08	0.900 ± 0.08	0.750 ± 0.06	0.15
1	5.01 ± 0.15	7.325± 0.05	1.425 ± 0.05	1.035 ± 0.05	0.39
3	3.82 ± 0.05	4.050 ± 0.06	4.050 ± 0.06	1.800 ± 0.08	2.25
5	3.74 ± 0.03	3.425 ± 0.1	5.775 ± 0.1	2.820 ± 0.08	2.95
7	3.31 ± 0.20	3.575 ± 0.08	6.300 ± 0.08	3.015 ± 0.1	3.28
9	3.30 ± 0.15	2.025 ± 0.06	8.250 ± 0.06	3.435 ± 0.15	4.81
11	3.20 ± 0.04	2.175 ± 0.1	8.025 ± 0.05	3.150 ± 0.06	4.87

Es importante recalcar el tiempo de fermentación y el grado de reducción de la concentración de azúcares puesto que, comparando los resultados con la fermentación de aumento de °Brix, se llegó a una concentración mayor para acidez volátil con un valor de 4.875 g a.a./L con una reducción aproximada en el tiempo de 2 días de diferencia, aunque, también es posible observar que los valores de acidez fija se encuentran muy parejos, lo que no representa un punto positivo para el producto que se busca, ni para lo solicitado por la norma. En esta ocasión el aumento en la producción de ácido acético se llevó a cabo entre los días 6 y 9, aunque, el consumo de los solutos fue durante los primeros 7 días de la fermentación. Además, se comprueba que el aumento de temperatura a 29°C no genera una diferencia estadística significativa ($0.082 > \alpha$) refiriéndose a los valores de acidez volátil, en cuanto a los valores de acidez total y acidez fija ($0.027 < \alpha$, $0.004 < \alpha$, respectivamente) ambos si representan un cambio, pero no son los valores necesarios ya que no son los indicadores de la aparición de ácido acético.

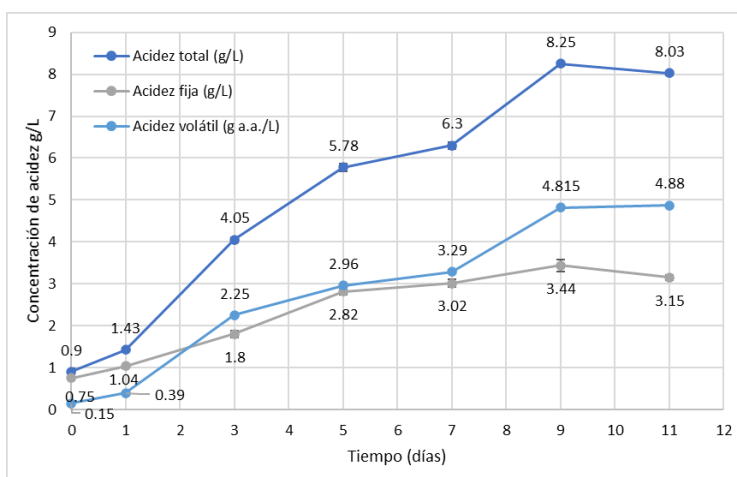


Ilustración 13: Comportamiento de parámetros de acidez de la fermentación con modificación de Temperatura.

3.1.4 Prueba de fermentación: modificación de °Brix y Temperatura

Se realizó una prueba de fermentación empatando las dos modificaciones anteriores para observar el resultado de las pruebas de fermentación, quedando a temperatura controlada de 29°C y una concentración de sólidos de 15°Brix. La Tabla 6 (los resultados muestran el promedio del triplicado de las pruebas y su desviación estándar) y la Ilustración 14 muestran los resultados experimentales obtenidos.

Tabla 6: Resultados de las mediciones de los parámetros de acidez en la prueba con modificación de °Brix y Temperatura.

Día	pH	°Brix	Acidez total (g/L)	Acidez fija (g/L)	Acidez volátil (g a.a/L)
0	5.01 ± 0.0	15.00 ± 0.0	1.03 ± 0.05	0.67 ± 0.08	0.36
1	4.25 ± 0.05	14.02 ± 0.05	1.35 ± 0.06	0.97 ± 0.05	0.38
2	4.02 ± 0.1	13.45 ± 0.06	4.20 ± 0.08	2.45 ± 0.08	1.75
3	3.79 ± 0.15	12.97 ± 0.13	4.87 ± 0.05	2.70 ± 0.07	2.17
5	3.51 ± 0.1	12.97 ± 0.13	9.60 ± 0.08	3.05 ± 0.08	6.55
6	3.49 ± 0.0	12.00 ± 0.14	11.32 ± 0.1	5.24 ± 0.06	6.08
8	3.40 ± 0.0	12.00 ± 0.0	12.90 ± 0.08	2.68 ± 0.09	10.22
9	3.40 ± 0.0	11.47 ± 0.05	14.47 ± 0.10	4.13 ± 0.08	10.34
10	3.39 ± 0.2	11.10 ± 0.08	15.22 ± 0.05	4.52 ± 0.06	10.70
13	3.29 ± 0.1	9.95 ± 0.06	19.72 ± 0.1	3.66 ± 0.07	16.06
15	3.29 ± 0.05	9.92 ± 0.1	23.02 ± 0.1	3.52 ± 0.06	19.51
16	3.28 ± 0.0	9.47 ± 0.05	25.47 ± 0.1	3.59 ± 0.17	19.89
18	3.28 ± 0.2	9.45 ± 0.06	26.92 ± 0.19	5.55 ± 0.09	21.37
20	3.20 ± 0.1	8.50 ± 0.0	34.72 ± 0.1	5.20 ± 0.15	29.53
21	3.18 ± 0.12	8.47 ± 0.05	36.52 ± 0.15	5.75 ± 0.15	30.78
22	3.16 ± 0.21	8.00 ± 0.08	38.17 ± 0.1	6.94 ± 0.17	31.24
24	3.13 ± 0.13	7.50 ± 0.0	40.95 ± 0.13	7.46 ± 0.11	33.49
26	3.08 ± 0.1	7.45 ± 0.06	43.95 ± 0.13	6.43 ± 0.08	37.52
28	2.92 ± 0.2	8.45 ± 0.13	58.20 ± 0.08	5.54 ± 0.11	52.66
30	2.97 ± 0.05	7.97 ± 0.05	62.10 ± 0.08	3.05 ± 0.08	59.05
34	2.93 ± 0.05	8.00 ± 0.0	61.50 ± 0.12	3.05 ± 0.08	58.45

La fermentación se prolongó hasta 34 días puesto que no se observaba una reducción de los valores de acidez. El valor máximo de acidez volátil del vinagre

resultante en el día 34 fue de 58.452 g a.a./L lo que se ajusta a los valores marcados por la norma nacional para vinagres y a la BOE - Real Decreto 661/2012, de 13 de abril, que establece la norma de calidad para la elaboración y la comercialización de los vinagres en España y diversos lugares del mundo, ya que se encuentra emparejada con el Codex Alimentarius, donde de acuerdo a la categoría según el sustrato empleado, se pide como mínimo una acidez volátil de 50 gramos/litro de ácido acético. Además, cabe recalcar que es muy notoria la diferencia de la tendencia de las cinéticas de producción de ácido acético en comparación con la de acidez fija que resulta ser muy baja al nunca sobrepasar un valor de 7.64 g/L; los valores de acidez volátil crecen de manera constante a lo largo de la fermentación, sin embargo, entre los días 24-30 se presenta el aumento más considerable. El análisis estadístico, comprueba que el aumento combinado de °Brix y temperatura sí genera una diferencia estadística significativa ($0.005 < \alpha$) refiriéndose a los valores de acidez volátil, en cuanto a los valores de acidez total y acidez fija ($0.002 < \alpha$, $0.00 < \alpha$, respectivamente) de igual manera existe un cambio significativo. Por lo que estas condiciones son las óptimas para el desarrollo de las fermentaciones.

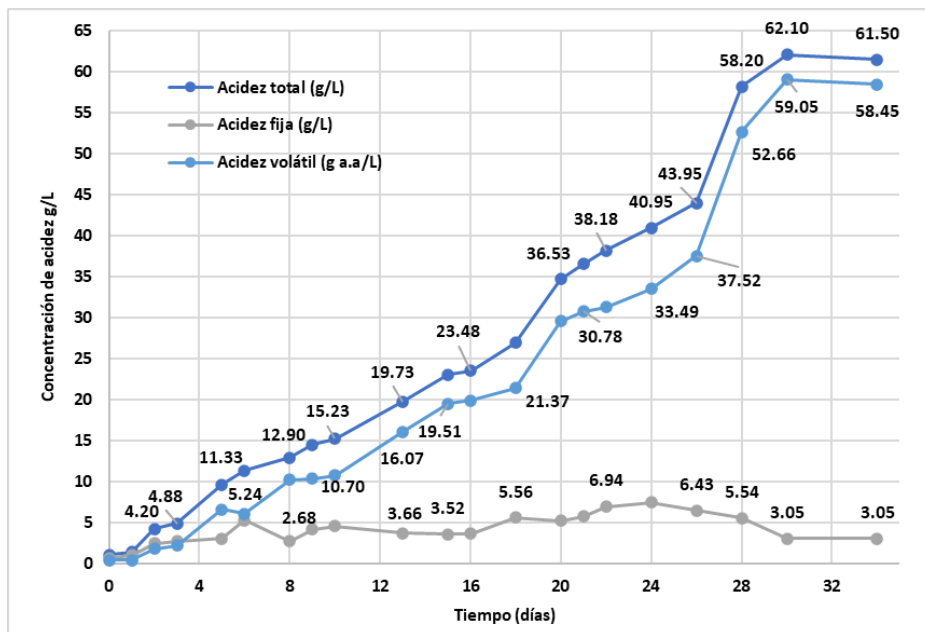


Ilustración 14: Comportamiento de parámetros de acidez de la fermentación con modificación de °Brix y temperatura.

Como puede observarse en la tabla, el día 34 de medición se presentó un valor menor de acidez volátil en comparación con la medición del día 30, Gerard (2015) realizó pruebas para diferentes especies específicas de bacterias del ácido acético, notando que algunas (principalmente *Acetobacter*) oxidaron el ácido acético formado a partir del etanol, es decir son bacterias superoxidantes, es decir que una vez agotado el etanol continúan su actividad oxidando el ácido acético previamente formado, y lo hacen en ausencia de etanol, ya que éste inhibe y reprime las enzimas involucradas. En cambio, menciona que el género *Gluconobacter*, no lo puede realizar ya que carece de dichas enzimas, (α -cetoglutarato deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa) y por lo tanto no tiene funcional el ciclo de los ácidos tricarboxílicos; esta característica presente en algunas BAA, permite diferenciar los géneros, sin embargo, no es deseada en la industria del vinagre, debido a que provoca grandes pérdidas de ácido acético y consecuentemente pérdidas de rendimiento del proceso; lo que podría explicar la reducción de los valores de acidez volátil observada.

Los valores de °Brix mostraron una tendencia muy pareja en su disminución a lo largo del proceso, el valor final queda en 8.000 ± 0.0 °Brix aproximadamente, siendo mucho mayor en comparación con las pruebas anteriores donde su consumo llega a valores mínimos de hasta 3 °Brix, esto implicaría que la temperatura es el parámetro más influyente para la optimización del proceso en la obtención de ácido acético, y que probablemente acelera la fermentación alcohólica llegando a concentraciones de etanol que podrían estar inhibiendo a las levaduras para seguir consumiendo la sacarosa.

Tabla 7: Comparación NMX-F-122-1998 contra valores de fermentación optimizada.

Especificaciones	Grado A		Prueba optimizada
	Mínimo	Máximo	-----
Extracto seco (%)	1.8	4.52	4.44 ± 0.02
Densidad relativa a 15°C (g/cm³)	1.013	1.025	1.031 ± 0.0
Cenizas (%)	0.25	0.45	0.35 ± 0.001

Acidez total (%)	4	8	6.15 ± 0.012
Acidez fija (%)	0.06	0.41	0.30 ± 0.01
Acidez volátil (%) en ácido acético	3.94	7.56	5.84

En la tabla 7 se muestra la comparación entre los valores obtenidos de la prueba optimizada contra los rangos establecidos por la norma. Se puede notar que, a excepción de la densidad relativa, todos los valores entran en mencionados rangos. Basándonos en los conocimientos previos sobre la producción de celulosa por el cultivo y tomando en cuenta que el líquido al que se le realizan las pruebas no ha sido filtrado ni tratado para su envasado y posterior distribución, es que se atribuye el aumento en la densidad relativa y los valores de extracto seco y cenizas, relativamente altos, al encontrarse cerca del límite superior.

En cuestión de algún sistema de producción mediante metodologías tradicionales similares a la empelada en este trabajo, Vegas et al. (2010), menciona que la reducción de etanol en sus pruebas fue similar en dos procesos que realizó (6.2–6.4%, v/v) y el valor aproximado de transformación fue 1 g de etanol por 1 g de ácido acético. Posterior a la fermentación procedió a un envejecimiento en barriles donde se redujeron los niveles de etanol a menos del 1% (v/v). En su primera fase, con acetificación activa, terminó con un 4.5% (p/v) de ácido acético en aproximadamente 100 días, mientras que la segunda fase se caracterizó por una acetificación estancada, lo que significó que tomó hasta 272 días alcanzar el 6% (p/v) ácido acético, por lo que tomando en cuenta la similitud de los sistemas mencionados, el tiempo de fermentación es adecuado para el aumento de los valores de acidez y el cambio benéfico en el perfil sensorial del producto.

Ching-Ting et al. (2018) realizó un fermento de vinagre a base de papaya en un tiempo aproximado de 70.80 horas y un 40% de madre del vinagre, sin embargo, el proceso se llevó a cabo en un sistema controlado bajo agitación en una incubadora orbital, mientras que, en el presente trabajo únicamente se requirió de un 7.5% de Madre del vinagre para llegar a los valores de acidez requeridos, aunque a un tiempo mayor. El hecho de usar un sistema controlado, además de tener un gasto energético, enfocándonos en buscar una calidad artesanal, tendría un

impacto en las cuestiones de producción debido a la falta de recursos tecnológicos y una reducción en el mantenimiento de la microbiota ya que, al agitar el sistema, se produce un cambio en el ambiente de esta que podría llegar a modificar su metabolismo de los microorganismos y, por tanto, la composición del producto.

3.2 Fermentación en condiciones óptimas

3.2.1 Comportamiento de las fermentaciones en condiciones optimizadas

Una vez optimizado el proceso de fermentación artesanal se emplean éstas mismas condiciones aumentando el volumen de fermentación para determinar parámetros cinéticos específicos, que permitan conocer el comportamiento del consumo del sustrato y la producción de los metabolitos de interés. Los resultados se muestran en las tablas 8 y 9 (los resultados muestran el promedio del triplicado de las pruebas y su desviación estándar).

Basándose en el primer parámetro de medición que se usa para el ajuste de la fermentación al inicio ($^{\circ}\text{Brix}$), se observa el cambio de la tendencia de disminución de la concentración de azúcares (Ilustración 15 e Ilustración 16), puesto que la fermentación 1 sigue una reducción constante hasta aproximadamente el día 48 cuando inicia la caída con un valor de 5.5 ± 0.07 $^{\circ}\text{Brix}$ y termina con un valor de 5.4 ± 0.07 , mientras que la fermentación 2 inicia a estabilizarse aproximadamente en el día 28 con un valor de 8.8 ± 0.0 $^{\circ}\text{Brix}$ y termina con un valor de 4.2 ± 0.0 .

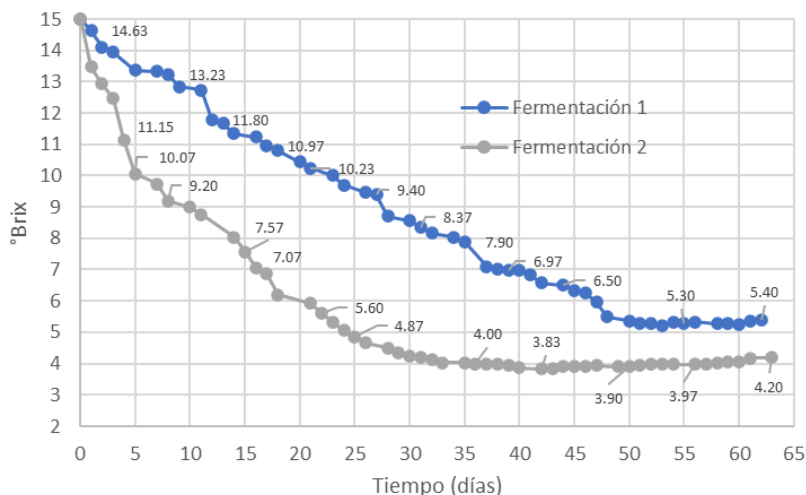


Ilustración 15: Gráfico de cambios en $^{\circ}\text{Brix}$ para pruebas de fermentación en condiciones óptimas.

Siguiendo la vía metabólica para la fermentación alcohólica, para la fermentación 2 se puede suponer que existía una población de levaduras más alta que en la fermentación 1, y por lo tanto se llega a suponer que el contenido de etanol llegó a concentraciones más altas y en menor tiempo, así como el consumo de sacarosa, hecho que en vez de ser favorable para la fermentación llegó a frenar la producción de ácido acético por la tolerancia de contenido de etanol de las bacterias. La presencia de etanol inhibe el crecimiento y la viabilidad de las células, a concentraciones superiores a 50 g/L, afectando principalmente la membrana plasmática, cambiando la organización y la permeabilidad de la membrana que conduce a la acumulación de solutos y el flujo de protones, además, las altas concentraciones de etanol pueden inducir a un fenómeno de retraso o inhibición por sustrato al inicio de la fermentación acética, lo que provoca un alargamiento de la fase de latencia y una fase de crecimiento más tardía por parte de las bacterias del ácido acético (Gerard, 2015). Incluso, Casner (2005), reveló por algunos estudios que las bacterias del género *Gluconobacter spp.* disminuyen su actividad cuando la concentración de etanol en la fase de alimentación se ve incrementada.

