

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Elaboración de vinagres por fermentación a partir de frutas regionales.

Ayacucho - 1998

**Tesis para optar el título profesional de Biólogo,
Especialidad: Microbiología**

Presentado por:

Bach. José Antonio Girón Molina

Asesor:

Blgo. Fidel Rodolfo Mujica Lengua

Ayacucho - Perú

1998

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTOBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACION PROFESIONAL DE BIOLOGIA

El Jurado Calificador da Constancia de que el presente Trabajo de Tesis presentado por la BACHILLER. GIRON MOLINA, José Antonio.

Titulado:

“ELABORACION DE VINAGRES POR FERMENTACION A PARTIR DE FRUTAS REGIONALES. AYACUCHO – 1998”

Fue sustentado y aprobado con la nota de QUINCE (15), con fecha de 18 de Marzo de 1999.

Elgo. Fidel R. MUJICA LENGUA
Miembro Jurado

Elgo. Saúl A. CHUCHON MARTINEZ
Miembro Jurado

Ing. Egenio QUISPE CURI
Miembro Jurado

Dr. Victor H. ALEGRIA VALERIANO
Presidente (e) Jurado

Elgo. Pedro AYALA GOMEZ
Secretario Docente

*A la memoria de mi padre
Justo Pastor, por pretender
inculcar, estudio y trabajo en sus
hijos.*

*A mi querida madre: María Julia,
que con sacrificio, abnegación me
supo brindar apoyo y comprensión,
encaminando mis pasos a lograr el
ideal de ser profesional.*

*A mis hermanos, por el apoyo
constante y decisivo en el que hacer
de la vida.*

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, mi alma mater, en cuyas aulas forjé mi profesión.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, quienes contribuyeron con mi formación Académica y moral.

Al Biólogo Fidel R. Mujica Lengua, asesor del presente trabajo de investigación, por su apoyo constante y desinteresado en la culminación del mismo.

A los miembros del Área de Suelos del programa de Pastos y Ganadería, en especial a los Ingenieros Juan Girón y Alex Tineo, por su estímulo y colaboración prestada.

Finalmente, a todas las personas que de una y otra manera contribuyeron en la cristalización del presente trabajo de investigación.

SUMARIO

	Pag.
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	i
REVISIÓN DE LITERATURA	01
1. EL VINAGRE.....	01
1.1. Generalidades.....	01
1.1.1. Definición.....	01
1.1.2. Composición.....	02
1.1.3. Historia.....	02
1.1.4. Usos.....	05
1.1.5. Alteraciones.....	05
1.1.6. Microorganismos.....	08
1.1.7. Clasificación de las bacterias acéticas.....	11
1.1.8. Mecanismos bioquímicos.....	16
1.1.9. Factores que influyen en la fermentación acética....	19
1.1.10. Tipos de vinagre.....	21
1.1.11. Métodos de elaboración.....	24
1.1.12. Comparación entre procesos.....	26
1.2. Materia prima para la elaboración del vinagre de frutas....	28
1.2.1. La tuna.....	28
1.2.2. Clasificación sistemática.....	28
1.2.3. Descripción botánica.....	29
1.2.4. Usos.....	30
1.2.5. Composición química.....	31
1.3. Guinda.....	31
1.3.1. Clasificación sistemática.....	32
1.3.2. Descripción botánica.....	32
1.3.3. Usos.....	33
1.3.4. Composición química.....	34
MATERIALES Y METODOS	35
1. Aislamiento e identificación de la bacteria acética.....	35
1.1. Aislamiento de la bacteria acética.....	35
1.2. Identificación de la bacteria acética.....	36

1.2.1.	Observación macroscópica.....	36
1.2.2.	Observación microscópica.....	36
1.2.3.	Pruebas bioquímicas.....	36
2.	Elaboración de vinagre de frutas.....	38
2.1.	Materia prima.....	41
2.1.1.	Acondicionamiento de la materia prima.....	41
2.1.2.	Obtención del mosto.....	41
2.1.3.	Acondicionamiento del mosto.....	42
2.2.	Sulfitado o pasteurizado.....	43
2.3.	Fermentación alcohólica.....	43
2.4.	Trasiego.....	45
2.5.	Acondicionamiento del mosto alcohólico.....	45
2.6.	Fermentación acética.....	46
2.7.	Clarificación.....	48
2.8.	Envasado.....	48
2.9.	Pasteurizado.....	48
2.10.	Producto final.....	48
 RESULTADOS Y DISCUSIONES		51
1.	Aislamiento e identificación de la bacteria acética.....	51
2.	Elaboración de vinagre de frutas.....	52
2.1.	Caracterización físico-química de los mostos.....	52
3.	Proceso de fermentación alcohólica.....	55
4.	Determinación del rendimiento del mosto alcohólico.....	55
5.	Fermentación acética.....	62
6.	Evaluación físico-químico del producto final.....	77
7.	Análisis microbiológico.....	78
 CONCLUSIONES		81
RECOMENDACIONES		83
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS		84
ANEXOS		89

RESUMEN

La “tuna” y la “guinda” dos frutas ampliamente conocidas en nuestra zona fueron empleadas para la elaboración de vinagre por fermentación, con la finalidad de obtener un vinagre auténtico y de buena calidad que permita por un lado dar mayor valor agregado a estas dos frutas propias de la región; y por otro lado constituir una alternativa frente a productos similares del mercado informal que son baratos; pero no garantizan su inocuidad y seguridad desde el punto de vista de la salud.

El proceso de fermentación alcohólica se llevó a cabo utilizando Saccharomyces cerevisiae ATCC 4126, instalándose en total 12 fermentadores de vidrio especialmente acondicionados, conteniendo cada uno 2.5 L. de mosto. Los azúcares totales iniciales fueron ajustados a 15° Brix y pH 4.0.

De estos 6 fermentadores se mantuvieron a temperatura ambiental (promedio 21°C) y 6 fermentadores a 28 °C. En cada caso se trabajó con mostos de tuna, guinda y mezcla de ambos, en partes iguales y dos

diluciones, 1:1 y 2:1. La evaluación se realizó en base al contenido de azúcares totales, azúcares reductores y al final se determinó el porcentaje de etanol.

El proceso de fermentación acética, se realizó a partir de los mostos alcohólicos, habiéndose ajustado la acidez inicial a 3% y con la solución “madre de vinagre” previamente obtenida por fermentación espontánea; así mismo se suplemento con 0.1% de fosfato de amonio, instalándose para ello fermentadores de plástico especialmente acondicionados, conteniendo 1L. de mosto alcohólico.

El mayor porcentaje de etanol alcanzado en la fermentación alcohólica fue de 7.92% correspondiendo al tratamiento de la mezcla de mostos de tuna y guinda en cantidades iguales, dilución 1:1, 28 °C de temperatura por espacio de 6 días. El mayor grado de acetificación alcanzado fue de 7.16%, correspondiendo al tratamiento de la mezcla de mostos de tuna y guinda en cantidades iguales, dilución 1:1, temperatura ambiental (21 °C) por espacio de 25 días. Todos los vinagres obtenidos a partir de mostos de tuna, guinda y mezcla de ambas presentaron características físico-químicos aceptables comprendidas dentro de la Norma Técnica Peruana respectiva. Igualmente, el análisis microbiológico reveló ausencia de contaminación o signos de alteración de origen microbiano.

INTRODUCCIÓN

Un país como el nuestro, en vías de desarrollo económico, requiere apoyarse en todas las áreas de desarrollo factible; una de ellas es el empleo de la Biotecnología, la cual consiste en técnicas y procesos cuyo fin estriba inminentemente en la obtención de compuestos útiles para el desarrollo, bien sea en el área agro alimenticia, médica, farmacéutica y/o de la ingeniería química.

Siendo el principal recurso del país, su población y por ello merece la mayor prioridad, el garantizar su bienestar físico, psíquico y social, lo que depende en gran medida de su estado nutricional, que es condicionado por una serie de variables, entre las que destacan las socio económicas, en particular las asociadas a la disponibilidad y a la utilización biológica de los alimentos.

La microbiología industrial una potencialidad creciente, es no solamente dentro de la ciencia elemental sino también tiene fines prácticos, porque a través de ella se puede conocer las características biológicas y bioquímicas de los diversos tipos de microorganismos

responsables de la transformación de algunas sustancias en productos deseados.

La síntesis de productos de importancia industrial, es el resultado de una serie de reacciones enzimáticas complejas y coordinadas llevadas a cabo dentro de una célula, muchos de estos cambios son efectuados naturalmente por los microorganismos, y la industria aprovecha estas propiedades para realizar ciertas transformaciones que resultan muy útiles.

Desde hace mucho tiempo, numerosos ácidos orgánicos son producidos por microorganismos, principalmente bacterias y hongos, bajo diversas condiciones ambientales, así se conoce que el ácido acético es producido por bacterias del género *Acetobacter*, siendo *Acetobacter acetii*, *Acetobacter xilinum*, *Acetobacter ascendens*, *Acetobacter pasteurianum*, etc., las principales especies, las cuales tienen un rol muy importante en la producción del vinagre, siendo de un considerable historial científico.

El presente trabajo de investigación, consistió en el desarrollo a nivel de laboratorio de vinagres, a partir de bacterias acéticas aisladas de una "madre de vinagre" producida por una fermentación espontánea de medios alcoholizados, utilizando como substrato mostos obtenidos de tuna, guinda y mezcla de ambas, como un posible sustituto del mosto de uva convencionalmente empleado para la elaboración del vinagre.

Bajo este contexto se tuvo los siguientes objetivos:

- Evaluar físico-químicamente los mostos provenientes de tuna, guinda y mezcla de ambas.

- Elaborar vinagre de frutas a nivel de laboratorio, utilizando mostos de tuna, guinda y mezcla de ambas.
- Evaluar el curso de la fermentación alcohólica, utilizando Saccharomyces cerevisiae ATCC 4126; así mismo la fermentación acética, en base a la acidez total (expresados en ácido acético).
- Evaluar la calidad de los vinagres obtenidos de acuerdo a la Norma Técnica Peruana.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. EL VINAGRE

1.1. GENERALIDADES

1.1.1. Definición.

Puede ser definido como el resultado de una reacción biológica del alcohol etílico con formación de ácido acético, donde intervienen enzimas oxidativas producidas por microorganismos del género *Acetobacter*, teniendo como principal función la oxidación del alcohol en ácido acético (Gamarra, 1979).

Es el producto obtenido por la fermentación acética de bebidas alcohólicas de diluciones de alcohol etílico (ITINTEC, 1970).

Es una solución de ácido acético, el cual se obtiene mediante la fermentación por oxidación de una solución diluida

de etanol. El proceso metabólico se basa en la conversión de etanol, bajo la acción de la alcohol deshidrogenasa, en acetaldehído y el acetaldehído hidratado en ácido acético por la acción de la acetaldehído deshidrogenasa (Ward, 1991).

Se define como un condimento que se elabora por fermentación alcohólica de sustancias azucaradas o amiláceas, seguida de una fermentación acética (Bourgeois, 1995).

1.1.2. Composición

La composición característica de un vinagre depende básicamente de la materia prima que lo ha originado. Los vinagres obtenidos a partir de frutas, de vino u otro producto poseen una composición más completa que el vinagre de alcohol por contener prácticamente todas las sustancias solubles existentes en la materia prima o los que se forman en los procesos fermentativos, alcohólico y acético. Debiendo contener una acidez volátil mínima de 40 g por litro, expresado como ácido acético (4%), su graduación alcohólica no debe exceder a 1° GL y debe ser obligatoriamente pasteurizada, legislación Brasileña (Aquarone,, et al., 1983).

1.1.3. Historia.

La producción de ácido acético diluido y como producto alimenticio, llamado vinagre, es conocido por el hombre desde muchísimos años atrás; se fabricaban ya en los tiempos del antiguo y nuevo testamento; Plinio, describió un célebre episodio de Cleopatra preparando una bebida para la solubilización de

perolas; e Hipócrates lo incluía entre sus medicamentos. (Aquarone,, et al., 1983; Leslie, 1971)

La producción de este ácido orgánico a partir de líquidos alcohólicos ha sido conocida, desde la producción del vino aproximadamente 10000 años. Los Romanos y los Griegos utilizaban el vinagre diluido como bebida refrescante, la producían dejando el vino abierto al aire.

La primera indicación técnica sobre el mismo parece ser la de Geber, que en el Siglo VIII, sometió a destilación en forma empírica.

Dos siglos después, Gleuber demostró que podía obtenerse ácido acético, por calentamiento de la madera en ausencia de aire (Mayer ,1963).

La naturaleza microbiológica de la producción del vinagre se conoce hasta hace poco más de 100 años, cuando Kutzing en 1837, dio a conocer la conversión del etanol a ácido acético, manifestando que era producido por microorganismos vivientes. Quince años antes Peerson, había designado con el nombre de Mycoderma a la película superficial(Gamarra ,1979).