Tabla 8: Valores de seguimiento, fermentación en condiciones optimizadas 1

Día	°Brix	Densidad (g/ml)	Acidez Total (g/L)	Acidez fija (g/L)	Acidez volátil (g a.a./L)	% Azúcares reductores directos	% Azúcares reductores totales
0	15.0±0.0	1.086	0.4±0.17	0.22±0.04	0.18	1.40±0.02	12.41±0.23
5	13.37±0.36	1.073	4.4±0.17	2.88±0.06	1.52	1.74±0.08	12.04±0.66
7	13.33±0.04	1.070	6.4±0.17	4.48±0.09	1.92	1.28±0.03	10.24±0.04
9	12.83±0.04	1.061	8.2±0.17	5.10±0.06	3.1	1.09±0.02	8.17±0.1
12	11.80±0.07	1.059	9.1±0.17	5.78±0.04	3.32	0.96±0.002	7.45±0.16
13	11.67±0.04	1.058	9.3±0.0	5.96±0.04	3.34	1.11±0.01	5.84±0.09
16	11.23±0.04	1.056	9.75±0.15	6.07±0.02	3.68	1.61±0.01	5.26±0.06
20	10.43±0.04	1.05	10.35±0.15	6.60±0.1	3.75	2.07±0.05	5.27±0.01
23	10.00±0.07	1.048	10.55±0.09	6.66±0.0	3.89	2.16±0.05	5.23±0.03
24	9.70±0.07	1.046	10.9±0.17	6.50±0.07	4.4	2.23±0.03	5.22±0.06
27	9.40±0.0	1.044	11.25±0.15	6.50±0.04	4.75	2.14±0.04	5.15±0.01
28	8.70±0.0	1.041	11.3±0.17	6.18±0.0	5.12	1.93±0.03	5.13±0.03
30	8.57±0.04	1.039	11.45±0.09	6.30±0.0	5.15	2.02±0.02	5.11±0.03
32	8.17±0.04	1.037	11.75±0.09	6.32±0.04	5.43	2.12±0.08	5.10±0.04

34	8.03±0.04	1.036	11.9±0.17	6.18±0.06	5.72	2.06±0.02	5.09±0.01
35	7.90±0.0	1.036	12.3±0.0	5.90±0.15	6.4	2.02±0.03	5.08±0.03
38	7.00±0.0	1.032	13.1±0.17	5.88±0.12	7.22	1.91±0.06	5.05±0.04
40	6.97±0.04	1.030	13.3±0.17	5.86±0.09	7.44	1.76±0.02	5.01±0.07
42	6.57±0.04	1.03	14.2±0.17	5.90±0.04	8.3	1.61±0.02	4.93±0.02
45	6.33±0.04	1.029	14.9±0.17	6.04±0.07	8.86	1.43±0.02	4.89±0.01
46	6.27±0.04	1.028	15.450.15	5.88±0.06	9.57	1.38±0.03	4.88±0.03
48	5.50±0.07	1.027	16.0±0.17	5.67±0.03	10.33	1.29±0.01	4.72±0.03
51	5.27±0.04	1.027	17.3±0.17	5.45±0.05	11.85	1.14±0.02	4.58±0.02
52	5.27±0.04	1.026	18.1±0.17	5.38±0.04	12.72	1.13±0.02	4.54±0.02
53	5.20±0.0	1.026	18.9±0.3	5.30±0.04	13.6	1.12±0.01	4.45±0.01
55	5.30±0.07	1.025	19.7±0.17	4.78±0.04	14.92	1.10±0.01	4.37±0.04
56	5.33±0.09	1.025	20.6±0.17	4.62±0.06	15.98	1.01±0.01	4.34±0.04
59	5.30±0.0	1.026	23.6±0.17	4.40±0.02	19.2	1.09±0.002	4.23±0.02
60	5.23±0.04	1.027	24.5±0.17	4.22±0.04	20.28	1.09±0.01	4.20±0.04
61	5.37±0.04	1.027	27.0±0.3	4.08±0.0	22.92	1.08±0.003	4.18±0.03
62	5.40±0.07	1.028	28.3±0.17	3.90±0.0	24.4	1.08±0.01	4.13±0.02

Tabla 9: Valores de seguimiento, fermentación en condiciones optimizadas 2.

Día	°Brix	Densidad (g/ml)	Acidez total (g/L)	Acidez fija (g/L)	Acidez volátil (g a.a./L)	% Azúcares reductores directos	% Azúcares reductores totales
0	14.17±0.06	1.067	0.3±0.0	0.18±0.0	0.12	0.86±0.01	12.43±0.23
2	12.93±0.06	1.06	1.9±0.09	1.08±0.06	0.82	1.03±0.01	12.41±0.13
4	11.15±0.05	1.058	3.85±0.09	2.51±0.05	1.34	1.19±0.01	9.99±0.41
7	9.73±0.06	1.054	6.3±0.3	4.30±0.03	2	1.34±0.01	6.57±0.19
14	8.03±0.06	1.044	7.7±0.17	5.62±0.05	2.08	1.74±0.02	4.99±0.03
15	7.57±0.06	1.041	7.85±0.09	5.70±0.0	2.15	1.80±0.01	4.92±0.02
17	6.87±0.06	1.04	8.4±0.0	5.92±0.03	2.48	1.77±0.04	4.86±0.02
18	6.20±0.0	1.034	8.8±0.17	5.86±0.03	2.94	1.70±0.02	4.86±0.02
22	5.60±0.0	1.027	9.1±0.17	5.88±0.0	3.22	1.42±0.03	4.86±0.01
24	5.07±0.06	1.025	9.3±0.0	5.54±0.03	3.76	1.4±0.01	4.64±0.02
25	4.87±0.11	1.023	9.3±0.0	5.36±0.03	3.94	1.37±0.02	4.24±0.04
29	4.33±0.06	1.019	9.55±0.09	5.46±0.06	4.09	1.28±0.01	3.85±0.02
30	4.23±0.15	1.018	9.65±0.09	5.48±0.03	4.17	1.32±0.01	3.85±0.01
32	4.13±0.06	1.018	9.9±0.0	5.56±0.03	4.34	1.39±0.01	3.81±0.01
35	4.03±0.06	1.018	10.4±0.17	5.64±0.0	4.76	1.45±0.01	3.77±0.01
36	4.00±0.0	1.017	10.7±0.17	5.66±0.03	5.04	1.46±0.004	3.71±0.02
37	3.97±0.06	1.017	10.9±0.17	5.68±0.03	5.22	1.54±0.01	3.62±0.06
39	3.93±0.06	1.017	11.3±0.17	5.74±0.03	5.56	1.60±0.01	3.735

42	3.83±0.06	1.017	11.8±0.17	5.48±0.03	6.32	1.65±0.01	3.520
43	3.83±0.06	1.017	12.2±0.17	4.84±0.03	7.36	1.69±0.02	3.474
44	3.90±0.0	1.017	12.6±0.0	4.42±0.03	8.18	1.72±0.03	3.484
46	3.90±0.0	1.017	13.5±0.0	3.74±0.03	9.76	1.81±0.03	3.090
49	3.90±0.1	1.018	14.5±0.17	3.64±0.03	10.86	1.60±0.03	3.077
52	3.97±0.06	1.018	15.5±0.17	3.58±0.03	11.92	1.97±0.01	3.025
54	3.97±0.06	1.018	16.1±0.17	3.50±0.03	12.6	1.90±0.09	3.073
56	3.97±0.06	1.018	17.4±0.0	3.44±0.03	13.96	1.72±0.03	2.984
57	4.00±0.0	1.019	17.8±0.17	3.40±0.03	14.4	1.59±0.02	2.919
58	4.03±0.06	1.019	18.8±0.17	3.36±0.0	15.44	1.57±0.01	2.689
59	4.07±0.15	1.02	19.2±0.0	3.30±0.06	15.9	1.54±0.02	2.794
60	4.07±0.06	1.02	19.9±0.17	2.98±0.07	16.92	1.52±0.02	2.898
61	4.17±0.06	1.02	21.2±0.17	2.60±0.07	18.6	1.47±0.01	2.803
63	4.20±0.0	1.02	23.9±0.17	1.82±0.03	22.08	1.44±0.01	2.611

Para corroborar el consumo de sacarosa en el sistema fue necesario calcular el porcentaje real aproximado del contenido de sacarosa en la panela empleada para el ajuste de °Brix, ya que los °Brix podrían considerar otros sólidos solubles además de los azúcares y aumentar el margen de error. Se utilizaron 500 g de panela para cada fermentación; en soluciones muestra se calculó el contenido de %Azúcares reductores totales utilizando la NMX-F-312-1978. DETERMINACIÓN DE REDUCTORES DIRECTOS Y TOTALES EN ALIMENTOS. METHOD OF TEST FOR TOTAL AND DIRECT REDUCING SUBSTANCES IN FOOD. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS. Resultado que, por cada gramo de panela, se tienen 0.9938 g de sacarosa, o bien, un 99.37%, concordando con los resultados reportados de contenido de sacarosa en panela por otros autores, donde se expresa que existe una variabilidad según el lote, variedad de caña de azúcar y lote de producción, siendo de 85-99% (De Maria, 2004; Mascietti, 2014; García et al., 2017).

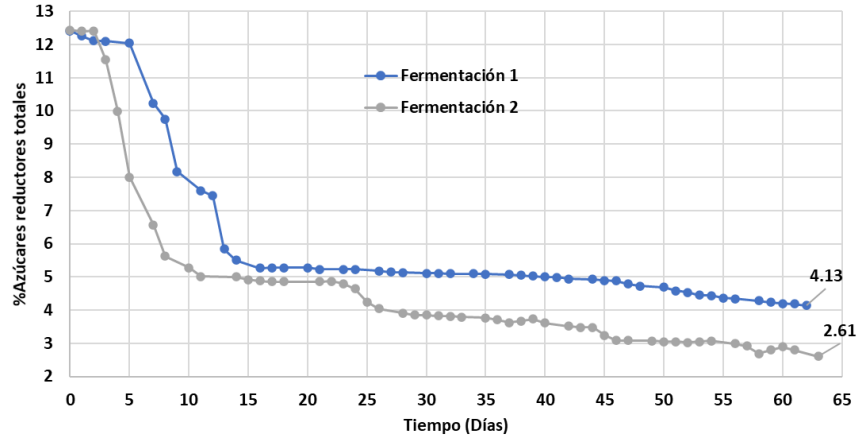


Ilustración 16: Gráfico de cambio en el porcentaje de Azúcares reductores totales para las pruebas de fermentación en condiciones óptimas.

Para ambas pruebas de fermentación se requirió un tiempo aproximado de fermentación, 62 días para la fermentación 1 y 63 días para la fermentación 2; los puntos máximos para el valor de ácido acético son de 28.3 y 23.9 g a.a./L para la fermentación 1 y 2 respectivamente (Ilustración 17). Recordando el motivo de los resultados de las fermentaciones acéticas mencionadas en el párrafo anterior, podemos observar la menor producción de acidez por parte de la fermentación 2 (Ilustración 16b) a pesar de tener buen comportamiento en la reducción de sustrato. Además de que ninguna de las dos pruebas llega a los valores establecidos por norma, hecho que se atribuye al uso de la misma porción de matriz que se empleó en las fermentaciones optimizadas; aún se desconocen los cambios que pudiera tener la misma en la concentración de microbiota posterior a realizar un ciclo de fermentación, por lo que esta prueba únicamente cumplirá la función de evaluar el comportamiento de los parámetros fermentativos.

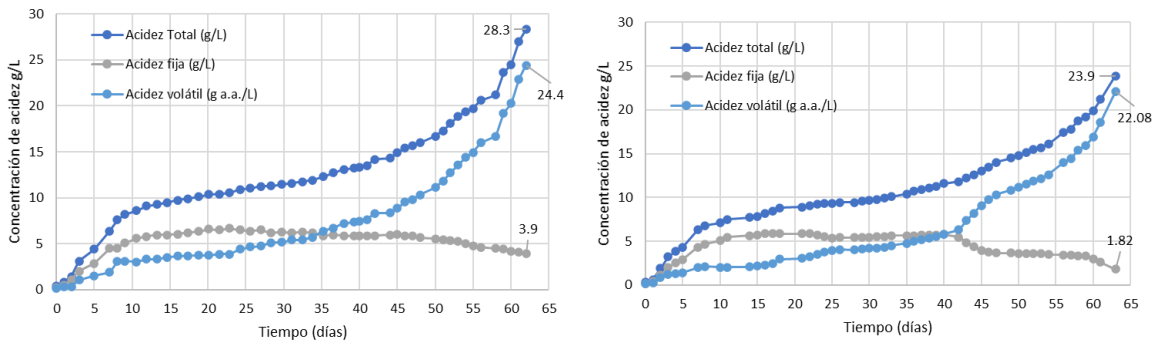


Ilustración 17: Gráfico de cambios en concentración de acidez para las pruebas de fermentación en condiciones óptimas. a) Fermentación 1, b) Fermentación 2.

En la fermentación mezclada con cepas de levaduras, estas convierten el azúcar fermentable en alcohol con glicerol, ácido succínico, ácido láctico, ácido graso, etc. entonces los oligosacáridos sacarificados incompletos se hidrolizan a azúcares fermentables (Li et al., 2015), así mismo, las bacterias del ácido acético producen distintos metabolitos secundarios que influyen los resultados de los valores de acidez del sistema, derivado de las enzimas secretadas por estas bacterias que pueden oxidar el alcohol para producir ácido acético, glicerol y alcoholes para generar diacetona y fructosa, y almidón y glucosa a ácido glucónico, ácido succínico, ácido málico y otros ácidos orgánicos, respectivamente, lo cual realza la necesidad de diferenciar la acidez fija de la acidez volátil (contenido de ácido acético). En la ilustración 17 se observa que los valores finales de acidez fija fueron de 3.9 g/L y 1.820 g/L para las fermentaciones 1 y 2, respectivamente; dato que va en relación al consumo de sacarosa inicial, en cambio, se observa una reducción de estos valores debido a que los efectos sinérgicos de varios tipos de bacterias hacen que los metabolitos sean difíciles de acumular y por tanto son liberados al medio y consumidos, creando así un ambiente de vida favorable para las actividades metabólicas de varios tipos de microorganismos (Li et al., 2015).

Li et al. (2015) encontró que el rendimiento de ácido acético en un sistema de fermentación micro aerobia de bacterias de ácido acético adicionado con cepas de levaduras es casi el doble de un sistema simple, probablemente debido a la conversión efectiva de glucosa y alcohol en ácido acético y agua en presencia de bacterias de ácido acético, incluso llegando a ser 102% más alta. Pudiendo inferir nuevamente que el error para asegurar la reproducibilidad de un sistema como el que se presenta en esta tesis es el conocimiento de la cuantificación de la microbiota, sin embargo, implicaría la eliminación de las características de un procedimiento artesanal y de preservación de un cultivo iniciador casero.

Las pruebas de fermentación optimizadas muestran resultados no reproducibles, lo que nuevamente, se puede atribuir a la falta de control sobre el inóculo, ya que la microbiota inmersa en los fragmentos de matriz empleada puede variar con el tiempo y la zona tanto en número de microorganismos como en el tipo,

esto se corrobora con Gerard (2015) que dice que un cultivo mixto que no está determinado cualitativa, ni cuantitativamente, no asegura el control del proceso o la calidad del producto final, sin embargo, podría mejorar los aspectos sensoriales finales.

3.2.2 Cálculo de rendimiento y productividad

El rendimiento teórico estequiométrico para la transformación de glucosa en etanol es de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO₂ por 1 g de glucosa. Este valor fue cuantificado por Gay Lussac. En la realidad es difícil lograr este rendimiento, porque la levadura utiliza la glucosa para la producción de otros metabolitos. El rendimiento experimental varía entre 90% y 95% del teórico, es decir, de 0.469 a 0.485 g/g. Los rendimientos en la industria varían entre 87 y 93% del rendimiento teórico (Vázquez & Dacosta, 2007). Es importante recalcar estos datos al realizar la cuantificación de los rendimientos de la fermentación.

Tomando en consideración que los parámetros de fermentación para condiciones óptimas no son reproducibles en su totalidad debido a la variabilidad de los microorganismos inmersos en la matriz, se procederá a calcular los valores de rendimiento por separado entre las dos fermentaciones.

Siendo 4 litros el volumen de reacción para ambos casos, el valor calculado de sacarosa por gramo de panela y obteniendo una producción de ácido acético para las pruebas 1 y 2 de 24.4 g/L y 22.08 g/L, respectivamente:

$$R_{sustrato F1} = 19.66\%$$

$$R_{sustrato F2} = 17.66\%$$

De acuerdo con los valores de azúcares residuales no transformados en la fermentación que fueron obtenidos de la curva de consumo mediante la prueba de Lane-Eynon y los valores de concentración de otros ácidos orgánicos cuantificados como acidez fija, se obtienen los siguientes porcentajes de sacarosa sobrante y transformada, respectivamente (tabla 10):

Tabla 10: Porcentajes residuales en pruebas de fermentación a condiciones óptimas.

	Fermentación 1	Fermentación 2
Sacarosa Residual	33.32%	25.43%
Acidez no volátil	3.14%	1.45%
Total	36.46%	26.88%

Además, se realizó el cálculo del porcentaje de sustrato que fue utilizado por la microbiota para la producción de las unidades de celulosa que conforman la matriz y para el aumento de la biomasa, al no establecer una metodología para separar ambas partes, el cálculo se hace de manera general por el porcentaje promedio de materia seca de acuerdo con el peso en húmedo de la matriz inóculo de ambas pruebas de fermentación. Resultando un 1.78% y 1.77% para las pruebas 1 y 2, respectivamente. Se ha confirmado en algunos estudios que las bacterias del ácido acético no son altas productoras en su mayoría ya que la concentración de azúcares residuales no cambia a lo largo de las acetificaciones, lo que confirma la preferencia por el etanol como fuente de carbono de las BAA presentes en algunos vinagres (Vegas et al., 2010), a excepción de los medios donde se encuentran especies específicas conocidas de alta producción de celulosa como *Gluconacetobacter xylinus*; lo que en comparación con otros sistemas artesanales es bajo, por ejemplo, López-Rojo et al. (2017) en un estudio de fermentación de kéfir menciona la producción de biomasa obtenida a las 53 horas que fue del 74.6% respecto al valor inicial, producida principalmente por bacterias ácido lácticas.

Una vez establecidos los valores de rendimiento y sumando los porcentajes de sacarosa residual y acidez no volátil resultó un 58.11% para la primer prueba de fermentación y un 46.60% para la segunda. Se consideran valores aptos de rendimiento a pesar de no llegar a un 100% ya que como se mencionó anteriormente, existe una pérdida de alrededor del 50% de la masa de la sacarosa en la primera sección de la fermentación, es decir, en la fermentación alcohólica con la liberación de dióxido de carbono. En un trabajo de seguimiento de procesos fermentativos para obtención de vinagre, Andelib-Aydin & Nuran (2010), realizaron

un análisis de azúcar que reveló que solo el 32% de la glucosa estaba involucrado en la fermentación siendo bastante más baja que la relación de conversión esperada del 50%, lo que refuerza el rendimiento presentado para el ácido acético en éste trabajo. Por lo que se considera favorable el grado de conversión de los sustratos usados en este trabajo.

En la ilustración 18 se muestra el gráfico que representa el cambio de la producción de acidez, específicamente de ácido acético a través del paso de los días. Según el estudio de Vegas, et al. (2010), se menciona que dependiendo el tipo de sustrato utilizado, los valores de acidez iniciales pueden variar, implicando que no son cuantificables como producidos durante la fermentación, además, siguiendo los valores mencionados en la sección 3.2.1, se estima que los valores altos que aparecen al principio de la gráfica pueden provenir tanto de la acidez de la panela como valores residuales de la matriz (De Maria, 2004), por lo tanto, cambios importantes de acidez se observan a partir del día 18.

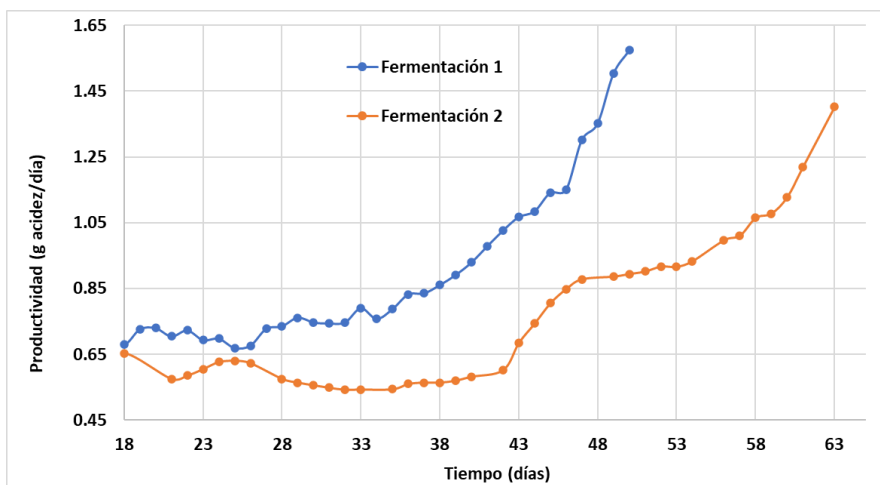


Ilustración 18: Cambio de la productividad de las fermentaciones a condiciones óptimas a través del tiempo

Tomando en cuenta lo que se mencionó, se puede observar que entre los días 15 y 35 aproximadamente existe una producción de aproximadamente de 0.65 gramos/día. Es hasta el día 35 en que la tendencia comienza a subir, se observa también un periodo de disminución de la productividad en el día 45, pudiendo deberse a la fase de adaptación al nivel de acidez del sistema, después se retoma

la tendencia, llegando a un valor máximo de 1.5742 y 1.4019 g/día para las fermentaciones 1 y 2 respectivamente.

3.3 Aislamiento de microorganismos

3.3.1 Bacterias del ácido acético

Después llevar a cabo el proceso de aislamiento de las cepas presentes en el inóculo artesanal madre del vinagre, se pudo observar la presencia tanto de bacterias sugerentes de BAA y levaduras. A continuación, se describen las BAA denotadas con las siglas del medio de cultivo en donde crecieron óptimamente seguidas de números consecutivos.

GEY 1



Ilustración 19: Colonias de BAA GEY 1, después de ser incubadas por 48 h a 28 °C.

En la Ilustración 19 se pueden observar colonias puntiformes planas de margen entero, de apariencia traslucida-transparente, ligeramente color beige y húmedas correspondientes a las bacterias GEY 1.

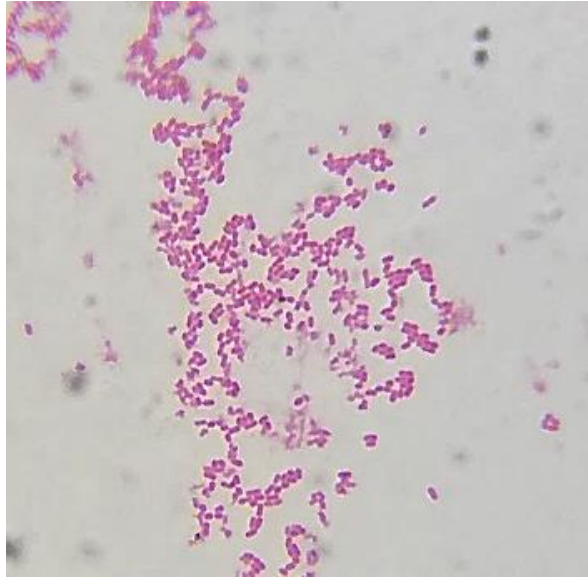


Ilustración 20: Micrografía simple tinción de Gram, medio GEY 1 a 100x de aumento, realizadas a las 24 h de cultivo a 29°C.

En la micrografía mostrada en la Ilustración 20 se observan Bacilos Gram negativos ligeramente alargados en reproducción por fisión binaria.

Medio GEY 2



Ilustración 21: Colonias de BAA GEY 2, después de ser incubadas por 48 h a 28 °C.

En la ilustración 21 se observan colonias puntiformes planas de margen entero, de apariencia transparente, color beige, húmedas y con apreciable iridiscencia.

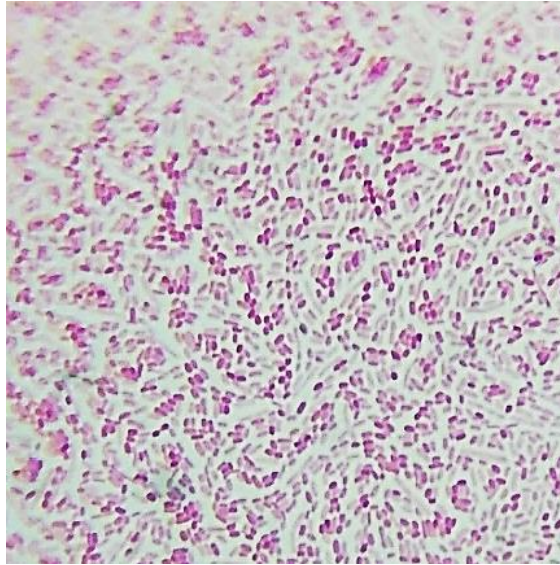


Ilustración 22: Micrografía simple de tinción de Gram, de GEY 2 a 100 X de aumento, realizadas a las 24 h de cultivo a 29°C.

En las micrografías mostradas en la Ilustración 22 se observan bacilos largos Gram negativos, en conjunto con bacterias de los demás medios de cultivo.

GEY 20



Ilustración 23: Colonias de BAA GEY 20, después de ser incubadas por 48 h a 28 °C.

En la Ilustración 23 se observan colonias puntiformes planas de margen semicircular irregular, de apariencia lechosa blanquecina y húmedas.

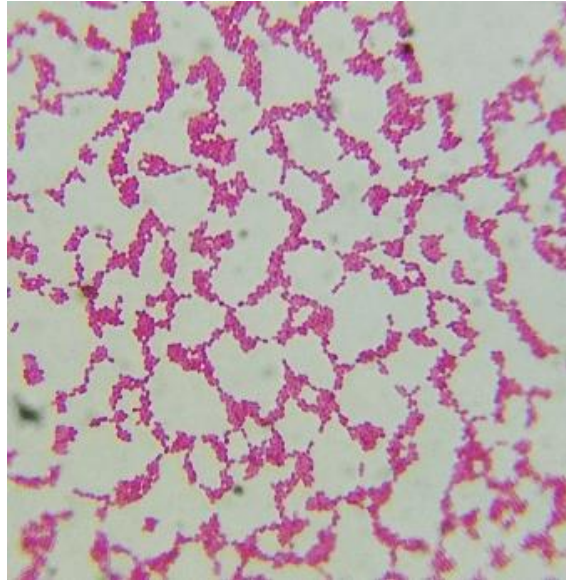


Ilustración 24: Micrografía simple de tinción de Gram, medio GEY 20 a 100x de aumento, realizadas a las 24 h de cultivo a 29°C.

En las micrografías mostradas en la Ilustración 24 se observan cocobacilos Gram negativos cortos. Se observa reproducción por fisión binaria.

En estudios realizados por Fernández-Pérez et al. (2018) y Numata et al. (2019), o estudios recopilados por Matsushita et al. (2016) demuestran que las cepas del género *Gluconacetobacter* (*Ga. Europaeus*, *Ga. Hansenii* y *Ga. xylinus*) o cepas del género *Komagataeibacter* son las cepas líderes más frecuentes en fermentaciones de vinagre por el método sumergido en una variedad de vinagres (vinagre de vino, sidra y alcohol) e incluso se ha logrado identificar en sistemas tradicionales, además, se consideran productores eficientes de ácido acético, son Gram negativos, su temperatura óptima de producción es de 28-30°C y se ha reportado que producen una película superficial de polisacáridos en fermentaciones estáticas (Vazquez et al., 2013).



Ilustración 25: Análisis microscópico de *Komagataeibacter xylinus* (Matsushita et al., 2016).

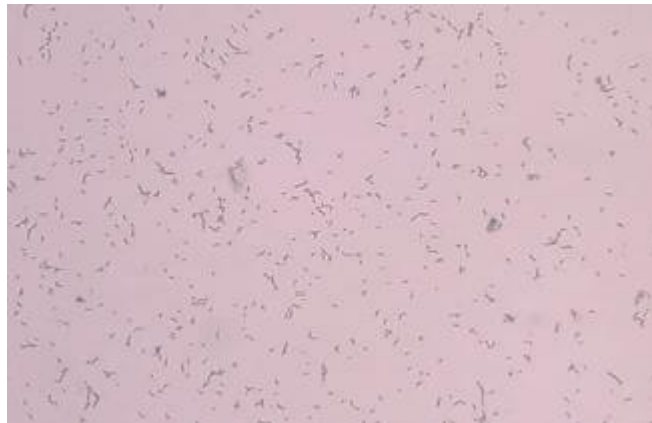


Ilustración 26: Micrografía 400X de *Gluconacetobacter xylinus* (Zhang et al., 2018).

Tomando en cuenta las micrografías presentadas en las Ilustraciones 25 y 26 de *Komagataeibacter* y *Gluconacetobacter xylinus* observamos la similitud de características morfológicas con las presentadas anteriormente, ya que de igual forma son bacilos cortos Gram negativos. Por lo tanto, no se descarta la posibilidad de que sea alguno de los mostrados anteriormente para el aislamiento de las bacterias inmersas en la Madre del vinagre.

La adición de carbonato de calcio (CaCO_3) a los medios GYC y GEY convierte a estos últimos en medios diferenciales para BAA, ya que pone en evidencia el metabolismo de la fuente de carbono (glucosa, etanol respectivamente) con producción de ácido acético, el cual disuelve el CaCO_3 , formando un halo transparente alrededor de la colonia (Gerard, 2015). Las especies que cumplen con esta característica y que además se encuentran entre las más comunes para fermentaciones de este tipo son *Gluconobacter*, *Komagataeibacter* y

Gluconacetobacter (Matsushita et al., 2016), corroborando que las cepas aisladas de bacterias son fermentadoras por producción de ácido acético, evidenciado por la formación de halos transparentes (Ilustraciones 19, 21 y 23),

3.3.2 Levaduras

Se observó el crecimiento de diferentes tipos de levaduras, las cuales se denotan con el nombre del medio de cultivo de mejor desarrollo seguido de un número consecutivo, éstas se describirán a continuación:

Levaduras ASN 1

Las levaduras denotadas como ASN 1 mostraron colonias circulares de agrupación irregular, con elevación umbilicada y margen ondulado, apariencia brillante y consistencia cremosa, la ilustración 27 muestra la apariencia colonial de ASN1.

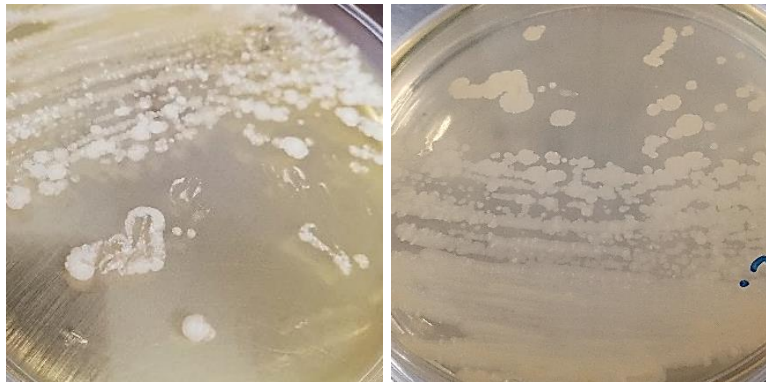


Ilustración 27: Colonias de levaduras ASN 1, después de ser incubadas por 48 h a 28 °C.

En la Ilustración 28 podemos observar microscópicamente las levaduras ASN 1, se observan levaduras de forma cilíndrica Gram positivas de tamaño mediano.

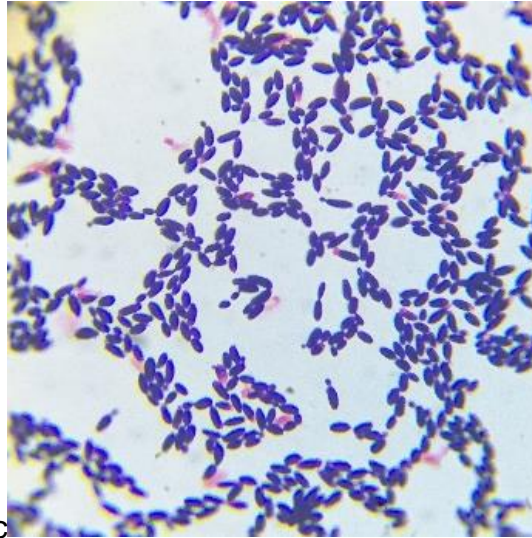


Ilustración 28: Microscopías simples de tinción de Gram, medio ASN 1, 100X de aumento, realizadas a las 24 h de cultivo a 29°C.

Levaduras ASN 2

El crecimiento de levaduras ASN 2 muestra colonias semicirculares de agrupación irregular, planas, de margen semicircular irregular, apariencia húmeda, opacas de color beige, la Ilustración 29 muestra la morfología colonial de ASN 2.

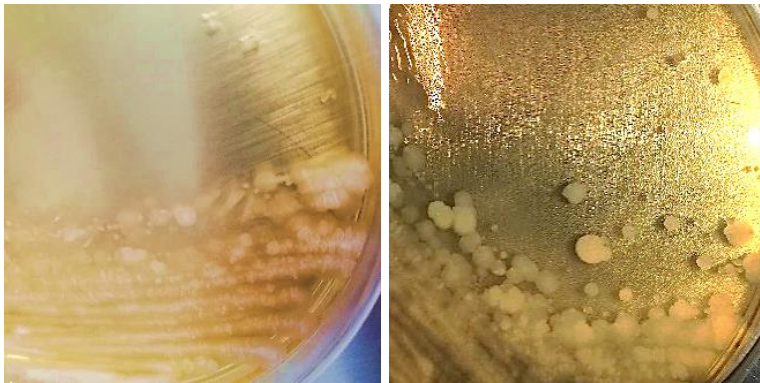


Ilustración 29: Colonias de levaduras ASN 2, después de ser incubadas por 48 h a 28 °C.

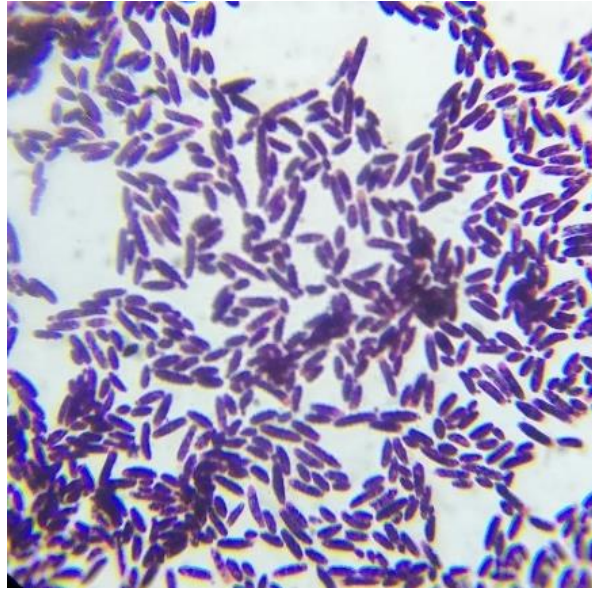


Ilustración 30: Micrografía simple de la tinción de Gram de ASN 2, con aumento 100X, realizadas a las 24 h de cultivo a 29°C.

En la Ilustración 30 se pueden observar las levaduras ASN 2 como levaduras Gram positivas, cilíndricas largas en comparación con cepa ASN 1, en un cultivo mixto.

PDA 1

Las levaduras PDA 1 muestran colonias pequeñas, circulares, convexas, de margen entero, con apariencia opaca y textura cremosa (Ilustración 31).

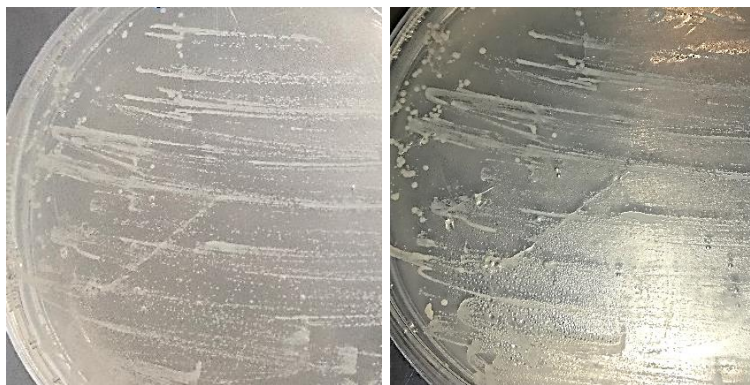


Ilustración 31: Colonias de levaduras PDA, después de ser incubadas por 48 h a 28 °C.