En 1790, Lavoisier, comprobó definitivamente la responsabilidad del oxígeno en la fermentación acética.

Entre 1864 - 1868, Pasteur, demostró con detalles en su obra sobre vinagre, la necesidad de la presencia de un ser vivo para la secuencia de transformación del alcohol en vinagre,

confirmando lo que había dicho Kutzing, (Aquarone, et al., 1983; Jagnow y David,1991).

En 1878, Hansen, demostró que había más de una especie capaz de producir acidez, más tarde aisló y dió el nombre de Bacterium aceti y Bacterium pasteurianum.

En el Siglo XVII, Lamery, admitía que la acidez del vinagre tuviera origen en el tartárico. Ideas más claras la tuvo Beerhave, insistiendo que en la primera fermentación del mosto se producía el alcohol; y que en una sucesiva fermentación, el alcohol desaparecía obteniéndose un ácido, donde ya no existía el líquido alcohólico. (Gamarra, 1979).

Sucesivamente, la primera ecuación química de formación de ácido acético a partir del alcohol fue descrita por Dobereiner. En 1936, Butlin menciona que en la fermentación acética normal el ácido acético procede de la deshidrogenación del acetaldehído. No debe de dejarse de mencionar la experiencia de Buchner y otros, al inicio de éste siglo, que verificaron no ser necesaria la presencia de microorganismos vivos para dar la transformación (Aquarone, et al., 1983).

Posteriormente siguen muchos investigadores tales como: Foda y Vaughn, Nitson, Rao y Stokes, Reese, Frings, Hoyer, Hromatka, Peerson, etc., y otros que realizaron estudios sobre fermentación acética.

1.1.4. Usos.

El vinagre es utilizado por el hombre hace miles de años, con tres finalidades principales:

- **Como condimento**, es usado en ciertos alimentos, con la finalidad de conferir sabor ácido al producto, como, por ejemplo, encurtidos, mayonesas, mostaza, salsa, etc. En otros alimentos, para conferir sabor y olor en carnes y derivados.
- **Como preservante**, son utilizados principalmente contra el enmohecimiento del producto, como en carnes atemperadas, legumbres, panes, panetones, bizcochos y contra bacterias lácticas que son sensibles al ácido acético.
- **Como agente de limpieza**, impregnado en materiales de metales (plata, aluminio, con la finalidad de clarearlos). Por otro lado siendo una solución ácida relativamente fuerte, disponible en todos los lugares, siendo utilizado para muchas otras finalidades; antiséptico de la piel (varicosis y micosis), preparado de soluciones medicamentosas (dolores musculares, distensiones, contusiones). Soluciones para gargareo en casos de infección de la boca y garganta; usado como una solución espermaticida, germicida, insecticida y solvente (Aquarone, et al., 1983).

1.1.5. Alteraciones del vinagre

Las alteraciones que puede experimentar el vinagre, se distinguen de defectos y enfermedades. Los defectos son provocados por factores físicos, químicos o bioquímicos, a

diferencia de las enfermedades, debida a la actividad de organismos vivientes (Garrido, 1954).

En el orden microbiológico, referido principalmente a ciertas especies de bacterias que causan mucosidades, entre las más importantes está el Acetobacter xylinum, organismo fuertemente capsulado, que tiende a obstruir el equipamiento, con un sedimento lodoso, una película bacteriana muy gruesa y viscosa. Así mismo el Acetobacter aceti y otras especies también descomponen el ácido acético bajo condiciones óptimas, turbidez en vinagres acabados; estas especies sobre oxidativas también causan el deterioro del cobre contenido en el vinagre rojo del vino, como lo reportan Underkofler y Hickey (1954), citado por Medina (1983).

Acetobacter podem, por oxidación descompone rápidamente el ácido acético a anhídrido carbónico y agua, reduciendo notablemente la producción, eso facilitado por la insuficiencia de alcohol y una aireación excesiva.

Ocasionalmente, son mencionadas otras bacterias contaminantes, como especies de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, butíricos y putrefactivas, todas causantes de fermentaciones secundarias de olores y sabores desagradables, aparecen cuando la materia prima es rica en compuestos nitrogenados, como en los cereales.

Entre las levaduras contaminantes provenientes de materias primas con cierta concentración de azúcares, la más conocida es Candida vini, que forma las flores del vino. Otras levaduras del mismo género y a veces del género *Oospora*, como

también ciertas especies de hongos *Aspergillus* y *Dematium*. Y algunas algas, donde en anaerobiosis dan pérdidas considerables por oxidación, además de producir sabores desagradables, aroma y enturbiar el producto (Aquarone, et al., 1983).

Entre otros defectos de orden microbiológico destaca la infestación por un diminuto nemátodo acuático denominado Anquillula aceti, móvil, de cuerpo cilíndrico transparente, mide de 1 a 2 mm., vive en vinagres con hasta 6% de ácido acético, siendo su temperatura óptima de 20 a 30 °C.

El vinagre también tiene condiciones para permitir el desarrollo del "ácaro del vinagre", también llamado "piojo del vinagre", que frecuentemente vive en condiciones favorables de aire, humedad y abastecimiento de nutrientes disponibles, reproduciéndose rápidamente ocasionando problemas de sanidad.

Un insecto comúnmente presente en las fábricas de vinagre y sus alrededores es la "mosca del vinagre" Drosophyla melanogaster, además de ser un inconveniente estético, es también perjudicial, pues puede acarrear infectantes, principalmente Acetobacter xylinum. (Cruess, 1948; Aquarone, et al., 1983).

En el orden químico, es provocado principalmente por metales, según, causan una gran pérdida económica, siendo los casos más conocidos la contaminación por fierro, es el denominado "vinagre negro" o "black casse", caracterizado por una coloración negra, negro azulado o negro verdoso, a causa de la turbidez por la formación del complejo tantrato de fierro, al

reaccionar el fierro y los taninos contenidos en el vinagre (Garrido, 1954).

El fierro, actuando sobre el tanino, provoca oscurecimiento; sobre fosfatos y proteínas, enturbiamiento; con concentraciones de 0.1 g/L son suficientes para dicho oscurecimiento.

El cobre, en una concentración 0.005 g/L provoca enturbiamiento en alimentos verdes preparados con vinagres; como pepinillos encurtidos, pimientos verdes, aceitunas verdes, como consecuencia de la reacción del cobre, por substituir el magnesio en la molécula de clorofila. En concentraciones de 0.01 g/L las modificaciones son más intensas, apareciendo un sabor metálico fuerte y el oscurecimiento es mayor. También producen turbidez; el zinc y el cadmio formando acetatos que son tóxicos.

El oscurecimiento del vinagre también puede darse por acción de las enzimas principalmente de oxidasas provenientes de vinos o de las mismas frutas.

En países donde se utiliza agua dura para la dilución del vinagre, deben evitarse cantidades excesivas de fosfato adicionado como nutriente, pues aparecerá turbio al final de la fermentación (Aquarone, et al., 1983).

1.1.6. Microorganismos

En la fabricación de vinagres, a partir de sustancias azucaradas o amiláceas, son necesarios dos procesos microbiológicos sucesivos y completamente diferentes:

Fermentación del Azúcar para Producir Alcohol

Etílico por Levaduras: Es un proceso anaerobio efectuado por la levadura naturalmente presente en la materia prima o preferentemente cultivos añadidos de especies principalmente Saccharomyces cerevisiae, Var. ellipsoideus productoras de altas concentraciones de etanol (Verman, 1994).

Las levaduras pertenecen a las talofitas y son consideradas como hongos verdaderos, son microorganismos eucarióticos simples, por poseer núcleo organizado y la presencia de membrana nuclear.

En consecuencia, se las relaciona con las células de los organismos superiores. Es comúnmente aceptada la heterogeneidad morfológica de las células (levaduras), puesto que se les observa en forma ovoide, esférica, elipsoidea, apiculada, etc. acusan dimensiones que varían en atención a la especie, a los constituyentes nutritivos del mosto, edad y otros. Presentan dimensiones que oscilan entre tres a seis micras de ancho y largo. En cambio las levaduras que no tienen importancia industrial y que por lo general contaminan el mosto son más pequeñas y tienen dimensiones que oscilan entre una a dos micras de ancho y largo; la presencia de una serie de finas y complicadas estructuras desempeñan una función muy importante en los procesos fisiológicos, genéticos, enzimáticos y biosintéticos (Pérez, 1980).

La verdadera y auténtica levadura alcohólica presenta las siguientes propiedades:

- Fácil adaptación a diversas temperaturas pudiendo desenvolverse entre amplios límites mínimos y máximos.
- Dotado de extraordinario poder alcohólico comparado a otras especies que fermentan azúcares.
- Capacidad de trabajo bajo acción de elevadas presiones en medios sobre saturados de CO_2 y O_2 .
- Su doble condición aerobia y anaerobia que facilita su actividad fermentable en toda la masa, no obstante ser ávidos por el oxígeno.
- Tolerantes a los cambios físicos y químicos que sufre el mosto en el curso de la fermentación, imponiéndose sobre los fermentos indeseables.
- Tolerancia a la acción de los ácidos y el anhídrido sulfuroso.
- Propiedad para fermentar directa e indirectamente la glucosa, maltosa, fructosa, galactosa, sacarosa, previo su desdoblamiento en hexosa con su propia diastasa reductora.(Ticona, 1981).

Oxidación del Alcohol a Ácido Acético por

Bacterias: Es una reacción aeróbica que efectúan las bacterias acéticas; siendo estas clasificadas por diversos autores considerando las características de desarrollo; pero algo común en la mayoría de ellas es la formación de un velo tenue desarrollado en la superficie de los líquidos. Las bacterias acéticas pertenecientes al género Acetobáctér, son células individuales, en

pares o en cadenas, alargadas, rectas o ligeramente curvas, miden de 0.6 a 0.8 μm por 1 a 3 μm . Presentan frecuentemente formas involutivas, en algunas especies pueden también ser esféricas, alargadas, hinchadas, abastionadas, curvadas, filamentosas; son motiles, por presentar flagelos peritricos, algunos no presentan motilidad. No forman endosporas, son gram (-) las células jóvenes, en cultivos viejos algunas especies pueden volverse variables. Su metabolismo es respiratorio; quimio-organótrofos, nunca fermentan debido a que el oxígeno es el aceptor determinante. Tienen la capacidad de oxidar el etanol a ácido acético, el acetato y lactato son oxidados a CO_2 y H_2O (sobre-oxidantes). No hidrolizan la lactosa, dextrina, y almidón. La temperatura óptima es de 30 °C, siendo el rango de 5- 42 °C, su desarrollo ocurre a pH 4 a 4.5 (Jorgensen, 1969; Aquarone, et al., 1983; Brock y Madigan, 1993).

1.1.7. Clasificación de las bacterias acéticas.

Se ha intentado realizar una clasificación de las bacterias acéticas reuniendo las especies en grupos, basándose en su empleo o propiedades fisiológicas. Así, Jorgensen (1969) ha establecido los siguientes grupos:

- Bacterias acéticas del macerado y mosto.
- Bacterias acéticas de la cerveza.
- Bacterias del vinagre.
- Bacterias de la acetificación rápida.

Es natural que no todas las bacterias acéticas se puedan encuadrar en este sistema, pues con el mismo derecho muchos se pueden incluir dentro de uno y otro grupo. Pero el sistema continúa siendo útil por que facilita la visión del conjunto, en parte influye una bacteria en aquel grupo dentro del cual encuadre mejor tomando su utilización o presencia. Esta clasificación se observa en la **TABLA I**.

Otra clasificación importante basada en el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey, le dan Rougieux (1964) y Frazier y Westoff (1985) donde mencionan que el género *Acetobacter* pertenece a la familia Pseudomonadacea y a la tribu Pseudomonadea, basándose en las siguientes propiedades:

- Oxidación positiva o negativa de ácido acético en CO_2 y H_2O .
- Utilización o no de las sales de amonio como única fuente nitrogenada
- Formación de fitoenos.
- Temperatura óptima.
- Formación de pigmentos.

Rougieux (1964) afirma que algunos autores dividen ésta tribu en cuatro grupos:

- Grupo peroxidante.
- Grupo oxidante.