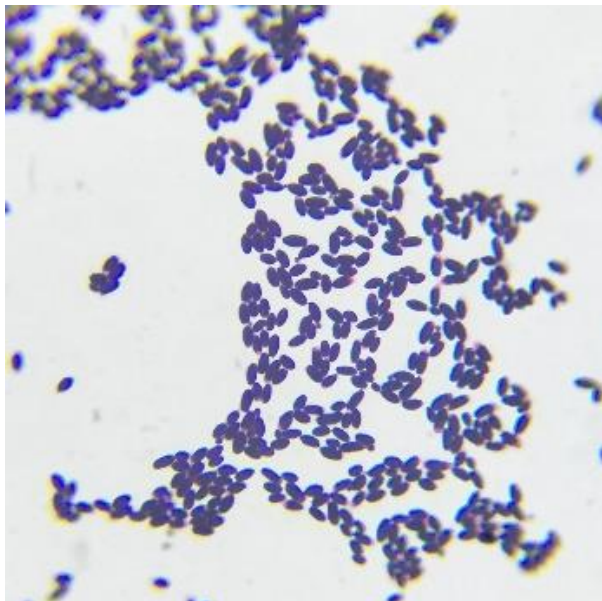


Ilustración 32: Micrografía simple de la Tinción de Gram de PDA 1 a 100X de aumento, realizadas a las 24 h de cultivo a 29°C.

Como se puede observar en la Ilustración 32, PDA 1 son levaduras Gram positivas elipsoidales.

Todas las levaduras observadas mostraron ser Gram positivas, debido a la composición de la pared celular de las levaduras, compuesta mayormente por polisacáridos (aproximadamente 90 %) del tipo de mananoproteínas y β -glucanos que retienen el cristal violeta (Ríos-Resendiz et al., 2018).

Según referencias bibliográficas, las levaduras pueden fermentar naturalmente los sustratos de manera escalonada o secuencial, en algunas ocasiones la responsable de iniciar esto es la levadura apiculada *Hanseniaspora*, seguido por levaduras elípticas del género *Sacharomyces*, otras levaduras que pueden ser encontradas durante la fermentación alcohólica natural son pertenecientes a los géneros *Candida*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomycodes*, *Torulaspota* y *Zygosaccharomyces* también son a veces encontrados durante la fermentación alcohólica natural (Ciani, Comitini and Mannazzu, 2008).

Considerando la morfología colonial y las observaciones al microscopio de las tinciones de Gram puede atribuirse la identidad de las levaduras a algunas

especies y géneros como *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces*, *Candida* y *Pichia*, siendo las más comunes en fermentaciones artesanales y capaces de producir etanol a partir de fuentes de carbono (López-Rojo et al., 2017), recalcando la muy probable presencia de la especie de *Saccharomyces cerevisiae* al ser tolerante a altas concentraciones de etanol (Beltran et al., 2002), así como su resistencia a bajos valores de pH, altas concentraciones de azúcar y condiciones anaerobias (Ciani, Comitini and Mannazzu, 2008).

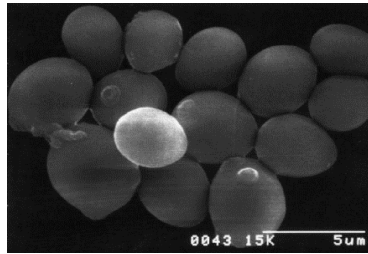


Ilustración 33: Microscopía electrónica de barrido de *Saccharomyces cerevisiae* (Solieri & Giudici, 2009).

Zygosaccharomyces entra en consideración como una posible identidad de las levaduras encontradas ya que desde su identificación se ha observado su presencia en diversas bebidas artesanales, además de tener un alta tolerancia a la presencia de azúcares (50-60%), una alta tolerancia a concentraciones de etanol (arriba del 18%), alta tolerancia a contenido de ácido acético (2.0-2.5%) y cierta resistencia a ácido sórbico y benzoico (arriba de 800-1000 mg/L) (Solieri, Cassanelli, & Giudici, 2007), cabe destacar que solo algunas especies entran en consideración, como *Z. bailii* o *Z. fermentati* (levaduras ovaladas y cilíndricas, respectivamente), ya que algunas especies podrían inhibir el crecimiento de otras bacterias o levaduras, como *Z. rouxii* (Romano & Suzzi, 1993; Kusumegi, Yoshida, & Tomiyama, 1998).



Ilustración 34: Micrografía con Tinción de Gram, a 1000X de aumento, *Candida boidinii* (Salazar Alvarez, 2017).

En cuanto a *Candida*, en un estudio reportado por Salazar Alvarez (2017) se encontró que *Candida boidinii* tenía presencia en una bebida fermentada, mostrando características morfológicas similares a las encontradas en el presente trabajo, mostradas en la Ilustración 33, siendo levaduras cilíndricas largas Gram negativas.

3.4 Caracterización del inóculo

3.4.1 Pruebas espectroscópicas

3.4.1.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros FT-IR obtenidos de la matriz del inóculo muestran bandas características de los componentes microbianos. Cada bacteria, tiene una pared celular y una membrana compleja las cuales dan una huella dactilar única en el espectro infrarrojo (Naumann et al., 1996), como lo son la capa de peptidoglicano, lipoproteínas, fosfolípidos, proteínas y lipopolisacáridos (Grewal et al., 2015). En la Tabla 11 se asignan las vibraciones correspondientes a las diferentes bandas encontradas en el espectros IR, para las 3 muestras siendo las capas superior, intermedia e inferior, representadas en la ilustración 34.

Tabla 11: Asignación de las vibraciones de los enlaces moleculares a los números de onda que se observan en los espectros IR de la ilustración 27.

Número de onda (cm ⁻¹)	Enlace	Autores
663.79	Zona de la huella dactilar (ADN)	(Kümmerle, Scherer, & Seiler, 1998) (Grewal, Jaiswal, & Jha, 2015).
777.62		
817.41		
866.76		
923.86	C-O-C, C-O	
1031.07		
1052.62		
1105.96		
1336.40	-CH ₂ - y -CH ₃	
1360.67	-CH ₃	
1545.28	Amida II, flexión -NH ₂	
1630.53	Amida I, -C=O	
2922.30	-CH ₃	

3341.54	-OH, -NH ₂	
---------	-----------------------	--

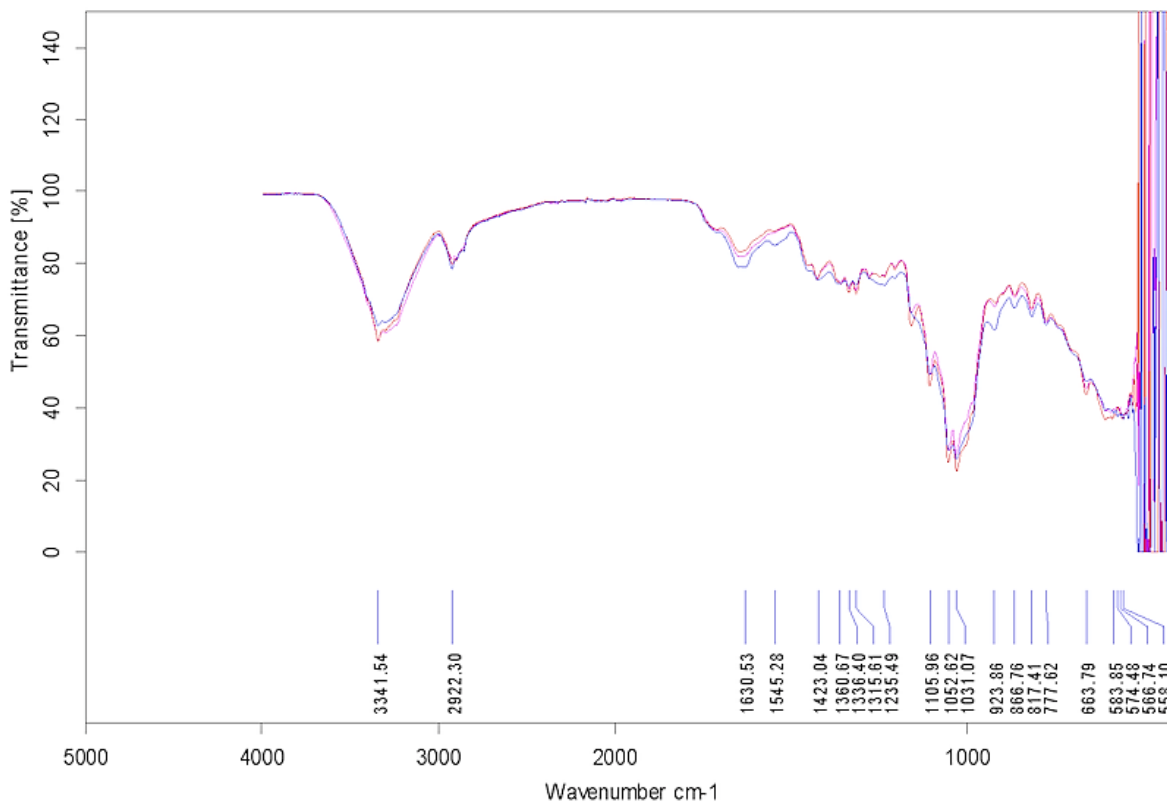


Ilustración 35: Espectros IR.

Es posible observar que los 3 espectros IR muestran bandas en las mismas posiciones, aunque en algunos casos a diferente intensidad, lo que únicamente indicaría diferente concentración del enlace del grupo funcional encontrado. Entre 600-900 cm^{-1} encontramos vibraciones que son específicas de los componentes presentes en cada muestra, entre 1200-1800 cm^{-1} se caracteriza por la presencia de grupos funcionales relacionados a grupos carboxílicos de proteínas, aminoácidos libres, polisacáridos, ADN/ARN y fosfolípidos (Naumann, 2001) característicos de la membrana de las bacterias, así como de componentes presentes en levaduras. De igual forma, se observa la presencia de las bandas correspondientes a la Amida I (1640 cm^{-1}) y Amida II (1540 cm^{-1}) relacionadas a los grupos funcionales carbonilo y amino respectivamente los cuáles son característicos del enlace peptídico de las proteínas (Kong & Yu, 2007).

3.4.1.2 Difracción de rayos X

La Ilustración 35 muestra los diagramas de la difracción de rayos X producida por las películas derivadas de los diferentes niveles de la matriz de la madre del vinagre. Después de la deconvolución de los difractogramas y teniendo en cuenta los valores de intensidad mostrados en los ángulos 14.60° , 16.32° y 22.57° en 2θ para cada una de las capas, se calculó el porcentaje de cristalinidad de la muestra tomando como una amplitud de área grande a 30° , siendo así la referencia de la celulosa amorfa; Se obtuvieron los valores de 80.75%, 81.97% y 79.32%, para superficie, centro y fondo, respectivamente, lo que arroja al final una cristalinidad promedio de 80.68%, siendo el total de la matriz del consorcio microbiano. La celulosa microbiana es un material semicristalino que generalmente produce tres picos cristalinos característicos mayores cuando se examina a través de DRX (Muhammad *et al.*, 2016), los cuales se muestran también en el estudio realizado por Vazquez *et al.* (2013) donde las características espectroscópicas y estructurales de celulosa bacteriana producida por una especie específica de bacteria del ácido acético (*Gluconacetobacter xylinus*), resultan en picos para $2\theta = 14.62^\circ$, 16.29° y 22.48° , similares a los obtenidos en el presente trabajo, confirmando que solo estaba presente celulosa I en todas las muestras. La celulosa I es la estructura cristalina con el módulo elástico axial más alto.

Numata *et al.* (2019) propusieron que la celulosa bacteriana tiene una alta cristalinidad (63-71%), por lo que las muestras tomadas de la madre del vinagre aquí estudiada presentan valores mayores de cristalinidad. Además, por medio de la ley de Bragg y la ecuación de Scherrer, fue posible calcular el tamaño del cristal en la muestra que era aproximadamente 3.264 nm, el valor promedio adecuado de acuerdo con la bibliografía (Rozenberga *et al.*, 2016).

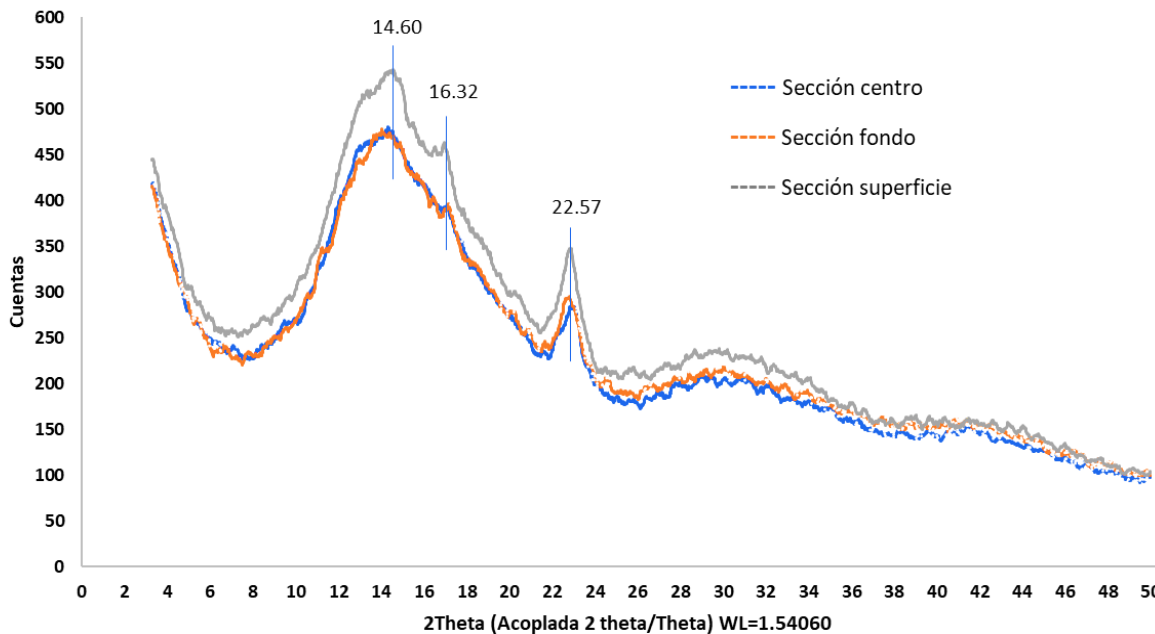


Ilustración 36: Patrones de Difracción de Rayos X de las secciones de la matriz "Madre del vinagre".

En un estudio realizado por Andelib-Aydin & Nuran (2010), el difractograma de rayos X de la muestra de celulosa bacteriana producida por una especie de bacteria productora de polisacáridos mostró similitud con el patrón de celulosa típico con picos adicionales en $2\theta=12.8^\circ$ y $2\theta=25.6^\circ$ que podrían atribuirse a la existencia de otros exopolisacáridos como levan, dextrano, acetan y glucano secretado por el microorganismo junto con la celulosa como productos secundarios, estos picos no aparecen en los difractogramas del presente trabajo, lo que nos indica que las bacterias no estarían secretando este tipo de polisacáridos que podrían afectar la pureza de la estructura de celulosa de la Madre del vinagre. Además, Andelib-Aydin & Nuran (2010) y Ho-Baek et al. (2014) mencionaron que, en sistemas agitados, el esfuerzo cortante provoca la formación de mutantes sin celulosa, lo que en consecuencia disminuye el rendimiento. Por lo tanto, es obvio que se requieren cepas o métodos de producción con mayores rendimientos para la comercialización de la producción de celulosa bacteriana.

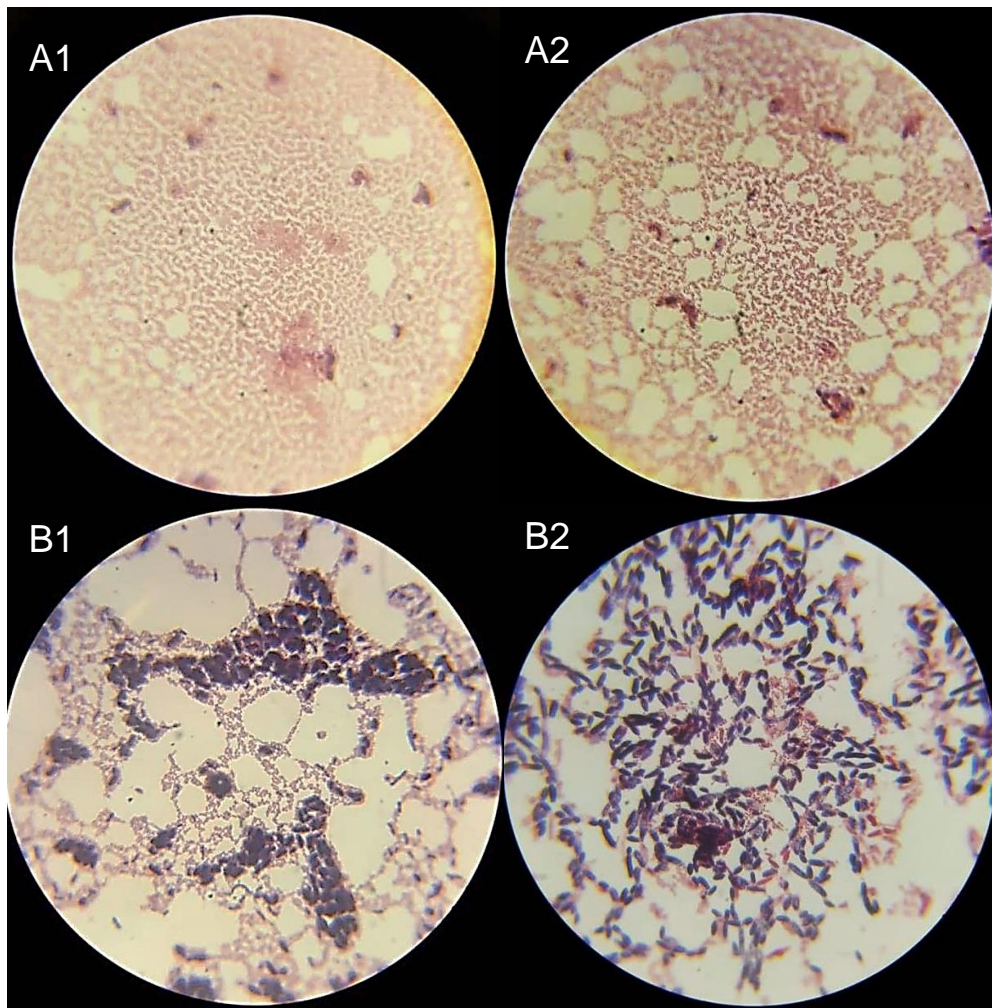
De acuerdo con la evaluación de rayos X de Weimer et al. (2000) se podría atribuir la presencia de *A. xylinum* en el sistema por su capacidad para sintetizar

celulosa cristalina durante el crecimiento en glucosa o sacarosa, cuando se encuentra en medios líquidos donde ya existen polisacáridos solubles en agua.