TABLA I

CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS SEGÚN JORGENSEN

Esp. bacteriana	Formación de película	Reptación de la película por las paredes de vidrio	Coloración con el fodo	Enturbiamiento de líquido	Formas celulares hipertróficas	Movilidad	T°C Optima	T°C Máxima	Concentración alcohólica máxima en el cual se todavía se produce desarrollo y crecimiento (en % de volumen)	Cantidad máxima de ácido acético formado (%)
1.- <i>A. oxidans</i> <i>A. industrii</i>	Muy tenue Gruoso	++ -	- -	+++ +++	+++ +	+ +	18,21 23	30,33 35	7 6,7	Casi 2 2,7
2. <i>A. aceti</i> <i>A. pasteurianum</i> <i>A. kuelzingianum</i> <i>A. acetosum</i>	Bastante gruesa Siempre buena Bastante delgada Forma de levadura de flor	- - ++ Escasa	- + + -	- - ++ -	+ Muy fuerte Raras +	+ - - -	34 34 34 28	42 42 42 36	11 9,5 9,5 11	6,6 6,2 6,6 6,6
<i>A. rancem</i> <i>Termobacterium aceti</i>	Seca, rugosa Muy tenue	+ ++	- -	Muy escasa +++	+ ++	- +	- -	- -	- 9	- 6
3. <i>A. xylinoides</i>	De gruesa a Coriácea	-	+	-	-	-	28	35	-	-
<i>A. orleanense</i> <i>A. xilinum</i>	Potente Resistente, gruesa y coriácea	- -	- -	- -	+ -	- -	30 26 - 33	35 - 36 34	- 6,7	- 4,5
<i>A. ascendens</i>	Tenue, uniforme	+++	-	+++	Muy fuerte	-	31	44	12	9
4. <i>A. acitigenum</i> <i>A. schuetzembachii</i> <i>A. curvum</i>	Delgada, continua Floja, escasa Floja, escasa	- - -	+ - -	+ + +	Raras - -	+ - -	33 23 - 27 30	- 34 - 35 Casi 38	7 - -	Casi 4 11,5 -

1. Bacterias acéticas del macerado o mosto
2. Bacterias acéticas de la cerveza.

3. Bacterias del vinagre
4. Bacterias de la acetificación rápida

- Grupo mesoxidante.
- Grupo suboxidante

Los cuales se caracterizan por las siguientes reacciones:

- Reacción de la catalasa.
- Metabolismo del alcohol y del ácido acético.
- Metabolismo del ácido láctico.
- Poder cetógeno.
- Transformación de la glucosa a ácido glucónico.
- Esta clasificación se observa en la **TABLA II**

Collins (1969), Menciona que las especies de acetamonas oxidan el alcohol etílico a ácido acético; pero los acetobácter prosiguen la oxidación hasta anhídrido carbónico y H₂O. Cuando son móviles las acetomonas son también llamadas Gluconobácter. La clasificación se muestra en la **TABLA III**.

Dentro de la clasificación, son pocas aquellas especies con cualidades industriales, siendo las verdaderas bacterias acéticas, aquellas que presentan las siguientes propiedades:

- Producir concentraciones elevadas de ácido acético.

TABLA II**CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS (Rougieux, 1964)**

Grupo Reacción	PEROXIDANTE	OXIDANTE	MESOXIDANTE	SUBOXIDANTE
Catalasa	-	+	+	+
Oxidación a Acido acético	+	+	+	-
Oxidación del lactato formación CO ₃ Ca	+	+	+	-
Acido glucónico	-	+	+	+
Poder Cetógeno	-	-	+	+

TABLA III**CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS ACÉTICAS (Collins, 1969)**

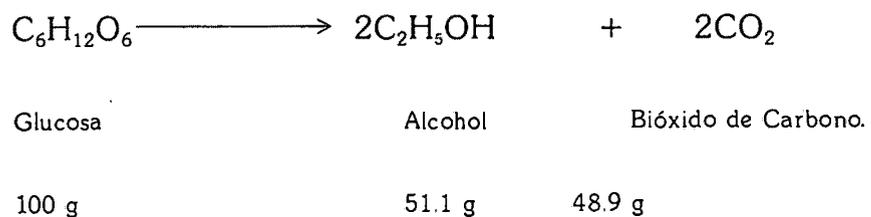
Características Especies	MOVIMIENTO	OXIDACIÓN	ACETIFICACIÓN DE ETANOL	VELO
<u>Acetobacter aceti</u>	+	+	+	VISCOSO
<u>Acetobacter pasteurianum</u>	+	-	+	ARRUGADO
<u>Acetobacter suboxidans</u>	-	-	+	DELGADO
<u>Acetobacter xylinum</u>	-	-	+	ZOOGLEICO

- No formar material viscoso.
- Preferentemente no tener capacidad para completar la oxidación hasta anhídrido carbónico y H₂O.
- Tolerar concentraciones razonables de etanol.
- Tolerar concentraciones razonables de ácido acético.
- Trabajar a temperaturas entre 25 a 30°C.

1.1.8. Mecanismos bioquímicos

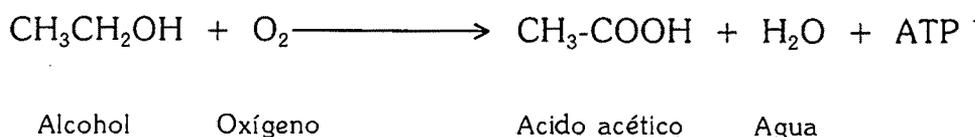
Dado que en el proceso de fabricación de vinagres son necesarios dos procesos microbiológicos diferentes llevados a cabo por levaduras y bacterias; siendo estos los siguientes:

Fermentación alcohólica, llevada cabo por levaduras, es un proceso anaerobio, que da lugar a la formación de alcohol etílico gracias a las cualidades que tienen estas de transformar los azúcares en alcohol, CO₂ y otros productos finales, la cual es observada en la siguiente ecuación bioquímica (Vogt, 1972):



Fermentación acética, consiste en la oxidación del alcohol etílico a ácido acético, donde intervienen enzimas oxidativas producidas por microorganismos ante todo del género

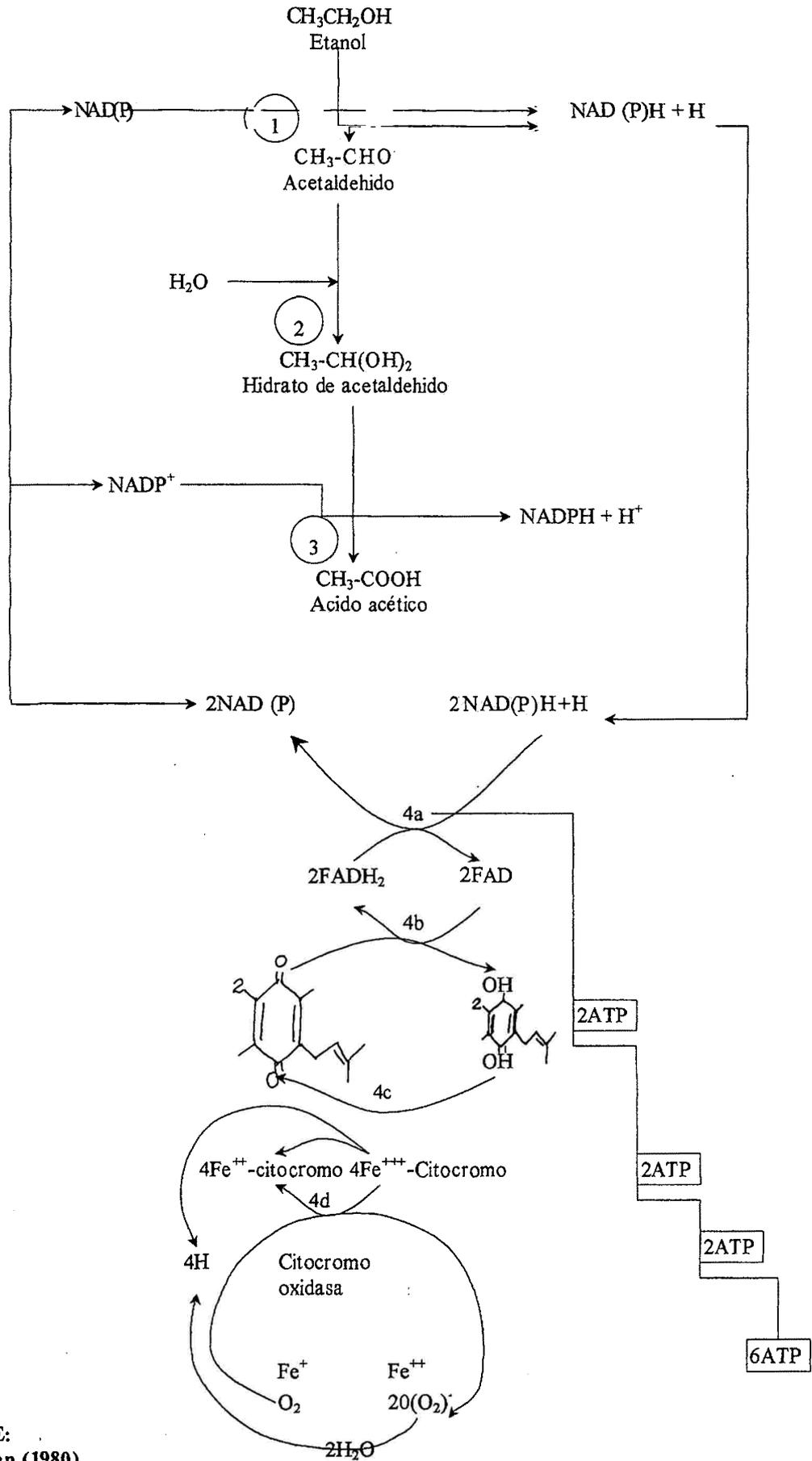
Acetobácter dentro de ellas; Acetobacter aceti, xylinum, schuezenbachii, etc. Otras bacterias acidógenas (que sin embargo forman ácido acético como producto secundario, que por regla general es a partir de carbohidratos). y por último, varios hongos como los géneros Rhizopus, Aspergillus y muchos otros (Jorgensen, 1969; Gamarra, 1979). La ecuación bioquímica del ácido acético se representa del siguiente modo: Frazier y Westhoff (1985).



En la **Figura N° 01**, se representa los pasos intermedios para la formación del ácido acético y agua a partir del etanol.

La cadena de reacciones comienza con la deshidrogenación del etanol a acetaldehído (Reacción 1), mediada por la alcohol- deshidrogenasa. Esta enzima puede tener como coenzima al NAD o al NADP, específicas según el tipo de Acetobacter. En el Acetobacter peroxidans se ha caracterizado una alcohol - deshidrogenasa NADP- específica. La Reacción 2, no es más que la incorporación del agua al acetaldehído para formar hidrato de acetaldehído.

En la Reacción 3, el hidrato de acetaldehído se convierte en ácido acético por acción de una Aldehído deshidrogenasa NADP - específica.



FUENTE:
Bruchman (1980)

FIGURA N° 01 : Esquema de la fermentación acética

En las Reacciones 4a - 4d, se representan los pasos ya conocidos de la cadena respiratoria en los que el hidrógeno ligado a las coenzimas reaccionan finalmente con el oxígeno del aire y la energía liberada queda convertida en ATP a través de la fosforilación oxidativa. En la misma figura, encontramos que se forman dos moléculas de agua más que la que corresponderían de acuerdo con la reacción global de la fermentación acética. Esto se explica, por el hecho de que en una reacción intermedia se incorpora agua para convertir el acetaldehído en su hidrato, cuya posterior deshidrogenación proporciona dos equivalentes de reducciones adicionales (Bruchman, 1980).

1.1.9. Factores que influyen en la fermentación acética.

Los principales factores que influyen en una fermentación acética son:

- **Acidificación inicial:** La acidificación tiene por objetivo inhibir el desarrollo de fermentos perjudiciales. El medio es acidificado utilizando vinagre proveniente de otra fermentación, sin un tratamiento final, es decir conteniendo bacterias activadas. La cantidad de vinagre iniciador añadido al medio alcohólico dependerá de la naturaleza del proceso, pero generalmente se considera adecuado del 10 al 25% en volumen de vinagre, con una acidez inicial de 3%. (Quintana, 1988).
- **Concentración de Alcohol:** Comúnmente, para dar buenas fermentaciones las concentraciones de alcohol deben estar entre 10 a 13%; valores mayores a 14%

dificultan la formación de la capa gelatinosa de bacterias y la oxidación es incompleta.

Por otra parte concentraciones bajas pueden producir una pérdida de vinagre, ya que a concentraciones inferiores de 1 a 2%, los ésteres y el ácido acético se oxidan causando la pérdida del aroma y sabor (Prescott y Dunn, 1962).

Garrido (1954), cita las bacterias acéticas que presentan límites máximos de tolerancia de concentración de etanol, según la **TABLA IV**.

TABLA IV

LIMITES MÁXIMOS DE TOLERANCIA A CONCENTRACIONES DE ALCOHOL DE ALGUNAS BACTERIAS ACETICAS (Garrido, 1954).

BACTERIA ACETICA	TOLERANCIA ALCOHÓLICA
<u>Bacterium ascendens</u>	12%
<u>Bacterium aceti</u> y	
<u>Bacterium acetosum</u>	11%
<u>Bacterium kutsingianum</u> y	
<u>Bacterium pasteurianum</u>	9.5%
<u>Bacterium xylinum</u>	6.7%

- **Cantidad de oxígeno suministrado:** Es indispensable para poder oxidar el etanol a ácido, si es llevado a cabo en una atmósfera pobre en oxígeno, la oxidación no es completa produciéndose algo de aldehído acético. La entrada de aire debe ser proporcional a la capacidad de fermentador, sin ningún impedimento de interrupción ya que es difícil la reanudación de la actividad (Carbonell, 1970).
- **Temperatura:** Las enzimas de las bacterias acéticas; la alcohol - deshidrogenasa tiene más actividad máxima entre 28 - 30°C. El rango de actuación queda limitada entre los 12 a 45°C. Siendo lenta a bajas temperaturas, improductiva; siendo causa directa de pérdida por evaporación del alcohol y ácido acético. Así mismo de materias volátiles, constituyentes del "Bouquet" del vinagre (Carbonell, 1970).
- **pH:** El pH óptimo para el desarrollo de las bacterias acéticas es de 4.5 (Carbonell, 1970); o de 5.4 (Gamarra, 1972).

1.1.10. Tipos de vinagre.

Según la Norma Técnica Peruana N° 209.020 de ITINTEC (1970), los vinagres se clasifican del siguiente modo:

- **Vinagre de vino:** Es el obtenido por la fermentación acética del vino, debiendo cumplir los siguientes requisitos:

Caracteres Organolépticos.

- Aspecto : Límpido
- Olor : Característico.
- Sabor : Característico.
- Color : Característico del vino de procedencia.

Caracteres Físico - químicos

- Densidad a 20°C : 1,010 a 1,023
- pH potenciométrico, mínimo : 2,6
- Acidez total en gramos de ácido acético por 100 mL, mínimo : 4%
- Acidez fija en gramos de ácido tartárico por 100 mL : 0,1 a 0,3
- Alcohol en volumen a 20°C , máximo : 1%
- Extracto seco a 100°C, mínimo : 1.2%
- Extracto libre de azúcares reductores, mínimo : 0.7%
- Cenizas totales, mínimo : 0.1%
- Alcalinidad de cenizas en mL de ácido normal, mínimo : 2.1%
- Cloruro de sodio, máximo : 0.1%
- Sulfatos expresados en KHSO_4 , máximo : 01%

Caracteres Microbiológicos.

- Estar libres de gérmenes y bacterias patógenas.
- Estar libres de anguilulas, vegetales criptogámicos y otros parásitos o insectos.

- **Vinagre de alcohol:** Es el obtenido por la fermentación acética de la dilución de alcohol etílico rectificado, debiendo cumplir los siguientes requisitos:

Caracteres Organolépticos:

- Aspecto : Límpido
- Olor : Característico.
- Sabor : Característico
- Color : Incoloro o amarillento

Caracteres Físico - químicos

- Densidad a 20°C : 1,005 a 1,013
- pH potenciométrico : 2,8
- Acidez total, en gramos de ácido acético por 100 mL, mínimo : 4 %
- Alcohol en volumen a 20°C, máximo : 1%
- Extracto seco a 100°C : 0,06 a 0,30
- Cenizas, mínimo : 0,02%

- Reacción de cenizas : Neutra.
- Furfural : Exento.
- **Otros vinagres**, son los obtenidos por la fermentación acética de bebidas alcohólicas de cereales, de frutas o de hidromiel.

1.1.11. Métodos de elaboración de vinagre.

Las distintas formas de fabricación de vinagre se pueden dividir según el tiempo de fermentación, en procedimientos "lentos" o de Orleans y procedimientos "rápidos", como el procedimiento sumergido. Entre los más difundidos se encuentran: proceso lento, proceso rápido y proceso sumergido (Aquarone, et al., 1983; Bourgeois, 1985; Brock y Madigan, 1993; Frazier y Westhoff, 1985 y Jagnow y Dawid 1991).

Proceso lento, también conocido como proceso Francés, es el más antiguo y el mejor proceso para la producción de vinagre con excelentes cualidades, finos, empleándose para ello barriles u otros materiales que no confieran propiedades extrañas al producto, está provisto de aberturas laterales para la entrada de aire. Durante la fermentación las bacterias acéticas forman una película fina sobre la superficie de la solución que con el tiempo se hace gruesa y gelatinosa, conocida con el nombre de "madre de vinagre", el cual deberá estar soportado por un enrejado de madera o viruta, impidiendo su caída al fondo. El producto se forma naturalmente, no requiere de clarificación, ni filtración, siendo prácticamente límpido.

Proceso rápido, una acetificación más rápida, puede ser conseguida por medio de un proceso conocido con el nombre de proceso Alemán, proceso universalmente usado para la producción de la mayoría de vinagres comerciales. El equipamiento utilizado es llamado generador, introducido en Alemania en 1832 por Schuetzenbach. Este proceso consiste básicamente, en un aparato o generador de vinagre o vinagrera, constituido normalmente de madera, acero inoxidable, en el cual es empacado con bagazo de caña, tiras de madera, en cuya superficie crecen las bacterias, efectuando la respectiva acetificación. El producto se forma más rápidamente, con menor probabilidad de contaminación e infestación. Pero tiene inconvenientes por la proliferación de Acetobacter xylinum, productoras de un material gelatinoso y con el tiempo acaba obstruyendo las tuberías y otros accesorios. Debido a las grandes dimensiones están sujetos a infestaciones por insectos y nemátodos. El funcionamiento del generador, supone el desplazamiento del líquido alcohólico durante el proceso de acetificación, corrientemente este líquido se vierte en gotas sobre superficies, en los cuales han crecido las bacterias del vinagre, necesitando el suministro de abundantes cantidades de aire.

Proceso sumergido, el proceso de fermentación acética puede darse con alta eficiencia, por procesos sumergidos, es el más moderno, pues utiliza un fermentador equipado con diversos accesorios, principalmente por un rotor, que difunde todo el aire desde el fondo de manera homogénea en todo el líquido, estando totalmente automatizado, encontrándose las bacterias acéticas sumergidas en el líquido alcohólico a fermentar, entre tanto para catalizar la reacción que les suministre

energía, necesitan de la administración continua, adecuada de O₂, en todos los puntos del tanque, por que pequeñas interrupciones del suministro, principalmente en las fases finales de la fermentación, pueden afectar considerablemente en el rendimiento. Con este método se reduce el tiempo de fermentación y la productividad es máxima. Sin embargo un inconveniente, es que el producto debe de filtrarse para eliminar las bacterias.

1.1.12. Comparación entre procesos.

- En cuanto a la cantidad de producto:

Los tres procesos básicos de producción, pueden generar vinagres de buena calidad, dependen de la materia prima, microorganismo y las condiciones de fermentación sean adecuadas (Aquarone, et al., 1983):

a) Proceso lento:

El producto se forma naturalmente, sin aireación forzada, adición de sustancias extrañas como antiespumantes, etc. Se obtienen productos de buena calidad. No necesitan clarificación, filtración, pues se clarifica a medida que se forma.

b) Proceso rápido:

El producto es obtenido más rápido, con menor probabilidad de contaminación e infestación.

c) Proceso sumergido:

El tiempo de fermentación es corto, con condiciones totalmente controladas, evitando la formación de productos secundarios y pérdida de sustancias aromáticas provenientes de la materia prima, las bacterias son más selectivas.

- En cuanto a la productividad:

Se tienen los siguientes datos (Aquarone, et al., 1983).

PROCESO	AREA OCUPADA (m ²)	VINAGRE PRODUCIDO (Litro/Día)
SUMERGIDO	30	30.000
RAPIDO	30	1.000
LENTO	30	50

- En cuanto a la durabilidad y mantenimiento del equipo.

Proceso sumergido, utiliza equipamiento de acero inoxidable de gran durabilidad y tiene una constancia de producción, proceso totalmente automatizado de fácil control, mantención y asistencia técnica adecuada.

En el proceso lento, utilizan mayormente madera, sujeto a resecamiento, infestación, mantención y el control es más simple, normalmente efectuado sin mucha técnica. El

proceso rápido está sujeto a imprevistos técnicos y exigen cierta práctica para resolver, principalmente relativos al material, como son el hinchamiento, compactado y descomposición.

1.2.MATERIAS PRIMAS PARA LA ELABORACIÓN DEL VINAGRE DE FRUTAS

El Perú, es un país que posee una flora y vegetación privilegiada por su ubicación geográfica y una geomorfología bioclimática, en la cual acoge un sin número de especies vegetales frutícolas, de gran importancia socio económica, capaces de sustituir a otras, en diferentes procesos industriales, dentro de ellos tenemos:

1.2.1. La tuna (Opuntia spp.)

Es una especie vegetal originaria de América, adquiere importancia económica no solo, porque es el principal hospedero de la cochinilla, sino también por su producción de frutos y derivados del cladido o penca.

La mayor concentración de tunales se encuentra en los departamentos de Ayacucho, Huancavelica, Apurímac, Arequipa, Lima, Ancash, Moquegua, Tacna, Cajamarca, Junín, Piura, Ica, Huánuco, Cuzco y La Libertad.

1.2.2. Clasificación Sistemática

Clase : Angiosperma

Sub clase	: Dicotiledonea.
Orden	: Cactales.
Familia	: Cactaceae
Género	: Opuntia
Nombre científico	: <u>Opuntia spp.</u>
Nombre vulgar	: "tuna"

1.2.3. Descripción Botánica:

Es una planta arbustiva, perenne, alcanza hasta 5m. de altura y 3 a 4 m. de diámetro de copa. Tallo o tronco muy ramificado, suculento y aplanado en plantas jóvenes, leñoso y cilíndrico en su base, en plantas adultas. Cladiodos o "pencas" articuladas aplanadas en forma oval, oblonga o espatulada, de color variado desde un verde claro a un verde gris, poseen epidermis gruesa, cutícula dura, estomas hundidos.

Hojas pequeñas y rudimentarias de 3 a 5 mm. de longitud, de consistencia membranosa, de color verde y que caen aproximadamente al mes de encogidas y son reemplazadas por un conjunto de pequeñas espinas llamadas gloquideos. Flores hermafroditas de simetría regular. El fruto es una baya, de forma elipsoidal, oval o redonda achatada, de consistencia carnosa y jugosa. Pulpa dulce aromática, musilaginosa, de textura firme,

arenosa y de color variable. Raíz muy fibrosa, cilíndrica, de rápido crecimiento, de hasta 5 m. de longitud.

La tuna se desarrolla bien en zonas semi-áridas, siendo la temperatura óptima entre 16°C a 26°C de media anual. Prefiere el clima templado, cálido y con alta luminosidad. La humedad relativa, es aquella cuya media mensual varía entre 55 a 85 %. La altitud conveniente fluctúa entre 800 a 2500 m.s.n.m. La precipitación adecuada tiene una media anual entre los 350 a 500 mm. distribuida regularmente entre el brote y la fructificación.

1.2.4. Usos:

La tuna por su sistema radicular, rusticidad, exigencia mínima de agua y adaptabilidad a la Costa, Sierra y Ceja de Selva, puede ser utilizada o aprovechada en forma integral esto es la raíz, el tallo y el fruto para diferentes fines. Los principios benéficos y usos que nos brinda son:

- Para el consumo humano, en, jugos, mermeladas, jaleas, frutas deshidratadas, néctar, mieles y otros.
- Para el consumo animal, como ensilaje, pasta de semilla.
- Para elaborar productos químicos polielectrolitos activos, floculantes, fibra para la fabricación de papeles, fertilizantes, alcohol industrial, ácido oxálico, base para la industria del jabón, mordiente para la industria textil, anticorrosivos, caucho sintético.

- La planta como hospedero de la cochinilla, que se utiliza para la obtención del carmín, colorante natural cuyo principio activo es el ácido carmínico de color rojo burdeo y es altamente cotizado en los mercados mundiales, para el uso en la industria de los alimentos, cosméticos, farmacología, textil.
- También es utilizado en el sistema agrosilvo pastoril en la reforestación, para prevenir la erosión (INDOAGRO, 1997; Calzada, 1985).

1.2.5. Composición química:

COMPOSICIÓN POR 100 GRAMOS DE PORCIÓN COMESTIBLE (COLLAZOS, 1996)

ALIMENTO	ENERGÍA Kcal	CARBOHI DRATOS g.	PROTEINA g	GRASAS g	FIBRA g.	CENIZAS g.	AGUA g.
TUNA	58,00	15,4	0,8	-	3,8	1,5	82,3

1.3. Guinda (Prunus capullin)

Es una planta originaria de México y se cree que los españoles lo introdujeron durante la colonia hacia América Central, según Parodi (1964). En el Perú y Ecuador, es conocida también como "capulí", en Colombia lo llaman "cerezo criollo", en Venezuela "cerezo de los andes" o "muji", en México como "cerez" y en España como "capulín" (Calzada, 1985).