3.4.2 Pruebas ópticas

3.4.2.1 Microscopía óptica simple

Para continuar con la caracterización óptica del inóculo, se realizó la tinción de Gram de los tres diferentes niveles de este (centro, fondo y superficie), Ilustración 37.



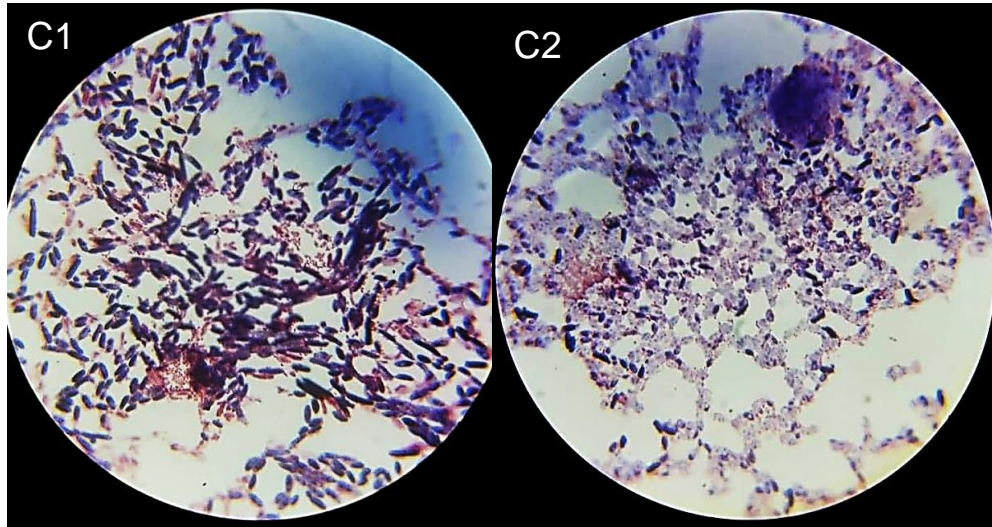


Ilustración 37: Micrografías simples de tinción de Gram del inóculo, A1), A2) Capa superior de la matriz; B1), B2) Capa intermedia; C1), C2) Capa inferior. Aumento 100X.

En las imágenes A1 y A2 referente a la capa superior de la matriz muestra un contenido de bacterias bacilares Gram negativas en su mayoría, con escasas levaduras cilíndricas y semi elipsoidales Gram positivas encontradas en todos los campos observados de la muestra. En la capa intermedia de la matriz (Imágenes B1 y B2) muestra una mayor presencia de los microorganismos observados en la capa superior, con un aparente equilibrio poblacional entre las levaduras y las bacterias, En las imágenes C1 y C2 de la capa inferior muestra mayor abundancia de levaduras, con un mínimo de bacterias. Las observaciones de las tinciones de Gram de cada capa analizada corroboran el papel de los grupos microbianos presentes en el proceso de fermentación, así como sus características metabólicas.

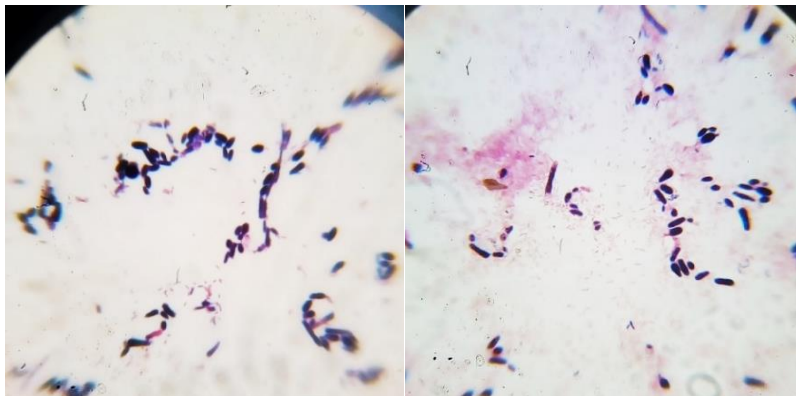


Ilustración 38: Microscopía simple, líquido de fermentación.

En lo referente a la tinción de Gram del líquido de fermentación como se observa en la Ilustración 38, las bacterias y levaduras se encuentran distribuidas en el líquido. se pueden observar bacterias bacilares Gram negativas y levaduras cilíndricas y elipsoidales Gram positivas.

3.4.2.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido permitió observar y corroborar la distribución de los grupos microbianos dentro de la matriz de celulosa. En la Ilustración 39, se pueden observar las microscopias generadas; la primera fila muestra el área de superficie de la matriz, en la imagen (A1) que está en una extensión de x2000 con una escala de 10 micras, muestra la presencia de bacterias bacilares de dos morfologías diferentes, a las que se les atribuye la identidad de bacterias acéticas; la imagen (A2) con una ampliación de x10,000 y una escala de un micrón mostró levaduras elipsoidales cubiertas por fibras de celulosa; La imagen (A3) con una ampliación de x20,000 muestra claramente las fibras que forman el biopolímero. La segunda fila de imágenes (B1), (B2) y (B3), respectivamente, muestran aproximaciones a los pliegues de la estructura de la capa central, donde se encontraron levaduras elipsoidales y cilíndricas, bacterias bacilares y estructuras fibrosas de diámetro micrométrico.

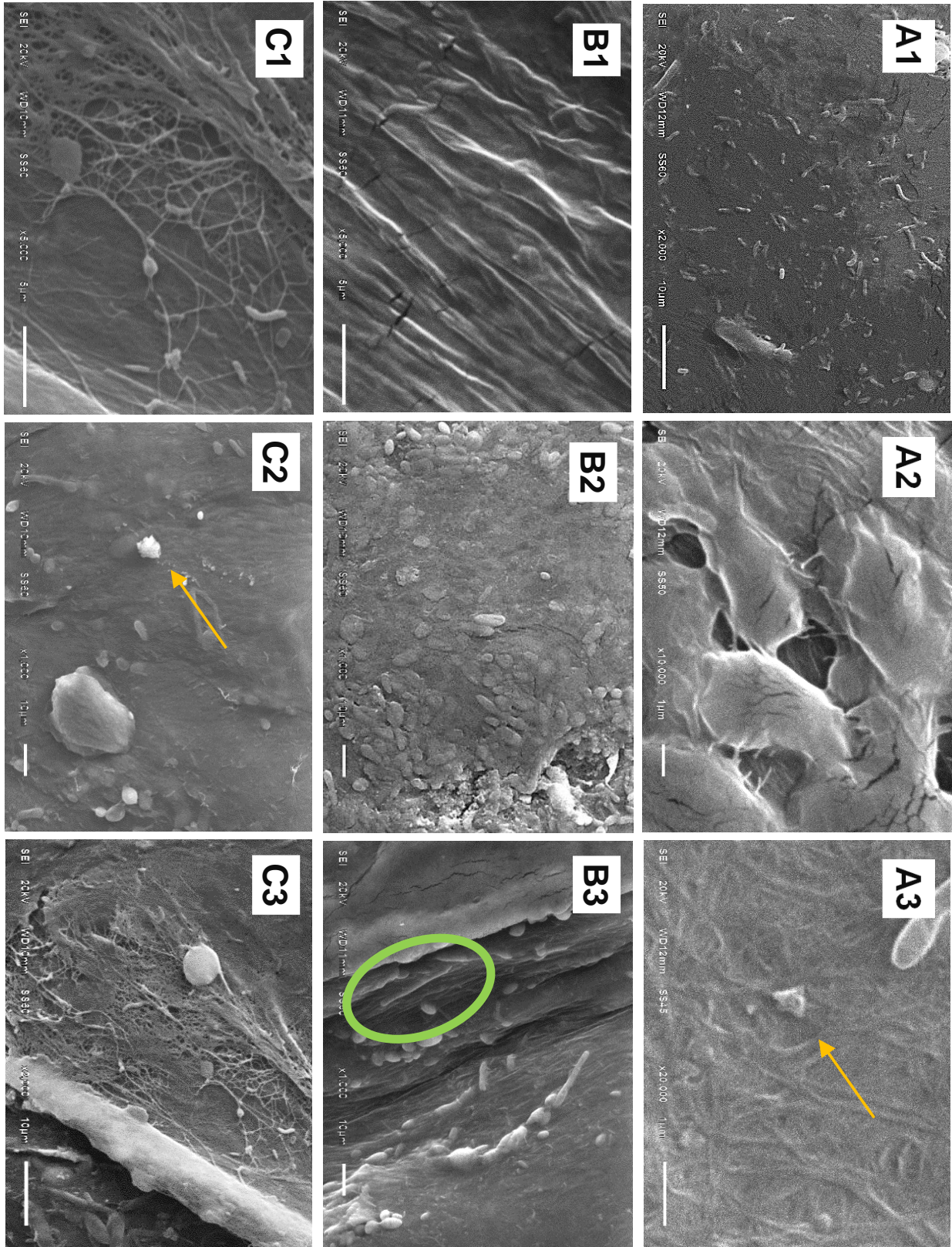


Ilustración 39: SEM (A1), (A2), (A3) capa superior. (B1), (B2), (B3) sección intermedia. (C1), (C2), (C3) capa inferior.

La tercera fila de imágenes correspondiente a la matriz inferior (C1), (C2) y (C3); Además de los microorganismos, dan una idea más clara de la conformación de la estructura al mostrar las fibras más sueltas. Estos resultados llevan a la conclusión de que los procesos biológicos de polimerización ocurren en el líquido de inmersión, debajo de las viejas capas de celulosa, donde se unen hasta que están súper enrollados y se forma la matriz. Con las últimas imágenes y su escala obtenida, procedimos a determinar el diámetro de las fibras que se logran observar en la micrografía SEM, resultando valores que van desde los 70 nm hasta los 210 nm, con un promedio de 140 nm por el número de mediciones; estos resultados no aseguran un valor para todas las fibras que conforman a la matriz, debido a que conforme se van polimerizando y soltando las fibras de celulosa, una vez arrojadas por la célula, comienza el proceso de superenrollamiento y empaquetamiento, aumentando el grosor y largo de las fibras; es decir, dependiendo la edad de cada fibra, será distinto su grosor (Vazquez et al., 2013).

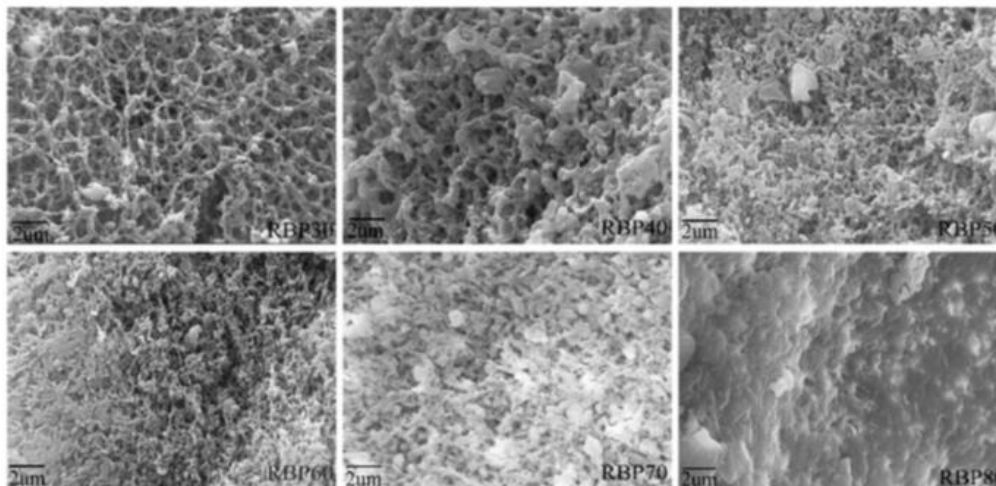


Ilustración 40: Imágenes SEM de polisacáridos obtenidos del rizoma de betullas a diferentes temperaturas (Long et al., 2019).

En la Ilustración 40, se observan micrografías SEM de polisacáridos extraídos del rizoma de betullas (orquídea terrestre), que es el extracto de un material médico chino tradicional compuesto de (1 → 2) α-D-manopiranososa enlazada con (1 → 4) glucopiranososa de β-D enlazada (Long et al., 2019), en la cual

la estructura de estos es similar a algunas de las redes que se pueden observar en las micrografías obtenidas en este trabajo, ya que se considera que algunos polisacáridos están siendo generados por los diferentes microorganismos presentes en la matriz (círculo color verde). Fimbres-Olivarría et al. (2016), obtuvieron geles de polisacáridos (glucosa, galactosa, ramnosa, manosa) y los analizaron por SEM, obteniendo las imágenes de la Ilustración 41, estas estructuras se pueden observar de igual forma en las micrografías obtenidas en este proyecto de investigación y las cuales se relacionan a la presencia de polisacáridos en la muestra (Flechas color amarillo).

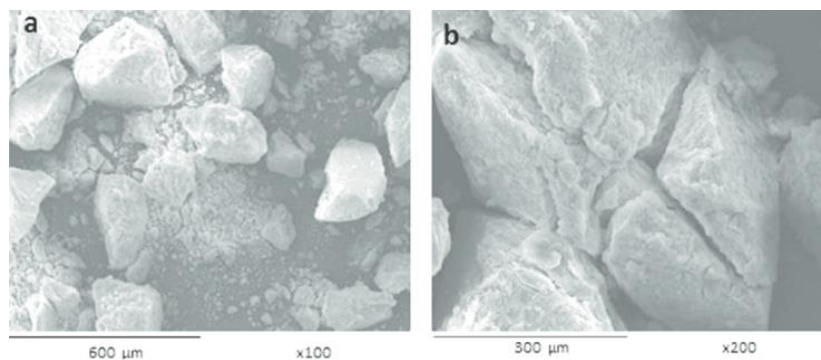


Ilustración 41: Imágenes SEM de polisacáridos liofilizados (Fimbres-Olivarría et al., 2016).

Se entiende que, después de la etapa inicial, la celulosa se genera solo en la cercanía de la superficie, porque la bacteria es aerobia. Mientras el sistema se mantiene sin sacudidas, el gel en forma de disco queda suspendido por la cohesión a la pared interior del vaso y se desliza hacia abajo a medida que se espesa (Budhiono et al. 1999). Proceso que a medida que ocurre, alcanza a atrapar a microorganismos en su interior, que serán los responsables de iniciar las fermentaciones y de reproducirse en fermentaciones posteriores donde se usen aquellas porciones de matriz como iniciadores. La Microscopía electrónica de barrido (SEM), corrobora la distribución microbiana observada en la microscopía óptica, ambas de acuerdo a los requerimientos nutricionales microbianos y al proceso de formación de la matriz, ya que entre mayor acercamiento tenga alguna capa de la matriz con el aire (superiores) es mayor el número de bacterias acéticas encontradas debido al carácter aerobio, mientras que a mayor profundidad existe abundancia de levaduras siguiendo su estado anaerobio en la fermentación.

3.4.2.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La microscopía de fuerza atómica (AFM) ofrece una nueva oportunidad para estudiar las estructuras superficiales de las células *in situ* a una resolución a nano escala. El proceso de adhesión superficial de bacterias a una superficie sólida es un paso crucial en la formación de una biopelícula (Liu, 2019). La técnica AFM se basa en la interacción entre una punta en voladizo afilada y la superficie de la muestra. La punta se mueve a través de la superficie a una cierta distancia (sin contacto) o directamente en contacto con ella (modo de contacto), dependiendo de las propiedades de la superficie a determinar. La propiedad más característica de AFM es que las imágenes en tiempo real se adquieren al sentir la superficie de la muestra sin usar luz. Se pueden obtener imágenes de topografías de superficie hasta una resolución de varias décimas de nanómetro. Por lo tanto, AFM ofrece una forma poderosa de examinar las propiedades superficiales de diferentes microorganismos (Liu & Yang, 2019). Gracias a la AFM, se pudo comprobar la capacidad de las levaduras y bacterias para adherirse a la matriz de celulosa, verificando la periferia del sustrato celular en contacto con la superficie, la interfaz célula-célula y la presencia de dichos microorganismos en las fibras.

Los estudios topográficos realizados en la matriz no arrojaron buenos resultados debido a la presencia de puntos con demasiada elevación; los diagramas cuadrangulares con estudios de fase a una escala de 6 nanómetros muestran la presencia de cilindros de levadura, bacterias en el centro y una red de pequeñas fibras por su sección transversal. A partir de estas imágenes, se colocaron 3 marcadores en el área de las fibras como se muestra en la segunda imagen de la Ilustración 42, que muestra un diagrama de elevación donde se determinó nuevamente el diámetro promedio de las fibras, pero esta vez en una escala mucho menor de alrededor de 55 nm; en este cálculo fue posible encontrar fibras incluso con valores inferiores a 25 nm lo que ha sido reportado en estudios previos con microorganismos específicos.

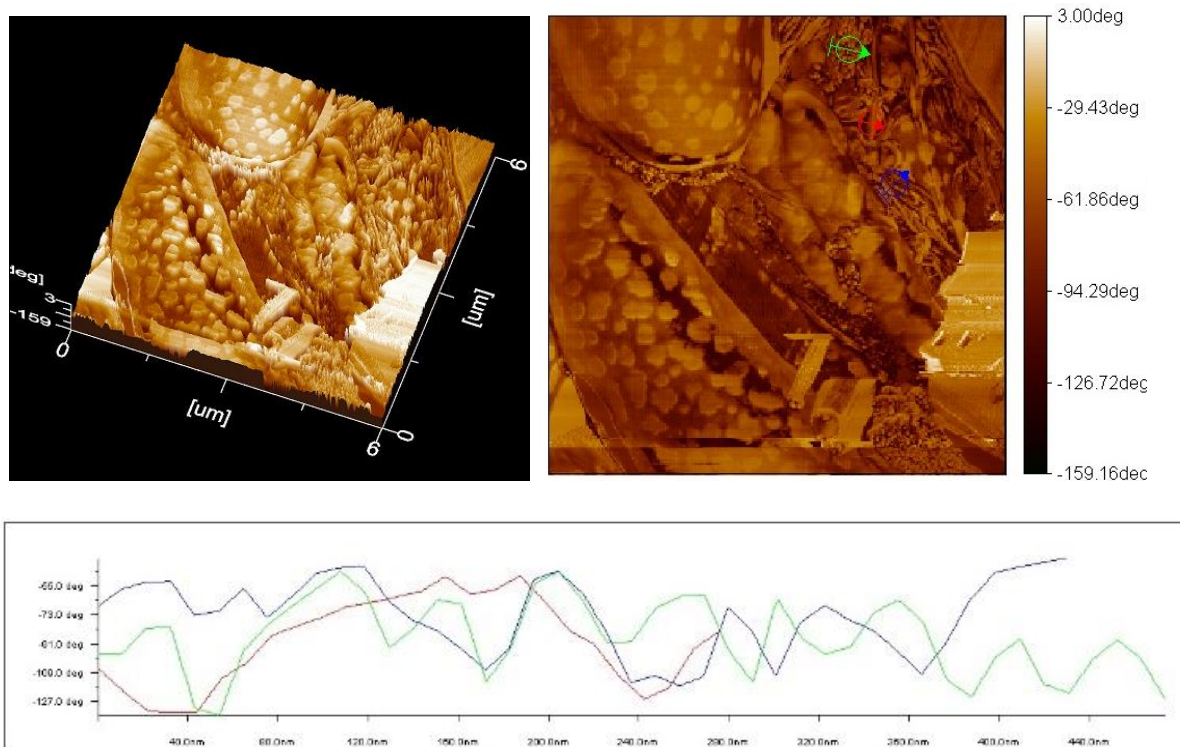


Ilustración 42: Diagramas de fase por difracción de rayos X y marcadores de medición por profundidad de fibras de celulosa

Durante la biosíntesis de las cadenas de celulosa, las fuerzas de Van Der Waals y el enlace de hidrógeno entre los grupos hidroxilo y los oxígenos de las moléculas adyacentes promueven el apilamiento paralelo de múltiples cadenas de celulosa que forman fibrillas elementales que se agregan en microfibrillas más grandes, con diámetros dentro de 2-20 nm y varias micras de longitud (Vazquez et al., 2013). Las imágenes topográficas se producen al mapear la distancia vertical por donde se mueve el escáner, ya que mantiene una amplitud de oscilación constante en cada punto (Liu & Yang, 2019).

Algunos estudios muestran diversos rangos nanométricos sobre el ancho o largo de las fibras de celulosa producidas, ya sea por consorcios microbianos, o bien, bacterias específicas; Machado et al. (2016) menciona que el tamaño promedio de las nanofibras en sus experimentos fue de alrededor de 150 ± 50 nm y 100 ± 25 nm para las membranas G-CB (Celulosa bacteriana producida por el género *Gluconacetobacter*) y K-CB (Celulosa bacteriana producida por el género

Komagataeibacter), respectivamente, cada nanofibra consiste en 2 a 5 fibrillas con un tamaño promedio inferior a 35 nm conectadas entre sí y en alguna ocasión retorcidas a lo largo del eje como consecuencia de su longitud. Hernández et al. (2018) obtuvo valores de diámetro con una variación de entre 78 y 250 nm, valores considerados altos en comparación con los que investigó en la literatura (2–21 nm). Además, Pigaleva et al. (2019) tomó imágenes AFM de películas "sucias" tomadas directamente del medio de cultivo y secadas al aire, las cuales no revelaron ninguna bacteria, por no mencionar las fibras de celulosa individuales, ya que su superficie estaba contaminada con componentes residuales del medio de cultivo, a pesar de eso, se revelaron fibrillas de celulosa individuales de 50–100 nm de espesor.

3.4.3 Evaluación de difusividad del agua en la matriz polimérica

Las curvas experimentales de secado de las placas de matriz se muestran en la Ilustración 43. Estos datos se usaron para evaluar la difusividad de humedad como se describe en la Sección 2.7. Las difusividades estimadas del agua se trazan en la Ilustración 44.

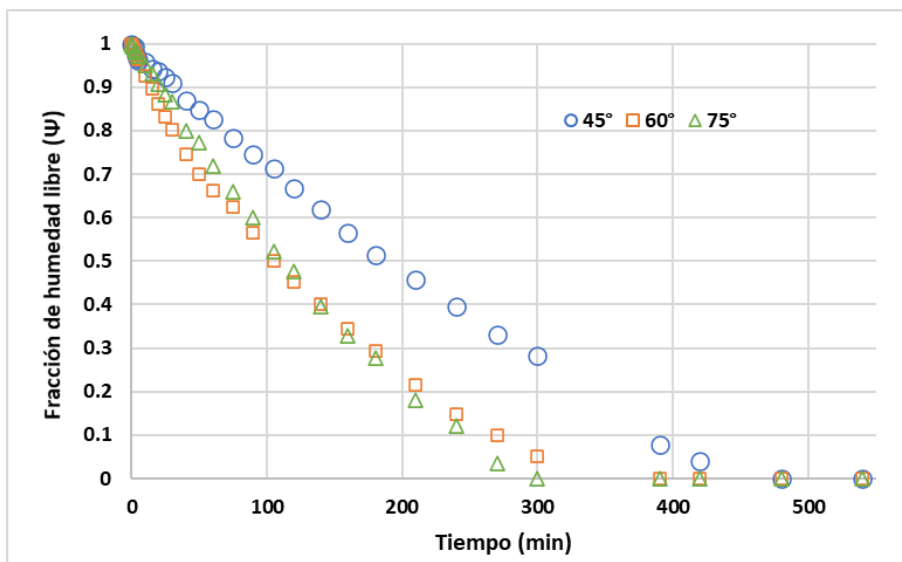


Ilustración 43: Reducción de la fracción de humedad de las placas de matriz a través del tiempo

El uso de temperaturas de secado más altas promovió una mayor movilidad del agua en el sistema alimentario, además, los datos de difusividad de humedad exhibieron un comportamiento donde en todas las temperaturas de secado, sus valores aumentaron a medida que disminuyó la fracción de humedad libre (Ilustración 44). Las difusividades del agua se resultaron 7.5×10^{-10} , 1.45×10^{-9} y $1.84 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ para procesos de secado a 45, 60 y 75 °C, respectivamente. Notando la reducción significativa del tiempo cuando el proceso de secado se completa en 420 minutos a 45°C y a 270 min a 75°C.

Los datos de difusividad de la humedad exhibieron un comportamiento inestable en todas las temperaturas de secado, donde sus valores disminuyeron a medida que disminuyó la fracción de humedad libre (Ilustración 44), mostrando una disminución después del valor inicial y subiendo de manera gradual hasta llegar a un punto máximo entre $\Psi=0.1$ y $\Psi=0$.

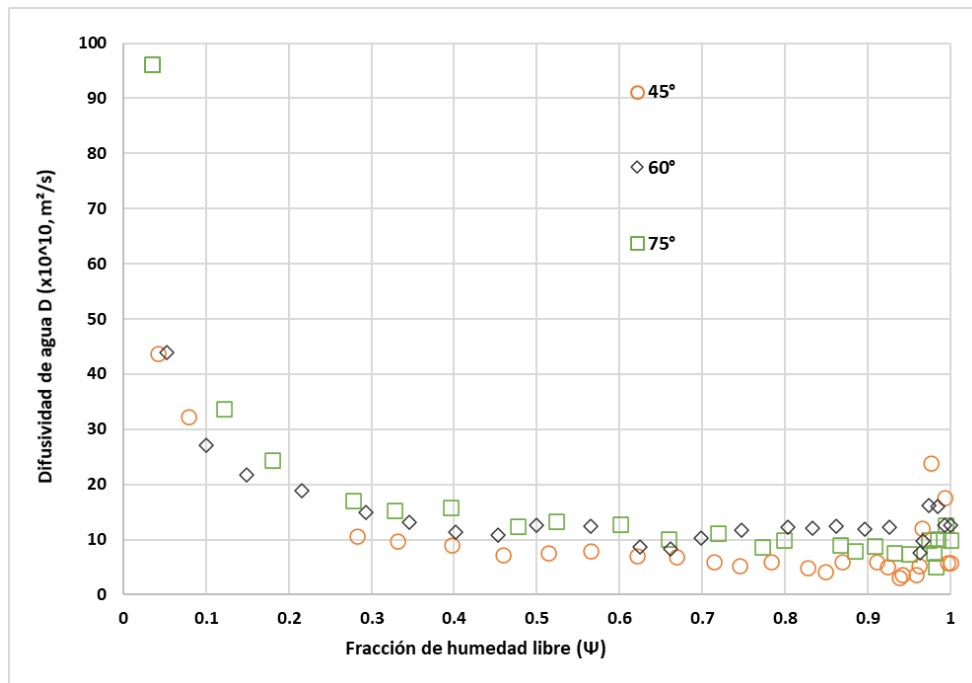


Ilustración 44: Cambio de la difusividad de agua respecto a la fracción de humedad.

El aumento de la difusividad marcada al final del gráfico (ilustración 44), entre los valores de 0.3 y 0 de fracción de humedad libre se puede deber a que los datos

de difusividad de la humedad exhibieron un comportamiento inestable, que es derivado de la disminución del volumen de las muestras y el proceso de encogimiento, por lo que se considera a ese cambio como un efecto artificial o un error derivado del uso del método ya mencionado.

De acuerdo con los resultados de difusividad promedio del agua a través de la matriz polimérica, se trató de visualizar un posible panorama del punto de incidencia de la fermentación de los azúcares específicamente en el cuerpo de dicha matriz; se llegó a la conclusión de que al encontrarse en rangos de 10^{-10} y 10^{-9} (valores mínimos) se dificulta que el proceso se lleve a cabo de manera interna dejando en claro un proceso superficial, o bien, sin posible penetración del sustrato.

Pikington et al. (1998) menciona que la concentración de metabolitos en la vecindad inmediata de las células puede verse alterada en los sistemas celulares inmovilizados debido a limitaciones de transferencia de masa tanto internas como externas, como es el caso recién mencionado del presente trabajo en el interior de la matriz. Además, tales cambios pueden obligar a las células a alterar sus estados metabólicos y, por lo tanto, afectar la eficiencia y la calidad de un proceso de fermentación; lo que nos lleva a pensar que es la razón por la que (de acuerdo con el apartado 3.4.2.1 Microscopía óptica simple) las densidades de población observadas en el estudio realizado a distintas capas de la matriz mostraron grupos de células más grandes en las zonas cercanas a la superficies de la matriz expuestas al líquido de fermentación. Al no alcanzar el sustrato a difundirse y no cumplir con los requerimientos metabólicos celulares, las bacterias se agrupan y reproducen en la periferia, dejando en el interior solo a aquellas que quedan embebidas durante el proceso de polimerización de la celulosa bacteriana, aumentando esta situación según el tamaño de la matriz.

Conclusiones

- La optimización de la fermentación artesanal para obtención de vinagre a partir del inóculo conocido como “Madre del vinagre”, muestra como condiciones óptimas 15°Brix como concentración del sustrato y 29°C de temperatura, en un tiempo aproximado de 35 días, logrando un producto con características dentro de la normativa nacional e internacional.
- Mediante la determinación de los parámetros fisicoquímicos propios de la fermentación (Acidez total, acidez fija, acidez volátil, °Brix, densidad, %ART, %ARD y %ANR), se observó una falta de reproducibilidad de los experimentos cuando se usan porciones del inóculo ya usados para pruebas anteriores, también se obtuvieron valores de rendimiento de 58.11% para la primer prueba de fermentación y un 46.60% para la segunda, los cuales resultaron adecuados según lo reportado en literatura; se observaron de valores de productividad adecuados con las fases de la fermentación.
- Con respecto a la caracterización microbiológica del inóculo, de acuerdo con los resultados observados se considera que las bacterias presentes cumplen con las características de las BAA del género *Gluconacetobacter* (*Ga. Europaeus*, *Ga. Hansenii* y *Ga. xylinus*), género *Komagataeibacter* (*K. xylinus*) y género *Gluconobacter*. Las levaduras encontradas son sugerentes del género *Zygosaccharomyces* (*Z. bailii*, *Z. fermentati*), *Candida boidinii* y *Saccharomyces cerevisiae*.
- El estudio espectroscópico (DRX y FT-IR) de la estructura de la matriz corroboran la composición de la matriz a base de celulosa, al ser comparados los espectros y los difractogramas con lo reportado en la bibliografía, es importante mencionar que dicha celulosa tiene un arreglo cristalino en su mayoría. Los resultados de cristalinidad son consistentes con la composición de Celulosa tipo I producida principalmente por *Gluconacetobacter xylinus*.
- Las pruebas ópticas (Microscopía óptica simple, SEM y AFM) corroboran la presencia de BAA y levaduras, así como su distribución en la matriz, existiendo mayor número de BAA hacia la superficie aérea y aumentando el

número de levaduras hacia la cara inferior de la matriz. Las pruebas de SEM y AFM brindan información que ayuda a comprender la formación de la matriz, como un polímero conformado por fibras que al inicio son liberadas por la célula (observadas desde los 2 nm de diámetro hasta los 210 nm) las que posteriormente proceden a un superenrollamiento y empaquetamiento que permite la creación de las películas superficiales en el líquido de fermentación, estas continuarán engrosando y atrapando a los microorganismos dentro de ella.

- La evaluación de la difusividad de agua sirvió para darnos la idea del proceso de difusión del sustrato hacia el interior de la matriz y comprobar si el proceso se llevaba a cabo de manera interna. Ahora se puede asegurar (junto con los resultados de las pruebas ópticas) que la matriz no sirve como un medio de fermentación interna, únicamente es el medio de transporte y hábitat parcial de los microorganismos que contiene.

En base a todo lo mencionado anteriormente se llega a la conclusión de que se llegó a la optimización del proceso artesanal de fermentación para la producción de vinagre con características aptas para entrar en normatividad nacional e internacional y se logró estudiar el inóculo empleado “Madre del vinagre” caracterizando su estructura y visualizando su diversidad microbiana.

Perspectivas del proyecto

- Al observar que el empleo de una misma porción del inóculo “Madre del vinagre” durante fermentaciones consecutivas puede generar variaciones en cuanto a los tiempos de fermentación y la capacidad de esta, pudiendo deberse a la variaciones generadas en la densidad poblacional de los microorganismos durante las fases de la fermentación; se propone investigar un método que permita la mayor homogeneidad posible de la microbiota en el inóculo y permita la reproducibilidad de las fermentaciones.

Referencias

- Ancizu, M. (2002). El vinagre en México. *Embajada de España en México. Oficina Económica y Comercial.*
- Andelib-Aydin, Y., & Nuran, D. (2010). Utilization of vinegar for isolation of cellulose producing acetic acid bacteria. *American Institute of Physics*, 340-348.
- Andres-Barrao, C., & Barja, F. (2008). Characterization of bacterial population during spirit vinegar production. *Abstract 2nd international conference on acetic acid bacteria*, 68.
- Arranza, F., Jiménez-Ariza, T., Diezma, B., & Correa, E. (2017). Determination of difusión and convective transfer coefficients in food drying revisited: A new methodological approach. *Biosystems engineering*, 30-39.
- Aykun, E., Budak, N., & Guzel-Seydim, Z. (2014). Bioactive components of Mother of vinegar. *Journal of the american college of nutrition*, 80-89.
- Bahavna, V., & Satish, V. (2014). Physical, structural, mechanical and thermal characterization of bacterial cellulose by *G. hansenii* NCIM 2529. *Carbohydrate Polymers*, 132-141.
- Banga, J., & Singh, R. (1994). Optimization of air drying of food. *Journal of Food Engineering*, 189-211.
- Beltran, G., Torija, M., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J., . . . Mas, A. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *System. Appl. Microbiol.*, 287-293.
- Bourgeois, J., & Barja, F. (2009). The history of vinegar of its acetification systems. *Arch. Sci.*, 147-160.
- Budhiono, A., Rosidi, B., Taher, H., & Iguchi, M. (1999). Kinetic aspects of bacterial cellulose formation in nata-de-coco culture system. *Carbohydrate Polymers*, 137-143.
- Burmester, K., & Eggers, R. (2010). Heat and mass transfer during the coffe drying process. *Journal of Food Engineering*, 430-436.
- Carballo Cabrera, A., Cortés Lechuga, J., Herrera Caro, J., Hernández Navarro, G., Olivelia Alberto, G., & Vega Fernández, S. (2007). *Proyecto de exportación de vinagre de plátano a España*. Xalapa de Enriquez, Veracruz: Universidad Veracruzana.
- Casner, O. A. (2005). *Obtención de Condiciones de Elaboración de Vinagre de Arándanos (Vaccinium corymbosum) usando una torta de prensa*. Chile: Universidad Austral de Chile.
- Catalán-Garrido, J., & García-Guerra, C. (2016). *Evaluación a nivel laboratorio de la capacidad fermentativa de los granos de tibicos utilizando como sustrato único el jugo del eje de la inflorescencia de la piña (Ananas comosus) para ser aprovechado como posible bebida probiótica*. Guatemala: Universidad de San Carlos.
- Chapra, S., & Canale, R. (2007). *Métodos numéricos para ingenieros*. México D.F.: McGraw-Hill Interamericana.
- Ching-Ting, K., Chin-Wai, H., Jin-Wei, A., Azwan, L., SHazrul, F., & Seng-Joe, L. (2018). Chemical changes and optimization of acetous fermentation time and