En nuestro país se encuentra preferentemente en los Departamentos de Cajamarca, Huancavelica, Junín, Ancash, Apurímac y Ayacucho; lugares donde crece de manera silvestre, pues no se cultiva como otros frutales. Las mejores variedades se encuentra en Ambato, Ecuador, y en el valle del Mantaro, Perú.

1.3.1. Clasificación Sistemática:

División	: Antophyta.
Clase	: Dicotiledonea.
Sub-clase	: Archyclamidea.
Orden	: Rosales.
Familia	: Rosaceae.
Género	: Prunus.
Especie	: capullin.
Nombre científico	: <u>Prunus capullin</u>
Nombre vulgar	: “guinda”, “capulí”

1.3.2. Descripción Botánica:

Es una planta leñosa de porte arbustiva que en el Perú, crece de manera silvestre, generalmente no se le cultiva, y es común encontrarlo en la región andina en los cercos. En otros países se cultiva para aprovechar su fruto. Llega a alcanzar hasta

15 m. de altura, de copa abierta esférica, con ramas extendidas más bien delgadas, de corteza de un color rojo pardusco. Las hojas son simples largamente pecioladas, con lámina peciolada y oblonga, erguidas miden de ocho a doce centímetros de largo y cuatro a cinco centímetros de ancho, con el ápice agudo y los bordes finamente acerrados. Las flores son heteroclamídeas, inflorescencia en racimos, pentámeras y bisexuales, con el cáliz formado por cinco sépalos y la corola formada por cinco pétalos blancos y libres, estambres en número de cinco libres, gineceo de ovario medio o súpero. El fruto es una drupa, de forma esférica u oval de 1.5 a 2 cm. de diámetro, con el epicarpio rojo oscuro, mesocarpio jugoso, carnosos y agrídulce; y el endocarpio, duro y pétreo, conteniendo una sola semilla. El fruto se encuentra en racimos parecidos a la uva y cuando secas tienen cierta similitud con las pasas. La cáscara es delgada, pero lo suficientemente firme de modo que la fruta pueda ser manipulada fácilmente sin que le ocurran magulladuras. La semilla es redonda y grande en proporción a la fruta, tiene una cubierta bastante dura. Esta planta está adaptada a regiones sub tropicales y templadas, crece bien en los valles interandinos entre los 1800 a 3500 m.s.n.m., requiriendo bastante humedad.

1.3.3. Usos:

La fruta, es consumida directamente por su agradable sabor. También son utilizados para la elaboración de licores, mermeladas, esencias, colorantes para lo cual generalmente se comercializa seca.

Del árbol, las ramas se utilizan cuando tiernas por ser flexibles y fuertes, parecidas al sauce, para la fabricación de canastas. La madera tierna, para la confección de mangos de herramientas. Después de 6 a 8 años produce una madera rojiza utilizado para la confección de guitarras, siendo esta dura y resistente a los insectos y hongos dañinos. Las plantas de guinda (Prunus capullin), son utilizados en el sistema agro-forestal, como árbol de reforestación, para prevenir la erosión, mantener la humedad de los suelos, barrera contra los vientos (Alcázar, 1997).

1.3.4. Composición química:

ANÁLISIS DEL MOSTO DE GUINDA (g/L) (Vogt, 1972)

Variedad de mostos dulces	Azúcar invertido	Extracto de sacarosa	Azúcar	Acido málico	Sustancias nitrogenadas	Cenizas	Agua
Guinda	93,00	168,00	10,00	14,00	4,3	4,8	832,00

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de marzo – setiembre 1998.

1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA BACTERIA ACÉTICA.

1.1. Aislamiento de la bacteria acética.

La bacteria acética se aisló a partir de un vinagre de fruta, obtenida por una fermentación espontánea, para lo cual fue sembrada 10 mL de este vinagre en 100 mL de Caldo de Levadura Alcoholicada (Rogieux, 1964); siendo incubado a 25°C durante 5 a 7 días, para observar el desarrollo dado por el enturbiamiento del caldo, aumento de acidez y presencia del velo o masa esponjosa depositado en el fondo del recipiente. Posteriormente se procedió al aislamiento en tubos de vidrio, utilizando para ello como medio

el Agar Extracto de Levadura Verde de Bromocresol, incubándolo a 37°C durante 5 a 7 días (Alegría, 1982). **Ver Anexo N° 01 y 02.**

1.2. Identificación de la bacteria acética.

Para la caracterización de la cepa, aislada se tomaron en cuenta:

1.2.1. Observación macroscópica:

- Formación del velo o película, como también las características de las mismas.
- Enturbiamiento del medio.

1.2.2. Observación microscópica:

- A través de un frotis y coloración gram de la película con ayuda del microscopio, se observaron las características morfológicas de las bacterias acéticas.

1.2.3. Pruebas bioquímicas:

Para la identificación bioquímica de la bacteria acética aislada, se utilizaron las siguientes pruebas, recomendadas por (Rougieux, 1964; Collins, 1969; Carlo, 1948):

- **Presencia de la enzima catalasa.**

Para el cual se mezcló una asada del cultivo puro con una gota de H₂O₂ La positividad se dio por el desprendimiento de oxígeno.

- **Capacidad de oxidar el ácido acético a CO₂ y H₂O.**

Consistió en el desprendimiento de CO₂ por oxidación del ácido acético, utilizando para ello tubos de prueba conteniendo Caldo de Levadura con 2% de Acido Acético. El desprendimiento de CO₂ se determinó por acumulación de gas en el tubo de Durham.

- **Oxidación del etanol.**

La cepa pura, se inoculó en tubos que contenían Caldo de Levadura más 2% de Etanol y Rojo Congo como indicador a pH 4.5. La capacidad de oxidación se determinó por la producción de ácido acético formado, mediante titulación, con NaOH a 0,1 N.

- **Formación de ácido glucónico.**

Para lo cual se realizó una resiembra superficial de la cepa aislada sobre agar extracto de levadura con 5% de glucosa y 3% de carbonato de calcio. La producción de ácido glucónico se determinó por la disolución de la caliza y la formación de zonas claras alrededor del cultivo.

- **Oxidación del lactato de calcio.**

Se cultivó en Caldo de Levadura con 2% de Lactato de Calcio, observándose la formación de cristales de carbonato.

- **Poder reductor.**

Se realizó una resiembra por puntura superficial del cultivo puro de bacterias aisladas, sobre Agar Extracto de Levadura con 2% de Glicerina. Al desarrollar en las placas de petri se adicionó la solución de Fehling Ay B, observándose la capacidad para transformar la glicerina a dihidroxiacetona, mediante la formación de óxido cúprico.

- **Asimilación de azúcares.**

Para lo cual se prepararon caldos, utilizando como medio base agua de levadura y como indicador púrpura de bromocresol con las siguientes azúcares: Sacarosa, Maltosa, Lactosa y Galactosa. La siembra se realizó por asadas. La asimilación de los azúcares se manifestó por la variación del pH.

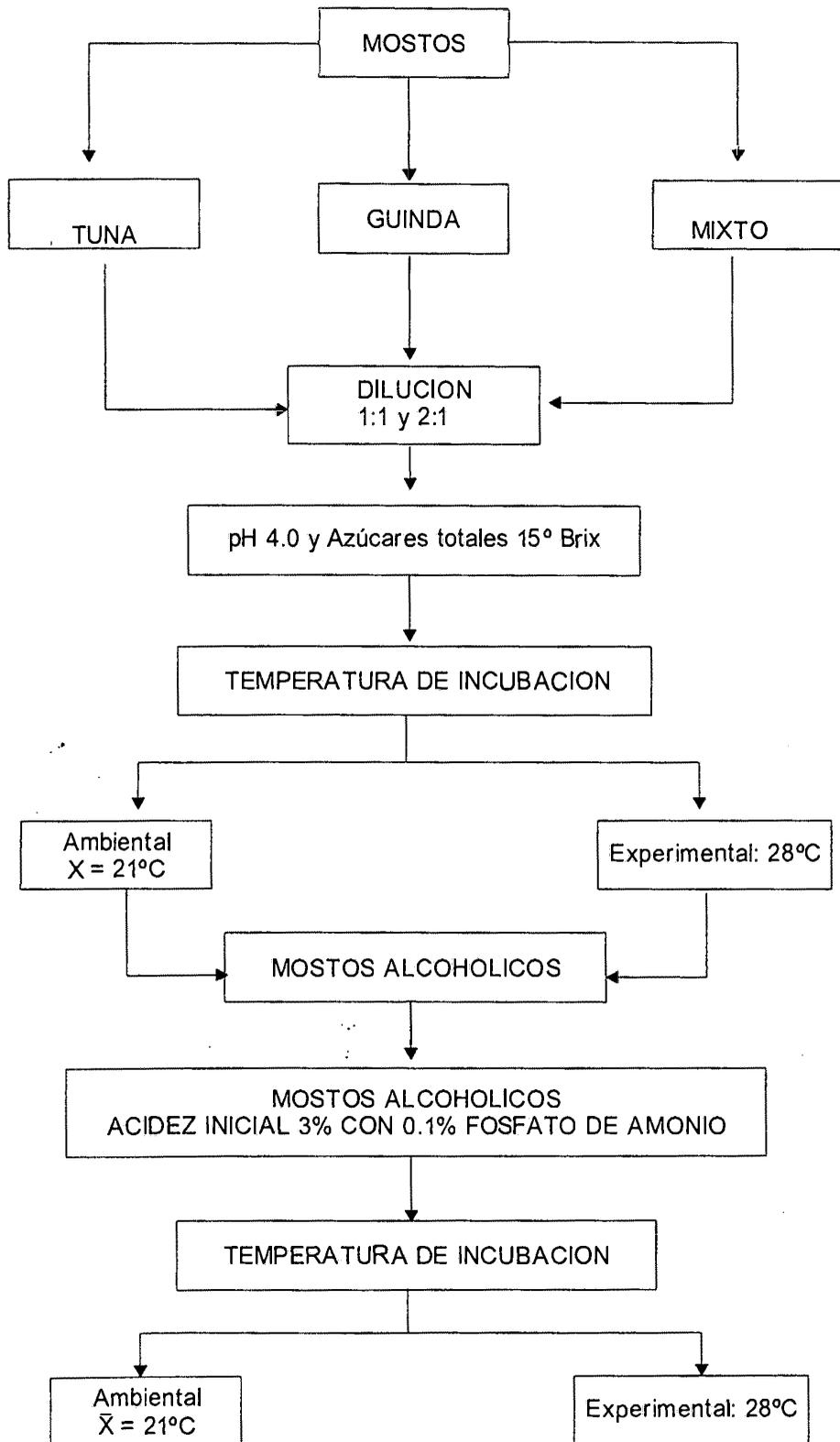
La temperatura de incubación de las diferentes pruebas bioquímicas fue de 37°C y un tiempo de 48 horas como mínimo.

2. ELABORACIÓN DE VINAGRE DE FRUTAS

Para el proceso de elaboración de vinagre, inicialmente se realizó el acondicionamiento de los mostos de tuna, guinda y mezcla de ambas.

Ver Figura N° 02.

Luego del acondicionamiento de los mostos se procedió a la elaboración siguiendo el flujograma descrito en la **Figura N° 03.**



FIGURAN° 02: Diseño del acondicionamiento de los tratamientos.

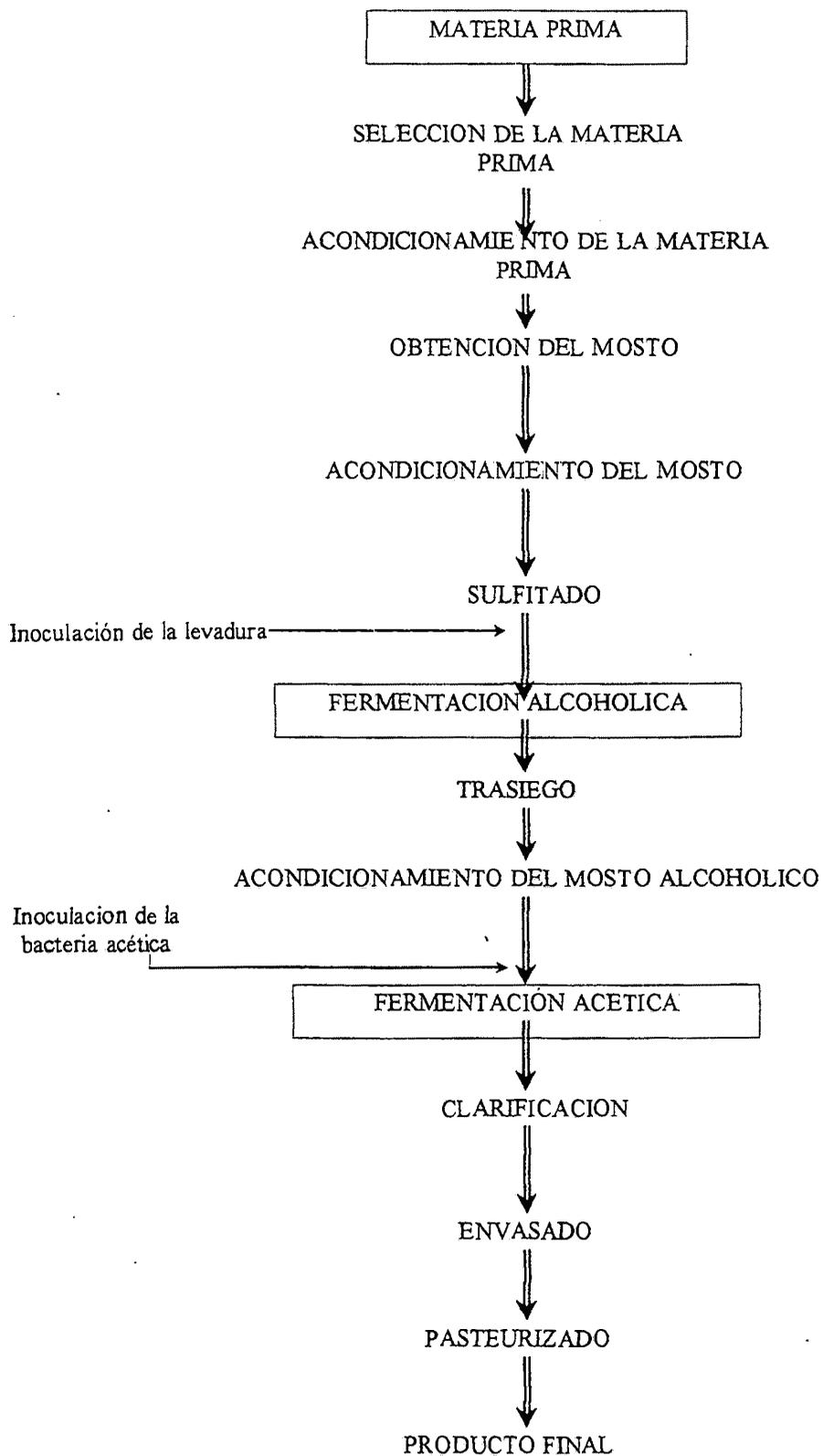


FIGURA Nº 03 : Flujograma de elaboración de vinagre de frutas

2.1. Materia prima:

Las frutas utilizadas fueron "tuna" y "guinda", seleccionándose aquellas que habían alcanzado el mayor grado de madurez, siendo las frutas sobre maduras las más deseables para la fermentación, las cuales fueron determinadas mediante la medición de los grados Brix y el pH. Se evitó incluir frutas con signos de contaminación o putrefacción.

2.1.1. Acondicionamiento de la materia prima.

Consistió en el lavado manual, con el objetivo de eliminar elementos no deseables para el proceso; realizándose de acuerdo a la fruta.

Para el caso de la tuna se tuvo que realizar un pelado manual con el empleo de un cuchillo.

Para el caso, de la guinda, se tuvo que eliminar las hojas, flores producto de la cosecha y posteriormente estrujarlo con la finalidad de despeparlo.

2.1.2. Obtención del mosto.

Una vez acondicionada la materia prima se procedió a la obtención del mosto. Para el caso de la tuna se realizó un prensado manual, utilizando para ello una malla metálica de 0.5 mm. y para la guinda después del estrujado se realizó un licuado con la finalidad de homogenizar el mosto. Posteriormente se filtró o tamizó los mostos obtenidos.

2.1.3. Acondicionamiento del mosto

Obtenido el mosto se procedió al acondicionamiento realizando las siguientes operaciones:

- **Dilución del mosto.**

Debido a que este fue muy denso, se hizo la dilución respectiva con agua hervida, siendo ensayadas las siguientes diluciones 1:1 y 2:1 (litros de agua: litros de mosto).

- **Corrección del pH.**

Se realizó con la finalidad de permitir seleccionar la flora del mosto, desarrollándose en él solamente las levaduras fermentativas e inhibiéndose los microorganismos indeseables, habiéndose ajustados el pH del mosto con ácido cítrico hasta llegar a un pH de 4.0.

- **Corrección de la cantidad de azúcar.**

Con la finalidad de garantizar un buen rendimiento del mosto alcohólico se hizo la corrección de la cantidad de azúcares iniciales, ajustándose a 15%. (Mayer, 1963; Aquarone, et al., 1983).

El ajuste de los azúcares se realizó únicamente de tal modo que:

- La cantidad de alcohol no sea superior a 105 g/L en vinos tintos, ni a 95 g/L en vinos blancos, rosados y claretes.
- El alcohol contenido en los vinos tintos no supere el contenido en los vinos a los que no se ha agregado azúcar (párrafo 5, artículo 3 de la nueva ley vinícola Alemana). Esta

ley establece, además, que para la corrección de vinos debe utilizarse únicamente sacarosa pura, ya que ésta no altera el color; también autoriza el empleo de glucosas que no den olor al vino (Vogt, 1972).

2.2. Sulfitado o pasteurizado

Esta operación se realizó con la finalidad de eliminar los numerosos microorganismos que puedan competir con la levadura a utilizarse, adicionándole para ello 53 mg/L, siendo este el valor recomendado por (Vogt, 1972).

2.3. Fermentación alcohólica

La levadura utilizada fue *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126, que resulta ser una levadura seleccionada como una de las más aptas para la fabricación del vino. (Vogt, 1972; Verman, 1994).

La levadura fue regenerada o activada 24 horas antes de ser inoculada, en tubos de baquelita conteniendo Agar Sabouraud, luego fue inoculada en 10 mL de Caldo YM y posteriormente trasvasó este preparado al 5% del mosto al cual se fermentó llamándosele semilla o "pie de cuba".

La fermentación se realizó en recipientes de vidrio especialmente acondicionados, conforme se muestra en la **Figura N° 04**; teniendo un volumen total de 3L., habiéndose empleado como volumen útil las 3/4 partes, equivalentes a 2.25L (Jagnow y Dawis, 1991).

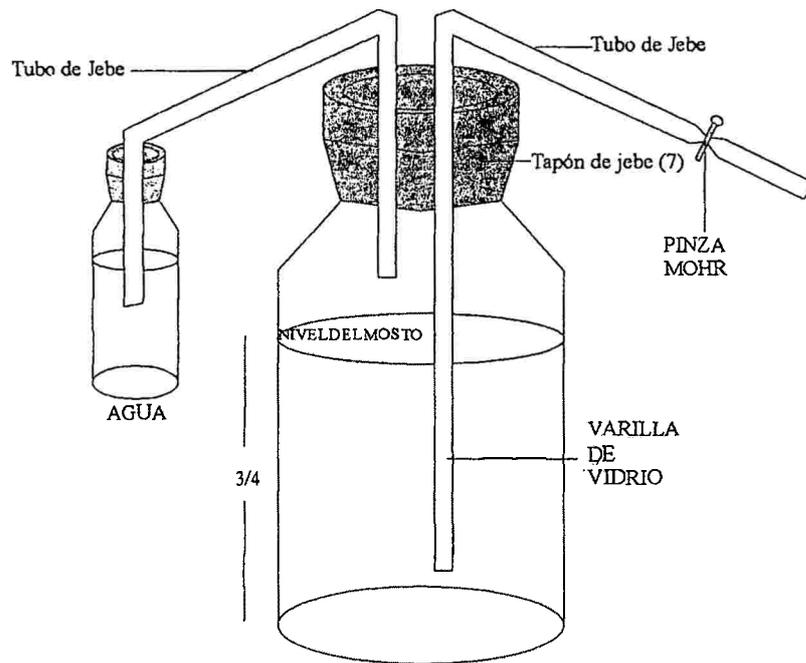


FIGURA N° 04: Diseño de Fermentador Alcohólico

El control de la fermentación, se realizó diariamente teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

- **Consumo de sólidos solubles** por refractometría, expresados en °Brix.
- **Consumo de azúcares reductores**, expresados como glucosa (mg/mL), determinado siguiendo el método de Miller (1959), usando para ello el Acido 3.5 dinitrosalisílico (DNS); citado por Villaverde (1987). **Ver anexo N° 03.**
- Y al finalizar la fermentación se realizó la **cuantificación del etanol** mediante la oxidación con dicroma, expresado en g/100 mL (Amerine, 1976).

El desarrollo de la fermentación se llevó paralelamente a dos temperaturas: 28°C y ambiental (promedio de 21°C). los datos obtenidos (azúcares totales) fueron sometidos a un análisis factorial 3A x 2B x 2C.

2.4. Trasiego:

Se realizó con la finalidad de separar el líquido alcohólico de la barra; para luego ser refrigerado por espacio de una semana, y al cabo de ese tiempo se transfirió a otro recipiente para su posterior utilización (acetificación).

2.5. Acondicionamiento del mosto alcohólico

- **Corrección de la acidez:**

Se realizó, esta prueba con la finalidad de evitar el desarrollo de microorganismos no deseables e inocular las bacterias acéticas,

siendo acidificado con un vinagre que fue obtenido por una fermentación espontánea, donde hubo formación de la película o velo que viene a constituir la población activa de las bacterias acéticas llamada "madre de vinagre" (Frazier y Westhoff, 1985). Para la acetificación inicial se empleó la "madre de vinagre" conteniendo 6% de acidez, expresado en ácido acético más las bacterias acéticas, obteniéndose una acidez inicial de 3%.

- **Corrección de nutrientes:**

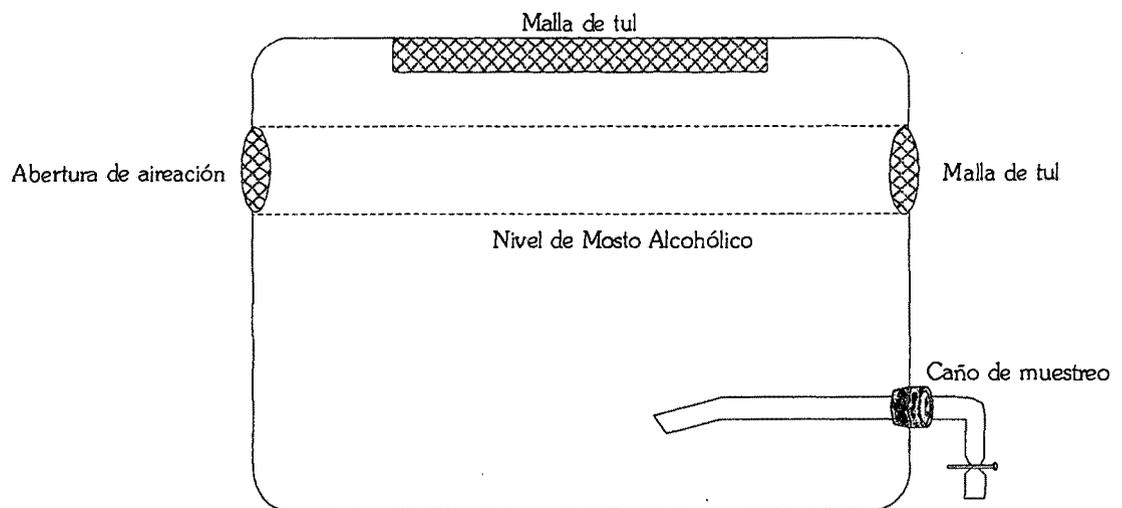
Se realizó con la finalidad de enriquecer el medio alcohólico, favoreciendo con esto un mejor desarrollo y mayor eficiencia de la bacteria. Se utilizó para ello el fosfato de amonio al 0.1 %, según Quintana (1948).

2.6. Fermentación acética.

La fermentación acética se desarrolló, por el método de Orleans o "método lento", debido a que estos nos proporcionan vinagres de buena calidad, con mejores características organolépticas y costos relativamente bajos. (Jagnow y Dawid, 1993; Gamarra , 1979; y Aquarone, et al., 1983).

La fermentación acética se llevó a cabo en recipientes de plástico especialmente acondicionados conforme se muestra en la **Figura N° 05**. El volumen total de cada recipiente fue de 3 L y el volumen útil fue de 1 L.