- Mother of Vinegar concentration in the production of vinegar-like fermented papaya beverage. *Sains Malaysiana*, 2017-2026.
- Ciani, M., Comitini, F., & Mannazzu, I. (2008). Fermentation in ecological processes. *Elsevier B.V.*
- Colvin, J., Takai, M., Sowden, L., & Hayashi, J. (1992). Cellulose component of *Acetobacter xylinum* pellicle: morphology and its significance for the mechanism of microfibril formation. *Int. J. Biol. Macromol.*, 243-246.
- Comisión Codex Alimentarius. (2000). *Norma regional para el Vinagre. CODEX STAN 162-1987*. Obtenido de http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCEURO/cceuro22/cl00_18s.pdf
- Conner, H. (1999). Vinegar: Its History and Development. *Department of Physical Sciences, Northern Kentucky University*, 82-127.
- Contreras Monzón, C. (2006). *Influencia del método de secado en parámetros de calidad relacionados con la estructura y el color de manzana y fresa deshidratadas*. Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia.
- De Maria, G. (2004). Panela: the natural nutritional sweetener. *European Journal of Nutraceuticals and functional foods*, 44-48.
- De Vuyst, L. (2000). Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technol Biotechnol*, 105-112.
- Dirección general de normas. (1978). *NMX-F-312-1978. Determinación de reductores directos y totales en alimentos. Method of test for total and direct reducing substances in food*. Normas Mexicanas.
- Dirección General de Normas. (1981). *Norma Oficial Mexicana NOM-V-32-S.1980. Bebidas Alcohólicas.- Determinación de densidad relativa*. DOF-Diario Oficial de la Federación.
- Esa, F., Tasirini, S., & Rahman, N. (2014). Overview of bacterial cellulose production and application. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 113-119.
- Fernández-Pérez, R., Torres, C., Sanz, S., & Ruiz-Larrea, F. (2018). Strain typing of acetic acid bacteria responsible for vinegar production by the submerged elaboration method. *Food Microbiology*, 973-978.
- Fimbres-Olivarría, D., López-Elías, J., Carvajal-Millan, E., Márquez-Escalante, J., Martínez-Córdoba, L., Miranda-Baeza, A., . . . Brown, F. (2016). Navicula sp. Sulfated polysaccharide gels induced by Fe (III): Rheology and microstructure. *International journal of molecular sciences*, 17.
- Fowler, C., & Subramaniam, V. (1923). *J. Indian Inst. Sci. En C. J. Fowler, & V. Subramaniam*.
- García, J. M., Narváez, P. C., Heredia, F. J., Orjuela, Á., & Osorio, C. (2017). Physicochemical and sensory (aroma and colour) characterization of a non-centrifugal cane sugar ("panela") beverage. *Food Chemistry*, 7-13.
- Gerard, L. (2015). *Caracterización de bacterias del ácido acético destinadas a la producción de frutas*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Grewal, M., Jaiswal, P., & Jha, S. (2015). Detection of poultry meat specific bacteria using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Journal of Food Science & Technology*, 3859-3869.

- Grigolato, J. (2013). *Análisis de factibilidad de producción y comercialización de vinagre a partir de mermas de cerveza*. Argentina: Universidad Nacional de Litoral.
- Guillamón, J., & Mas, A. (2014). Acetic Acid Bacteria. En J. Guillamón, & A. Mas. Madrid, España: Departamento de biotecnología de Alimentos. Universitat Rovira i Virgili.
- Gullo, M., Zanichelli, G., Verzelloni, E., Lemmetti, F., & Giudici, P. (2016). Feasible acetic acid fermentations of alcoholic and sugary substrates in combined operation mode. *Process Biochemistry*, 1129-1139.
- Hernandez, C., Ferreira, F., & Rosa, D. (2018). X-ray powder diffraction and other analyses of cellulose nanocrystals obtained from corn straw by chemical treatments. *Carbohydrate polymers*, 39-44.
- Ho, C., Lazim, A., Fazry, S., Hj-Hussain-Zaki, U., & Lim, S. (2017). Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: A review. *Food Chemistry*, 1621-1630.
- Ho-Baek, C., Park, E.-H., Yeol-Baek, S., Jeong, S.-T., Kim, M.-D., Kwon, J.-H., . . . Yeo, S.-H. (2014). Characterization of *Acetobacter pomorum* KJY8 isolated from Korean Traditional Vinegar. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 1679-1684.
- Hoiby, N. (2014). A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infection. *Pathogens and Disease*, 205-211.
- Hosaku, Y., Halász, K., Horváth, M., Csóka, L., & Djokovic, V. (2017). ATR-FTIR study of the interaction of CO₂ with bacterial cellulose-based membranes. *Chemical Engineering Journal*, 83-92.
- Illabaca, C., Navarrete, P., Mardones, P., & Mas, A. (2008). Application of culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. *International Journal of Food Microbiology*, 245-249.
- Joint FAO/WHO Food Standards Programme. (1998). *Fermented Fruits and Vegetables: A Global Perspective*. Obtenido de Fermented Fruits and Vegetables: A Global Perspective: www.fao.org
- Joslyn, M. (1970). Kirk-Othmer. *Encycl. Chem. Technol.*, 254-269.
- Ju, X., Bowden, M., Brown, E., & Zhang, X. (2015). An improved X-ray diffraction method for cellulose crystallinity measurement. *Carbohydrate Polymers*, 476-481.
- Juniao, W., & Shaoping, N. (2019). Application of atomic force microscopy in microscopic analysis of polysaccharide. *Trends in Food Science & Technology*, 35-46.
- Kong, J., & Yu, S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 549-559.
- Kortlandt, F. (2002). *The Origin of the Goths*. Obtenido de The Origin of the Goths: at www.kortlandt.nl/publications/art198e.pdf
- Kümmerle, M., Scherer, S., & Seiler, H. (1998). Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 2207-2214.

- Kusumegi, K., Yoshida, H., & Tomiyama, S. (1998). Inhibitory effects of acetic acid respiration and growth of *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 213-217.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci Technol*, 67-78.
- Li, S., Li, P., Feng, F., & Luo, L.-X. (2015). Microbial diversity and their roles in the vinegar fermentation process. *Appl Microbiol Botechnol*, 4997-5024.
- Li, Y., He, D., Niu, D., & Zhao, Y. (2015). Acetic acid production from food wastes using yeast and acetic acid bacteria micro-aerobic fermentation. *Bioprocess Biosyst Eng*, 863-869.
- Liu, Q. (2019). Application of atomic force microscopy in food microorganisms. *Trends in Food Science & Technology*, 73-83.
- Liu, Q., & Yang, H. (2019). Application of atomic force microscopy in food microorganism. *Trends in Food Science & Technology*, 73-83.
- Long, X., Yan, Q., Peng, L., Liu, P., & Luo, X. (2019). Effect of various temperatures on *bletillae* rhizome polysaccharide extraction and physicochemical properties. *Applied Sciences*, 1-12.
- López-Jacome, E. (2014). Las tinciones básica en el laboratorio de microbiología. *Mediagraphic*, 10-18.
- López-Legarda, X., Taramuel-Gallardo, A., Arboleda-Echavarría, C., Segura-Sánchez, F., & Restrepo-Betancur, L. (2017). Comparación de métodos que utilizan ácido sulfúrico para la determinación de azúcares totales. *Revista Cuabana de Química*, 180-198.
- López-Rojo, J., García-Pinilla, S., Hernández-Sánchez, H., & Cornejo-Mazón, M. (2017). Estudio de la fermentación de kéfir de agua de piña con tibicos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 405-414.
- Machado, R. T., Gutierrez, J., Terjak, A., Trovatti, E., Uahib, F. G., Moreno, G., . . . Barud, H. (2016). *Komagataeibacter rhaeticus* as an alternative bacteria for cellulose production. *Carbohydrate polymers*, 841-849.
- Masciotti, M. M. (2014). *Panela: Propiedades, información y aceptación*. Buenos Aires: Universidad Fasta.
- Matsushita, K., Tomaya, H., Tonouchi, N., & Okamoto-Kainuma, A. (2016). *Acetic Acid Bacteria: Ecology and Physiology*. Japan: Springer.
- Ministerio de la presidencia. (2012). *Norma de calidad para la elaboración y comercialización de los vinagres*. España: BOE Legislación consolidada.
- Mitchell, C. (1926). *Vinegar: Its Manufacture and Examination*. London: Griffin.
- Moon, R., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., & Youngblood, J. (2010). Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chem Soc Rev*, 3941-3994.
- Moonmangmee, S., Kawabata, K., Tanaka, S., & Toyama, H. (2001). A novel polysaccharide involved in the pellicle formation of *Acetobacter aceti*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 192-200.
- Muhammad, W. U., Mazhar, U.-I., Shaukat, K., Yeji, K., & Joong, K.-P. (2016). Structural and physico-mechanical characterization of bio-cellulose produced by a cell-free system. *Carbohydrate Polymers*, 908-916.

- Muñoz-Malajovich, M. (2008). *Biotecnología y vida cotidiana: Vinos y vinagres*. Argentina: ArgenBio.
- Nakagaito, A., Iwamoto, S., & Yano, H. (2005). Bacterial cellulose: the ultimate nanp-scalar cellulose morphology for the production of high-strenght composites. *Appl. Phys. A*, 93-97.
- Naumann, D. (2001). Ft-infrared and FT-Raman spectroscopy in biomedical research. *Applied Spectroscopy Reviews*, 239-298.
- Naumann, D., Schultz, C., & Helms, D. (1996). What can infrared spectroscopy tell us about the structure and composition of intact bacterial cells. *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*, 279-310.
- Normas Oficiales Mexicanas. (1994). *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-110-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. PREPARACIÓN Y DILUCIÓN DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO*. DOF-Diario Oficial de la Federación.
- Numata, Y., Kono, H., Mori, A., Kishimoto, R., & Tajima, K. (2019). Structural and rheological characterization of bacterial cellulose gels obtained from *Gluconacetobacter* genus. *Food Hydrocolloids*, 233-239.
- OEC. (2017). *The Observatory of Economic Complexity OEC*. Obtenido de The Observatory of Economic Complexity OEC: https://oec.world/es/visualize/tree_map/hs92/import/mex/show/2209/2017/
- Organización internacional de la viña y el vino. (2018). *Normas y documentos técnicos - OIV*. Obtenido de Normas y documentos técnicos - OIV: <http://www.oiv.int/es/normas-y-documentos-tecnicos>
- Peters, B., Mientus, M., Kostner, D., Daniel, R., Liebl, W., & Ehrenreich, A. (2017). Expression of membrane-bound dehydrogenases from a mother of vinegar metagenome in *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 7901-7912.
- Pigaleva, M., Bulat, M., Gromovykh, T., Gavryushina, I., Lutenseko, S., Gallyamov, M., . . . Kiselyova, O. (2019). A new approach to purification of bacterial cellulose membranes: What happens to bacteria in supercritical media? *The Journal of Supercritical Fluids*, 59-69.
- Pikington, P., Margaritis, A., & Mensour, N. (1998). Mass transfer characteristics of immobilized cells udes in fermentation processes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 237-255.
- Querol, A., & Fleet, G. (2006). *Yeast in food and beverages*. Berling Heidenberg, Germany: Springer.
- Querol, A., & Fleet, G. (2006). *Yeast in Food and Beverages: The Yeast Handbook*. Heidelberg, Berlin: Springer.
- Rios Resandiz, Y., Trejo Márquez, M., Lira Vargas, A., & Pascual Bustamante, S. (2018). Aprovechamiento de levaduras enológicas nativas no-saccharomyces para su uso como agentes fermentativos en elaboración de cerveza artesanal. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y tecnología de alimentos*, 108-113.
- Romano, P., & Suzzi, G. (1993). Higher alcohol and acetoin production by *Zygosaccharomyces* wine yeast. *Journal of Applied Biotechnology*, 541-545.

- Rozenberga, L., Skute, M., Belkova, L., Inese, S., Vikele, L., Semjonovs, P., . . . Peagle, L. (2016). Characterisation of films and nanopaper obtained from cellulose synthesised by acetic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers*, 33-40.
- Rubio-Fernández, H., Salvador, M. D., & Fregapane, G. (2004). Influence of fermentation oxygen partial pressure on semicontinuous acetification for wine vinegar production. *Eur Food Technol*, 393-397.
- Ruiz-López, I. (2012). Analytical model for variable moisture diffusivity estimation and drying simulation of shrinkable food products. *Journal of Food Engineering*, 427-435.
- Ruiz-López, I., Ruiz-Espinosa, H., Arellanes-Lozada, P., Bárcenas Pozos, M., & García-Alvarado, M. (2012). Analytical model for variable moisture diffusivity estimation and drying simulation of shrinkable food products. *Journal of Food Engineering*, 427-435.
- Salazar Alvarez, L. G. (2017). *Aislamiento y caracterización de microorganismos durante el proceso de fermentación de Theobroma Cacao*. Lima, Peru: Universidad Peruana Cayetano Heredia.
- Sha, L., Pan, L., Feng, F., & Li-Xin, L. (2015). Microbial diversity and their roles in the vinegar fermentation process. *Appl Microbiol Biotechnol*, 4997-5024.
- Sievers, M., Sellmer, S., & Tcuber, M. (1992). *Acetobacter europaeus* sp. nov., a main component of industrial vinegar fermenters in central Europe. *Syst Appl Microbiol*, 386-392.
- Singh, R., & Heldman, D. (2009). *Introduction to Food Engineering*. China: Elsevier Inc.
- Soklek, J., Hertel, C., & Hammes, W. (1998). Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. *Int J Syst Bacteriol*, 935-940.
- Solieri, L., & Giudici, P. (2009). *Vinegars of the World*. Verlag, Italia: Springer.
- Solieri, L., Cassanelli, S., & Giudici, P. (2007). A new putative *Zygosaccharomyces* yeast species isolated from traditional balsamic vinegar. *Yeast*, 24: 403-417.
- Tajima, H., Penttila, P., Imai, T., Yamamoto, K., & Yuguchi, Y. (2019). Observation of in vitro cellulose synthesis by bacterial cellulose synthase with time-resolved small angle X-ray scattering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 765-777.
- Toda, K., Asakura, T., & Fukaya, M. (1999). Cellulose Production by acetic acid resistant *Acetobacter xylinum*. *Journal of Fermentation and bioengineering*, 228-231.
- Valera, M., Torija, M., & Mas, A. (2015). Acetic acid bacteria from biofilm of strawberry vinegar visualized by microscopy and detected by complementing culture-dependent and culture-independent techniques. *Food Microbiology*, 452-462.
- Vazquez, A., Foresti, M. L., Cerrutti, P., & Galvagno, M. (2013). Bacterial Cellulose from Simple and Low cost production media by *Gluconacetobacter xylinus*. *J Polym Environ*, 545-554.
- Vázquez, H. J., & Dacosta, O. (2007). Alcoholic fermentation: An option for renewable energy production from agricultural residues. *INGENIERÍA Investigación y Tecnología VIII*, 249-259.

- Vegas, C., Mateo, E., González, Á., Jara, C., Guillamón, J., Poblet, M., . . . Mas, A. (2010). Population dynamics of acetic acid bacteria during traditional wine vinegar production. *International Journal of Food Microbiology*, 130-136.
- Walker, G., & Walker, R. (2018). Enhancing Yeast Alcoholic Fermentations. *Advances in Applied Microbiology*.
- Weimer, P., Hackney, J., Jung, H.-J. G., & Hatfield, R. (2000). Fermentation of a Bacterial Cellulose/Xylan Composite by Mixed Ruminal Microflora: Implications for the Role of Polysaccharide Matrix Interactions in Plant Cell Wall Biodegradability. *J. Agric. Food Chem.*, 1727-1733.
- Walker, G., & Walker, R. (2018). Enhancing yeast alcoholic fermentation. *Advances in applied Microbiology*, 2-35.
- Wu, J. J. (2012). Biodiversity of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the fermentation of "Shanxi aged vinegar", a traditional Chinese vinegar. *Food Microbiology*, 289-297.
- Wu, J., Kun Ma, Y., Zhang, F., & Chen, F. (2012). Biodiversity of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the fermentation of "Shanxi aged vinegar", a traditional Chinese vinegar. *Food Microbiology*, 289-297.
- Yang, Y., Jia, J., Xing, J., Chen, J., & Lu, S. (2013). Isolation and characteristics analysis of a novel high bacterial cellulose producing strain *Gluconacetobacter intermedius* Cls26. *Carbohydrate Polymers*, 2012-2017.
- Yetiman, A., & Kesmen, Z. (2015). Identification of acetic acid bacteria in traditionally produced vinegar and mother of vinegar by using different molecular techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 9-16.
- Zhang, W., Wang, X., Qi, X., Ren, L., & Qiang, T. (2018). Isolation and identification of a bacterial cellulose synthesizing strain from kombucha in different conditions: *Gluconacetobacter xylinus* ZHCJ618. *Food Sci Biotechnol*, 1-9.

Anexos

Apéndice 1. Tablas de valores de seguimientos de pruebas de fermentación bajo condiciones óptimas.

Tabla 12: Seguimiento. Primera prueba de fermentación en condiciones óptimas.

Día	°Brix	Densidad (g/ml)	Acidez Total (g/L)	Acidez fija (g/L)	Acidez volátil (g a.a./L)	% Azúcares reductores directos	% Azúcares reductores totales	% Azúcares no reductores
0	15.00±0.00	1.086	0.4±0.17	0.22±0.03	0.18	1.40±0.02	12.41±0.23	11.01
1	14.63±0.24	1.081	0.85±0.09	0.50±0.03	0.35	1.43±0.04	12.25±0.55	10.82
2	14.10±0.13	1.077	1.45±0.09	1.10±0.03	0.35	1.56±0.06	12.11±0.27	10.55
3	13.93±0.09	1.074	3.1±0.46	2.04±0.00	1.06	1.59±0.06	12.10±0.21	10.51
5	13.37±0.36	1.073	4.4±0.17	2.88±0.06	1.52	1.74±0.08	12.04±0.66	10.29
7	13.33±0.04	1.07	6.4±0.17	4.48±0.09	1.92	1.28±0.03	10.24±0.04	8.95
8	13.23±0.11	1.07	7.6±0.17	4.54±0.07	3.06	1.19±0.00	9.75±0.1	8.56
9	12.83±0.04	1.061	8.2±0.17	5.10±0.06	3.10	1.09±0.02	8.17±0.1	7.08
11	12.73±0.04	1.06	8.6±0.17	5.58±0.00	3.02	1.01±0.03	7.56±0.04	6.58
12	11.80±0.07	1.059	9.1±0.17	5.78±0.03	3.32	0.96±0.00	7.45±0.16	6.49
13	11.67±0.04	1.058	9.3±0.00	5.96±0.03	3.34	1.11±0.01	5.84±0.09	4.72
15	11.33±0.04	1.057	9.5±0.17	5.98±0.03	3.52	1.34±0.01	5.50±0.18	4.16
16	11.23±0.04	1.056	9.75±0.15	6.07±0.02	3.68	1.61±0.01	5.26±0.06	3.65
17	10.97±0.11	1.055	9.9±0.00	6.21±0.03	3.69	1.73±0.01	5.27±0.03	3.54
19	10.80±0.00	1.054	10.1±0.09	6.35±0.02	3.75	1.83±0.03	5.27±0.04	3.44
20	10.43±0.04	1.05	10.35±0.15	6.60±0.10	3.75	2.07±0.05	5.27±0.01	3.20
21	10.23±0.04	1.049	10.4±0.17	6.52±0.02	3.88	2.10±0.04	5.23±0.06	3.13
23	10.00±0.07	1.048	10.55±0.09	6.66±0.00	3.89	2.16±0.05	5.23±0.03	3.07
24	9.70±0.07	1.046	10.9±0.17	6.50±0.07	4.40	2.23±0.03	5.22±0.06	2.99
26	9.47±0.04	1.045	11.05±0.23	6.38±0.15	4.67	2.22±0.04	5.18±0.05	2.97
27	9.40±0.00	1.044	11.25±0.15	6.50±0.03	4.75	2.14±0.04	5.15±0.01	3.01
28	8.70±0.00	1.041	11.3±0.17	6.18±0.00	5.12	1.93±0.03	5.13±0.03	3.19
30	8.57±0.04	1.039	11.45±0.09	6.30±0.00	5.15	2.02±0.02	5.11±0.03	3.08
31	8.37±0.04	1.038	11.6±0.17	6.18±0.00	5.42	2.06±0.03	5.11±0.02	3.05
32	8.17±0.04	1.037	11.75±0.09	6.32±0.03	5.43	2.12±0.08	5.10±0.04	2.97
34	8.03±0.04	1.036	11.9±0.17	6.18±0.06	5.72	2.06±0.02	5.09±0.01	3.03
35	7.90±0.00	1.036	12.3±0.00	5.90±0.15	6.40	2.02±0.03	5.08±0.03	3.06
37	7.10±0.07	1.034	12.7±0.17	5.98±0.03	6.72	1.95±0.02	5.07±0.03	3.12
38	7.00±0.00	1.032	13.1±0.17	5.88±0.12	7.22	1.91±0.05	5.05±0.04	3.14
39	6.97±0.04	1.032	13.2±0.30	5.86±0.12	7.34	1.83±0.02	5.02±0.05	3.19
40	6.97±0.04	1.03	13.3±0.17	5.86±0.09	7.44	1.76±0.01	5.01±0.07	3.24
41	6.83±0.04	1.03	13.5±0.00	5.84±0.03	7.66	1.73±0.01	4.99±0.04	3.26

42	6.57±0.04	1.03	14.2±0.17	5.90±0.03	8.30	1.61±0.01	4.93±0.02	3.32
44	6.50±0.00	1.029	14.3±0.46	5.96±0.03	8.34	1.53±0.01	4.93±0.03	3.40
45	6.33±0.04	1.029	14.9±0.17	6.04±0.07	8.86	1.43±0.02	4.89±0.01	3.46
46	6.27±0.04	1.028	15.45±0.15	5.88±0.06	9.57	1.38±0.03	4.88±0.02	3.50
47	5.97±0.04	1.028	15.65±0.23	5.83±0.02	9.820	1.35±0.02	4.79±0.04	3.44
48	5.50±0.07	1.027	16±0.17	5.67±0.03	10.33	1.29±0.01	4.72±0.03	3.43
50	5.37±0.04	1.027	16.7±0.17	5.56±0.03	11.14	1.23±0.03	4.69±0.05	3.46
51	5.27±0.04	1.027	17.3±0.17	5.45±0.05	11.85	1.14±0.02	4.58±0.02	3.44
52	5.27±0.04	1.026	18.1±0.17	5.38±0.03	12.72	1.13±0.02	4.54±0.02	3.40
53	5.20±0.00	1.026	18.9±0.30	5.30±0.03	13.60	1.12±0.01	4.45±0.01	3.33
54	5.33±0.04	1.026	19.4±0.17	4.99±0.06	14.41	1.11±0.01	4.43±0.01	3.33
55	5.30±0.07	1.025	19.7±0.17	4.78±0.03	14.92	1.10±0.01	4.37±0.03	3.27
56	5.33±0.09	1.025	20.6±0.17	4.62±0.06	15.98	1.10±0.01	4.34±0.04	3.24
58	5.27±0.04	1.026	21.2±0.17	4.52±0.03	16.68	1.09±0.00	4.29±0.02	3.19
59	5.30±0.00	1.026	23.6±0.17	4.40±0.02	19.20	1.09±0.00	4.23±0.02	3.14
60	5.23±0.04	1.027	24.5±0.17	4.22±0.03	20.28	1.09±0.01	4.20±0.04	3.10
61	5.37±0.04	1.028	27.0±0.30	4.08±0.00	22.92	1.08±0.00	4.18±0.03	3.10
62	5.40±0.07	1.028	28.3±0.17	3.90±0.00	24.40	1.08±0.01	4.13±0.02	3.06

Tabla 13: Seguimiento. Segunda prueba de fermentación en condiciones óptimas.

Día	°Brix	Densidad (g/ml)	Acidez total (g/L)	Acidez fija (g/L)	Acidez volátil (g a.a./L)	% Azúcares reductores directos	% Azúcares reductores totales	% Azúcares no reductores
0	14.17±0.058	1.068	0.3±0.0	0.18±0.0	0.12	0.86±0.01	12.43±0.23	11.57
1	13.47±0.058	1.061	0.6±0.0	0.4±0.07	0.20	0.90±0.02	12.39±0.06	11.5
2	12.93±0.058	1.06	1.9±0.09	1.08±0.06	0.82	1.03±0.01	12.41±0.13	11.39
3	12.47±0.058	1.059	3.2±0.17	2.03±0.02	1.17	1.15±0.01	11.54±0.24	10.39
4	11.15±0.050	1.058	3.85±0.09	2.51±0.05	1.34	1.19±0.01	9.99±0.41	8.8
5	10.07±0.058	1.058	4.3±0.09	2.91±0.03	1.39	1.22±0.01	8.00±0.39	6.78
7	9.73±0.058	1.054	6.3±0.30	4.30±0.03	2.0	1.34±0.01	6.57±0.19	5.22
8	9.20±0.000	1.053	6.8±0.46	4.68±0.12	2.12	1.49±0.00	5.62±0.05	4.14
10	9.0±0.100	1.050	7.1±0.46	5.09±0.06	2.01	1.58±0.03	5.27±0.18	3.7
11	8.77±0.153	1.048	7.5±0.0	5.48±0.03	2.02	1.71±0.01	5.01±0.03	3.3
14	8.03±0.058	1.044	7.7±0.17	5.62±0.05	2.08	1.74±0.02	4.99±0.03	3.25
15	7.57±0.058	1.041	7.85±0.09	5.70±0.00	2.15	1.80±0.01	4.92±0.02	3.11
16	7.07±0.058	1.038	8.2±0.17	5.92±0.03	2.28	1.83±0.05	4.89±0.02	3.06
17	6.87±0.058	1.036	8.4±0.0	5.92±0.03	2.48	1.77±0.04	4.86±0.02	3.09
18	6.2±0.000	1.034	8.8±0.17	5.86±0.03	2.94	1.70±0.02	4.86±0.02	3.16
21	5.93±0.058	1.032	8.9±0.17	5.88±0.06	3.02	1.51±0.02	4.85±0.03	3.34
22	5.6±0.000	1.027	9.1±0.17	5.88±0.00	3.22	1.42±0.03	4.86±0.01	3.44

23	5.33±0.115	1.026	9.2±0.17	5.72±0.03	3.48	1.42±0.02	4.80±0.02	3.38
24	5.07±0.058	1.025	9.3±0.0	5.54±0.03	3.76	1.40±0.01	4.64±0.02	3.25
25	4.87±0.115	1.023	9.3±0.0	5.36±0.03	3.94	1.37±0.02	4.24±0.04	3.27
26	4.67±0.058	1.022	9.45±0.15	5.40±0.00	4.05	1.35±0.01	4.04±0.03	2.69
28	4.5±0.000	1.02	9.45±0.0	5.42±0.03	4.03	1.32±0.01	3.91±0.03	2.59
29	4.33±0.058	1.019	9.55±0.09	5.46±0.06	4.09	1.28±0.01	3.85±0.02	2.57
30	4.23±0.153	1.018	9.65±0.09	5.4±0.03	4.17	1.32±0.01	3.85±0.01	2.53
31	4.2±0.000	1.018	9.75±0.15	5.50±0.03	4.25	1.37±0.01	3.83±0.01	2.46
32	4.13±0.058	1.018	9.9±0.0	5.56±0.03	4.34	1.39±0.01	3.81±0.01	2.42
33	4.03±0.058	1.018	10.1±0.17	5.62±0.03	4.48	1.41±0.02	3.79±0.01	2.38
35	4.03±0.058	1.018	10.4±0.17	5.64±0.00	4.76	1.45±0.01	3.77±0.01	2.32
36	4.0±0.000	1.018	10.7±0.17	5.66±0.03	5.04	1.46±0.00	3.71±0.02	2.25
37	3.97±0.058	1.018	10.9±0.17	5.68±0.03	5.22	1.54±0.01	3.62±0.07	2.08
38	3.97±0.058	1.017	11.1±0.0	5.74±0.03	5.36	1.59±0.01		
39	3.93±0.058	1.017	11.3±0.17	5.74±0.03	5.56	1.60±0.01		
40	3.87±0.058	1.017	11.6±0.17	5.78±0.03	5.82	1.61±0.04		
42	3.83±0.058	1.017	11.8±0.17	5.48±0.03	6.32	1.65±0.01		
43	3.83±0.058	1.017	12.2±0.17	4.84±0.03	7.36	1.69±0.02		
44	3.9±0.000	1.017	12.6±0.0	4.42±0.03	8.18	1.72±0.03		
45	3.9±0.000	1.017	13±0.17	3.94±0.03	9.06	1.75±0.02		
46	3.9±0.000	1.017	13.5±0.0	3.74±0.03	9.76	1.81±0.03		
47	3.93±0.058	1.017	14±0.17	3.68±0.03	10.32	1.75±0.02		
49	3.9±0.100	1.018	14.5±0.17	3.64±0.03	10.86	1.60±0.03		
50	3.9±0.100	1.018	14.8±0.17	3.62±0.03	11.18	1.74±0.02		
51	3.93±0.058	1.018	15.1±0.17	3.60±0.00	11.50	1.83±0.01		
52	3.97±0.058	1.018	15.5±0.17	3.58±0.03	11.92	1.97±0.01		
53	4.0±0.100	1.018	15.7±0.17	3.56±0.03	12.14	2.34±0.05		
54	3.97±0.058	1.018	16.1±0.17	3.50±0.03	12.60	1.90±0.09		
56	3.97±0.058	1.018	17.4±0.0	3.44±0.03	13.96	1.72±0.03		
57	4.0±0.000	1.019	17.8±0.17	3.40±0.03	14.40	1.59±0.02		
58	4.03±0.058	1.019	18.8±0.17	3.36±0.00	15.44	1.57±0.01		
59	4.07±0.153	1.02	19.2±0.0	3.30±0.06	15.90	1.54±0.02		
60	4.07±0.058	1.02	19.9±0.17	2.98±0.07	16.92	1.52±0.02		
61	4.17±0.058	1.02	21.2±0.17	2.60±0.07	18.60	1.47±0.01		
63	4.2±0.000	1.02	23.9±0.17	1.82±0.03	22.08	1.44±0.01		

Apéndice 2. Tablas de valores de seguimientos de pruebas de secado y determinación de difusividad promedio.

45°C

t	Peso muestra (g)	ψ	$f'(x) \times 10^3$	D (m ² /s) $\times 10^{10}$	A	I(Y1,Y2,D)	D prom
0	54.71	1.000	3.448	5.823	2.0114E-12	5.3878E-10	7.5118E-10
1	54.53	0.997	3.448	5.843	4.0403E-12		
2	54.35	0.993	10.345	17.590	3.574E-11		
3	53.43	0.976	13.793	23.868	1.8585E-11		
4	52.88	0.966	6.897	12.062	2.9841E-12		
5	52.70	0.962	2.989	5.246	1.5328E-12		
10	52.52	0.959	2.069	3.645	6.3414E-12		
15	51.60	0.941	2.069	3.711	1.1751E-12		
20	51.42	0.938	1.724	3.104	5.6173E-12		
25	50.69	0.924	2.759	5.041	7.5938E-12		
30	49.96	0.910	3.218	5.970	2.483E-11		
40	47.76	0.869	3.103	6.031	1.05E-11		
50	46.66	0.848	2.069	4.119	9.4045E-12		
60	45.56	0.828	2.437	4.972	2.4484E-11		
75	43.19	0.783	2.759	5.951	2.1172E-11		
90	41.17	0.745	2.299	5.212	1.7371E-11		
105	39.52	0.714	2.529	5.982	2.8924E-11		
120	37.15	0.669	2.742	6.922	3.3693E-11		
140	34.58	0.621	2.586	7.036	4.1424E-11		
160	31.66	0.566	2.672	7.980	4.0081E-11		
180	28.91	0.514	2.287	7.518	4.0587E-11		
210	25.98	0.459	1.954	7.195	5.0432E-11		
240	22.69	0.397	2.126	9.055	6.1357E-11		
270	19.21	0.331	1.897	9.675	4.8898E-11		
300	16.65	0.283	1.772	10.583	4.3545E-10		
390	5.85	0.079	1.513	32.224	1.4415E-10		
420	3.84	0.041	1.073	43.781			
480	1.64	0.000	0.000				
540	1.64	0.000	0.000				

60°C

t	Peso muestra (g)	ψ	$f'(x)$ $\times 10^3$	D (m ² /s) $\times 10^{10}$	A	I(Y ₁ ,Y ₂ ,D)	D prom
0	52.40	1.000	7.435	1.256	9.3697E-12	1.3782E-09	1.4539E-09
1	52.02	0.993	7.435	1.265	1.0625E-11		
2	51.64	0.985	9.294	1.593	1.7869E-11		
3	51.07	0.974	9.294	1.611	9.6118E-12		
4	50.69	0.967	5.576	0.974	3.2247E-12		
5	50.50	0.963	4.337	0.761	3.6829E-11		
10	48.61	0.926	6.691	1.221	3.5865E-11		
15	47.09	0.896	6.320	1.191	4.0627E-11		
20	45.38	0.862	6.320	1.237	3.6336E-11		
25	43.87	0.833	5.948	1.206	3.6149E-11		
30	42.35	0.803	5.824	1.225	6.6943E-11		
40	39.50	0.747	5.204	1.176	5.3381E-11		
50	37.04	0.699	4.275	1.033	3.4483E-11		
60	35.14	0.662	3.222	0.822	3.1475E-11		
75	33.25	0.625	3.222	0.871	6.2803E-11		
90	30.21	0.565	4.151	1.241	8.1194E-11		
105	26.90	0.500	3.717	1.256	5.4134E-11		
120	24.53	0.454	2.885	1.074	5.7457E-11		
140	21.87	0.401	2.695	1.134	6.831E-11		
160	19.03	0.346	2.695	1.316	7.3194E-11		
180	16.37	0.294	2.602	1.496	1.3228E-10		
210	12.39	0.216	2.416	1.892	1.363E-10		
240	8.98	0.149	1.921	2.181	1.182E-10		
270	6.51	0.100	1.611	2.710	1.7155E-10		
300	4.05	0.052	1.353	4.389			
390	1.40	0.000	0.000				
420	1.40	0.000	0.000				
480	1.40	0.000	0.000				
540	1.40	0.000	0.000				

75°C

t	Peso muestra (g)	ψ	$f'(x) \times 10^3$	D (m ² /s) $\times 10^{10}$	A	I(Y1,Y2,D)	D prom
0	54.93	1.000	5.917	9.992	6.6736E-12	1.77947E-09	1.845E-09
1	54.62	0.994	7.396	12.565	1.0077E-11		
2	54.15	0.985	5.917	10.142	2.2528E-12		
3	53.99	0.982	2.959	5.086	1.8845E-12		
4	53.83	0.979	4.438	7.653	5.2E-12		
5	53.52	0.973	5.720	9.923	2.046E-11		
10	52.26	0.950	4.142	7.365	1.3198E-11		
15	51.32	0.932	4.142	7.505	1.9297E-11		
20	50.06	0.908	4.734	8.801	1.9773E-11		
25	48.80	0.885	4.142	7.907	1.5032E-11		
30	47.85	0.867	4.635	9.029	6.4769E-11		
40	44.24	0.799	4.734	10.007	2.4952E-11		
50	42.82	0.772	3.994	8.735	5.3111E-11		
60	39.99	0.719	4.773	11.212	6.3042E-11		
75	36.85	0.660	3.945	10.097	6.761E-11		
90	33.70	0.601	4.536	12.755	1.0043E-10		
105	29.61	0.524	4.142	13.357	6.1109E-11		
120	27.09	0.476	3.515	12.462	1.1269E-10		
140	22.85	0.396	3.698	15.753	1.0536E-10		
160	19.23	0.328	2.959	15.213	8.1177E-11		
180	16.56	0.278	2.811	17.067	2.0269E-10		
210	11.37	0.180	2.613	24.454	1.7186E-10		
240	8.22	0.121	2.416	33.636	5.5682E-10		
270	3.66	0.036	2.022	96.161			
300	1.77	0.000	0.000				
390	1.77	0.000	0.000				
420	1.77	0.000	0.000				
480	1.77	0.000	0.000				
540	1.77	0.000	0.000				