Durante el proceso de acetificación, se controló cada 48 horas, la variación de la acidez, expresadas en ácido acético. La



FIGURAN° 05: Diseño de Fermentador Acético

fermentación acética igualmente se desarrolló a dos temperaturas 28°C y a El cual fue incubado a temperaturas de 28°C y ambiental. (aproximadamente 21°C). Los datos obtenidos de acidez, expresados en ácido acético fueron sometidos a un análisis factorial 3A x 2B x 2C.

2.7. Clarificación.

Finalizado el proceso de fermentación acética, se procedió a la clarificación, mediante la filtración y decantación en forma natural.

2.8. Envasado:

Con la finalidad de guardarlos para su posterior caracterización, los vinagres fueron envasados en frascos de vidrio con tapas "twuist-off" cerrándolo herméticamente para el tratamiento térmico respectivo.

2.9. Pasteurizado

Se realizó con la finalidad de estabilizar el producto, utilizándose para ello el Baño María a una temperatura de 65°C por 5 a 10 minutos. (Jorgensen, 1967; Ward, 1991).

2.10. Producto Final

Acabado todo el proceso de elaboración del vinagre, el producto final fue caracterizado de acuerdo a las Normas Vigentes,

según INDECOPI (ex-ITINTEC), teniendo en cuenta los siguientes parámetros: físico-químicos:

- Densidad a 20°C, utilizando para ello un densímetro.
- pH, utilizando para ello un potenciómetro.
- Acidez total, en gramos de ácido acético por 100 mL, utilizando para ello la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de acidez acética} = \frac{G \times N \times m.e. \times 100}{V_m}$$

Donde:

G = gasto de NaOH 0.1 N (mL)

N = Normalidad del NaOH (0.1)

m.e. = mili equivalentes del ácido acético.

V_m = Volumen de la muestra empleada (mL).

- Acidez fija en gramos de ácido tartárico por 100 mL se determinó, empleando la Norma Técnica Peruana 209.024 (INDECOPI, 1970).
- Alcohol en volumen a 20°C, se determinó a través de la oxidación química del dicromato (Amerine, 1976).
- Extracto libre de azúcares reductores, se determinó mediante el método de Miller (1959), citado por Villaverde (1987).

- Cenizas Totales, se determinó empleando para ello la Norma Técnica Peruana 209.022 (INDECOPI, 1970).
- Para la evaluación organoléptica, se tomaron en cuenta: el aspecto, olor, sabor y color. El análisis microbiológico practicado al producto final incluyó: determinación de Mesófilos Viables, Coliformes Totales y Fecales, Enterococos y Lactobacillus de acuerdo al protocolo establecido para bebidas fermentadas(Pascual, 1992).

RESULTADOS Y DISCUSION

1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA BACTERIA ACÉTICA.

1.1. Aislamiento de la bacteria acética

Para el aislamiento de la bacteria acética, se emplearon diferentes medios alcohólicos de modo que sirvió para la producción de vinagre en forma espontánea, observándose que las bacterias se adaptaron mejor al Caldo de Levadura Alcoholizado, evidenciándose el crecimiento por un enturbiamiento del medio, formación de una película tenue, uniforme y así como el aumento de la acidez, calculado a través de la titulación con NaOH a 0.1 N.

Posteriormente estas bacterias fueron aisladas en el medio Agar Extracto de Levadura Etanol Verde de Bromo Cresol, apreciándose el desarrollo de colonias verde azuladas, redondas, casi globulares (como gotas de agua) que medían aproximadamente de 1 a 2 mm. de diámetro.

1.2. Identificación de la bacteria acética

En la observación macroscópica se comprobó la formación de una película tenue, transparente, cuya característica principal fue la reptación por las paredes del recipiente y con el respectivo enturbiamiento del medio.

En cuanto a la observación microscópica, mediante la coloración de Gram se observó células individuales, en parejas cortas, de forma elipsoidal y algunas células hipertróficas.

Respecto a las pruebas bioquímicas realizadas se encontró que la cepa aislada produce enzima catalasa, tiene capacidad de oxidar el etanol a ácido acético y a su vez a CO₂ y H₂O; pero no produce ácido glucónico a partir de glucosa, no oxida el lactato cálcico y no transforma la glicerina a dihidroxicetona. No se observó la asimilación de azúcares: sacarosa, lactosa, maltosa y galactosa. **Ver TABLA V.**

De acuerdo a las características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas encontradas, la cepa corresponde a Acetobacter ascendens cuyas características concuerdan con las tablas de identificación dadas por Rougieux (1964); Collins (1969); Jorgensen (1967) y Bergey's(1957).

2. ELABORACIÓN DE VINAGRE DE FRUTAS.

2.1. Caracterización físico-química de los mostos.

Para el presente trabajo de investigación se emplearon los mostos de tuna, guinda y mezcla de ambas, en cantidades

iguales, determinándose los parámetros físico-químicos, los cuales son mostrados en la **TABLA VI**. Como se puede apreciar, contienen importantes valores de azúcares fermentecibles, azúcares totales (°Brix), acidez total y pH potenciométrico. Notándose esto especialmente en el mosto de guinda que aporta (7.24 mg/mL) de azúcares fermentecibles y azúcares totales (12.64%) valores que se acercan a los reportados por Vogt (1972), mientras que en el caso de la tuna presentan azúcares fermentecibles (6.38 mg/mL) y pH 4.88, un tanto inferiores a los reportados por Berrocal (1968).

Conociendo los resultados del análisis físico-químico de los mostos, se procedió a seleccionar las materias primas, a través del análisis organoléptico para garantizar el proceso de elaboración y obtener un producto de buena calidad. Posteriormente se realizó el acondicionamiento de la materia prima para la obtención del mosto. La obtención del mosto se obtuvo en forma artesanal empleando para ello una malla metálica de acero inoxidable y mediante una licuadora para su homogenización.

Hecha esta operación se procedió al acondicionamiento del mosto, debido a que el mosto fue muy denso se probaron para este trabajo las diluciones 1:1 y 2:1, azúcares totales (°Brix) a un 15%, pH potenciométrico 4.0 y las temperaturas ensayadas fueron ambiental (promedio 21°C) y 28°C. Estos factores mencionados ayudaron a obtener una mayor producción de alcohol en los mostos de tuna, guinda y mezcla de ambas.

TABLA V

**IDENTIFICACION BIOQUIMICA DE LA BACTERIA
ACETICA AISLADA**

PRUEBAS BIOQUIMICAS	REACCION
Presencia de la enzima catalasa	+
Oxidación del etanol	-
Capacidad de oxidar el ácido acético a CO ₂ y H ₂ O	+
Formación del ácido glucónico	-
Oxidación del Lactato Cálcico	+
Poder reductor oacetógeno	-
Asimilación de azúcares:	
Sacarosa	-
Maltosa	-
Lactosa	-
Galactosa	-

TABLA VI

**COMPOSICION FISICO-QUIMICO DE LOS MOSTOS
OBTENIDOS DE TUNA, GUINDA Y MIXTO.**

Mostos	TUNA	GUINDA	MIXTO
Análisis			
Sólidos solubles (° Brix)	11.52	12.64	11.60
Azúcares reductores (mg/mL)	6.68	7.24	6.68
Acidez total (%)	4.62	8.38	7.23
Densidad (g/mL)	1.040	1.068	1.052
pH	4.88	4.81	4.82

3. PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.

Durante el proceso de fermentación alcohólica con Saccharomyces cerevisiae ATCC 4126 se pudo apreciar que el consumo de azúcares se llevó a cabo en mayor proporción a los primeros días de realizado el proceso, disminuyendo progresivamente esta tendencia en los días posteriores, hasta tomar valores constantes. **Ver TABLA VII y Figuras N° 06 y 07.**

A temperatura promedio de 21°C la fermentación alcohólica duró aproximadamente un tiempo promedio de 11 días, obteniéndose un valor mínimo final de azúcares totales de 3.9 % para el caso de la guinda dilución 1:1 y en cuanto al valor mínimo final de azúcares fermentecibles se dio en el caso del substrato mixto (tuna - guinda) dilución 1:1 siendo de 0.46 mg/mL.

A la temperatura ambiental de 28°C, el mayor consumo de azúcares totales (°Brix) se dio en el substrato guinda y mixto (tuna-guinda) dilución 2:1, llegando a 4.6 % y azúcares reductores finales de 0.42 g/mL, esto para el caso del substrato mixto (tuna-guinda).

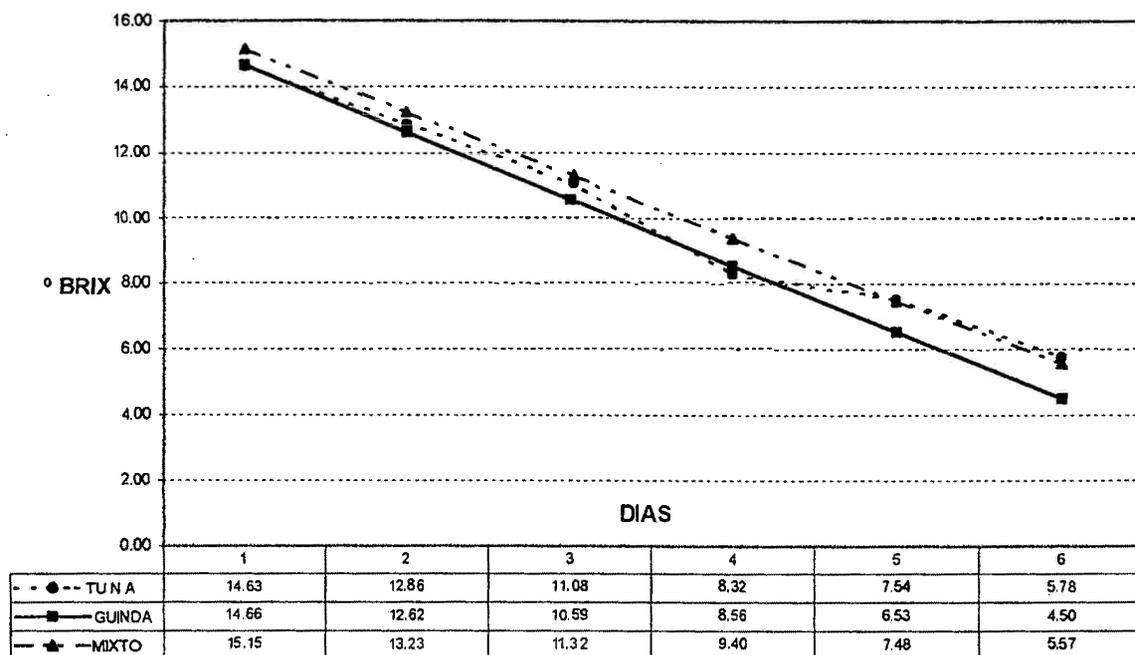
4. DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DEL MOSTO ALCOHÓLICO.

Posteriormente al proceso fermentativo se realizó la cuantificación del porcentaje de etanol, lo que se muestra en la **TABLA VIII**, observándose que el substrato mixto (tuna - guinda), dilución 1:1 y temperatura 28°C, se obtuvo una producción máxima de 7.92 g % y un rendimiento de etanol de 0.66. Este valor es similar a lo obtenido por García Godos (1994), quién utilizó como substrato hidrolizado de

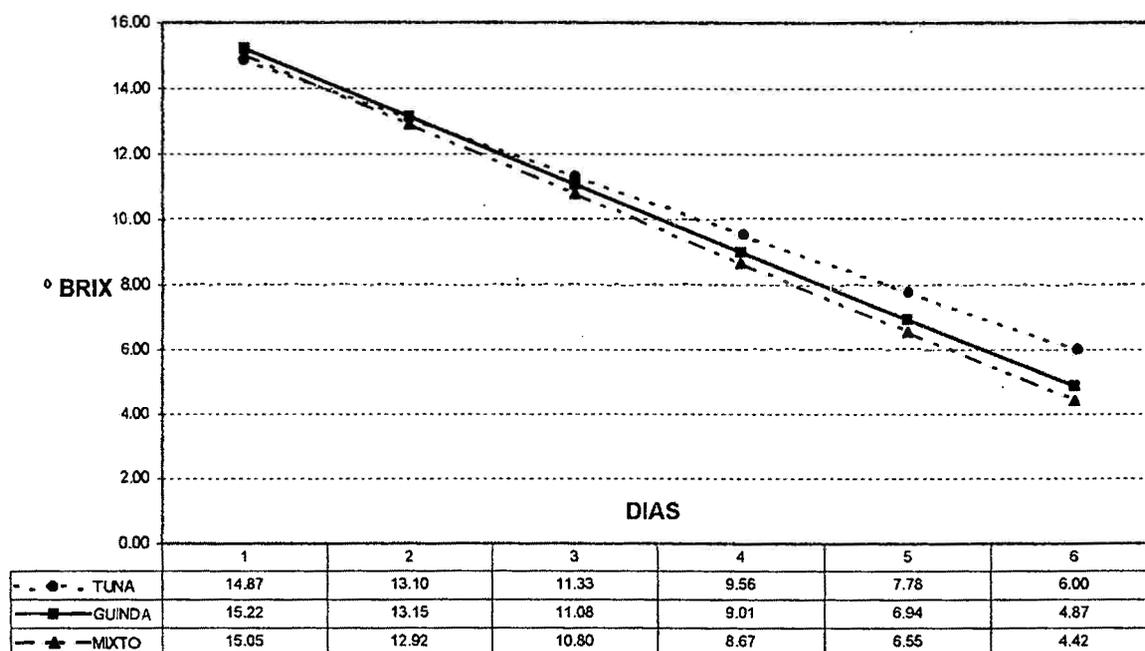
TABLA VII

VARIACIÓN DE LOS AZÚCARES TOTALES (°Brix) DE LOS MOSTOS DE TUNA, GUINDA Y MIXTO DURANTE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA A DIFERENTES DILUCIONES Y TEMPERATURAS.

Días	TUNA						GUINDA						MIXTO					
	Dilución 1:1		Dilución 2:1		Dilución 1:1		Dilución 2:1		Dilución 1:1		Dilución 2:1		Dilución 1:1		Dilución 2:1			
	T° 21°C	T° 28°C																
1	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00		
2	14,90	12,80	14,90	13,00	14,90	12,95	14,80	13,25	14,85	13,69	14,90	13,29	14,90	13,69	14,90	13,29		
3	14,15	10,80	14,50	11,15	14,16	10,23	14,08	11,10	14,22	11,19	14,15	10,56	14,15	11,19	14,15	10,56		
4	13,10	8,76	13,90	9,70	13,10	7,45	13,26	9,20	13,32	9,26	12,80	8,36	13,32	9,26	12,80	8,36		
5	12,30	7,65	11,28	7,80	11,50	6,56	12,56	7,20	11,50	7,55	11,10	6,66	11,50	7,55	11,10	6,66		
6	11,10	6,12	10,15	6,00	10,00	5,21	11,10	4,51	9,84	5,56	9,57	4,55	9,84	5,56	9,57	4,55		
7	9,96	6,12	8,88	6,00	8,80	5,21	9,06	4,51	8,50	5,56	8,80	4,55	8,50	5,56	8,80	4,55		
8	8,20	6,12	7,50	6,00	7,20	5,21	7,56	4,51	7,90	5,56	7,06	4,55	7,90	5,56	7,06	4,55		
9	6,05		5,90		5,50		6,60		6,26		6,10		6,26		6,10			
10	6,05		5,90		4,70		5,92		5,04		5,38		5,04		5,38			
11	6,05		5,90		3,90		4,75		5,04		5,38		5,04		5,38			
12					3,90		4,75		5,04		5,38		5,04		5,38			
13					3,90		4,75											



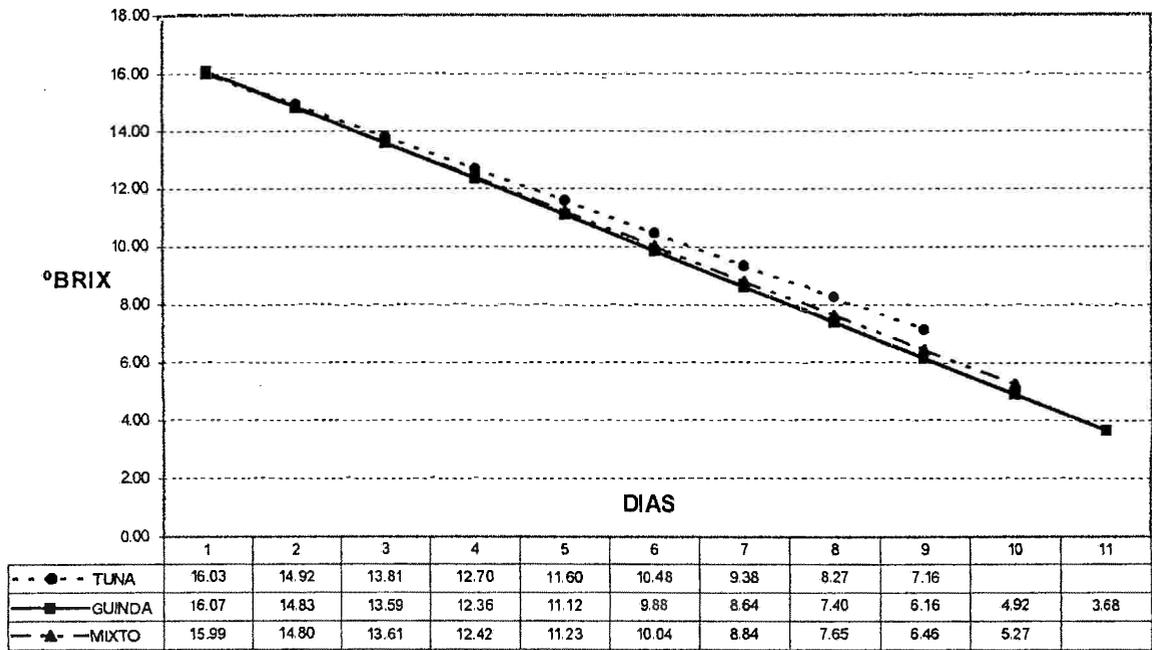
D: 1:1
T °C 28 °C



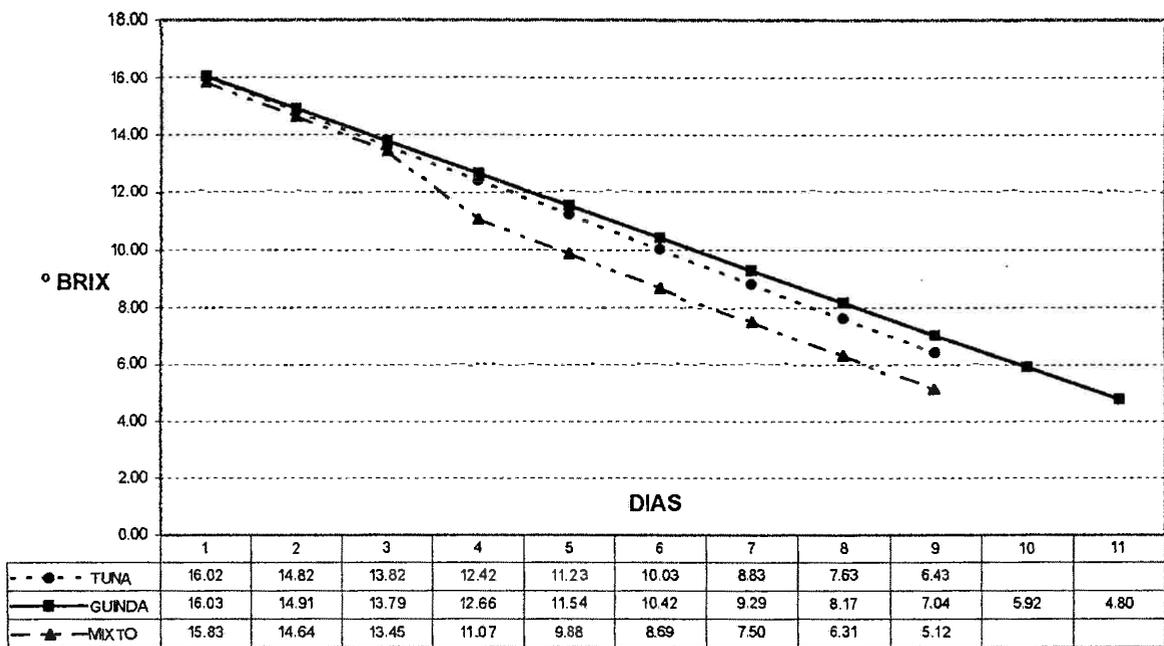
D: 2:1
T °C 28 °C

FIGURAN° 06

Gráfica ajustada de la variación de los azúcares totales durante la fermentación alcohólica, con Saccharomyces cerevisiae ATCC 4126 a temperatura experimental (28°C).



D: 1:1
T °C 21 °C



D: 2:1
T °C 21 °C

FIGURAN° 07

Gráfica ajustada de la variación de los azúcares totales durante la fermentación alcohólica, con Saccharomyces cerevisiae ATCC 4126 a temperatura ambiente (21°C).

TABLA VIIII

**DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL A DIFERENTES
SUBSTRATOS, DILUCIONES Y TEMPERATURAS,
CON *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4126 DURANTE
EL PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.**

Días	TUNA				GUINDA				MIXTO			
	Dilución 1:1		Dilución 2:1		Dilución 1:1		Dilución 2:1		Dilución 1:1		Dilución 2:1	
	T° 21°C	T° 28°C										
Azúcares reductores iniciales (mg/ml)	12,42	12,42	12,42	12,42	12,42	12,42	12,42	12,42	12,42	12,42	12,42	12,42
Azúcares reductores finales (mg/ml)	0,82	0,87	0,72	0,58	0,70	0,56	0,54	0,68	0,46	0,42	0,49	0,78
Dosaje de etanol (g%)	0,90	6,96	6,80	6,70	6,86	7,16	7,17	6,68	7,73	7,92	7,26	7,18
Rendimiento	0,59	0,60	0,58	0,56	0,58	0,61	0,65	0,57	0,65	0,66	0,61	0,62

"ichu" obteniéndose un rendimiento de 0.61 e inferior a lo reportado por Chipana (1989) quién utilizó como sustrato savia de cabuya, obteniendo un rendimiento de 0.70 y Betalleluz (1989) quién obtuvo un rendimiento de 0.84 utilizando como sustrato cáscara de tuna y superior a lo reportado por Chuchón (1989) que obtuvo un rendimiento de 0.45 utilizando como sustrato "oca". Esto permite deducir que los sustratos empleados previo acondicionamiento adecuado del mosto conducen a obtener productos con características bastante aceptables y un rendimiento similar a otros sustratos antes citados.

A. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL CONTENIDO DE AZUCARES (°BRIX) AL FINAL DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.

ANVA.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.c.	F 0.05
Substrato	2	8.297	4.148	14.72	0.001**
Dilución	1	0.107	0.107	0.38	0.550 N.S.
Temperatura	1	0.144	0.144	0.51	0.488 N.S.
Substrato * Dil	2	0.168	0.084	0.30	0.747 N.S.
Subs *T°	2	0.484	0.242	0.86	0.448 N.S.
Dil. *T°	1	1.373	1.373	4.86	0.048 *
Subs*Dil*T°	2	0.741	0.371	1.32	0.304 N.S..
Error	12	3.381	0.282	--	
TOTAL	23	14.694			

(**) Como $F_c > F_t$, entonces existe diferencia altamente significativa, la capacidad de fermentación por la levadura se ve afectada con los diferentes substratos.

(*) Como $F_c > F_t$, existe diferencia significativa entre el tratamiento dilución* temperatura. Es decir la fermentación se ve afectada por estos factores.

* PRUEBA DE CONTRASTE TUKEY PARA EL SUBSTRATO

Tuna	6.07 *
Guinda	4.591
Mixto	5.131

Se observó que el substrato tuna, es mejor que los otros substratos para el proceso de fermentación.

A.1. ANVA DE EFECTOS SIMPLES DE DILUCIONES (1:1 y 2:1), EN CADA NIVEL DE TEMPERATURA (21° y 28°C) EN PROMEDIO DE SUBSTRATOS (TUNA, GUINDA y MIXTO)

SUBSTRATOS	DILUCIONES		G.L.	S.C.	F.c.
	1:1	2:1			
21 °C	29.98	32.05	1	0.3771	1.338 N.S.
28°C	22.66	30.11	1	4.6252	1642**

* Prueba de Tukey: ($\alpha = 0.05$)

Dilución 1:1 en temperatura (28°C) = 3.78

Dilución 2:1 en temperatura (28°C) = 5.02

Existe diferencia altamente significativa entre las diluciones y temperatura, siendo el mejor tratamiento la dilución 2:1 a una temperatura de 28° C.

A.2. ANVA DE EFECTOS SIMPLES DE LAS TEMPERATURAS (21°C y 28°C) EN LAS DILUCIONES (1:1 y 2:1) EN PROMEDIO DE LOS SUBSTRATOS

SUBSTRATOS	TEMPERATURA		G.L.	S.C.	F.c.
	21 °C	28 °C			
1:1	29.98	22.66	1	4.4652	15.85**
2:1	32.05	30.11	1	0.3136	1.11 N.S.

*** Prueba de Tukey ($\alpha= 0,05$)**

Dilución 1:1 en temperatura 21°C : 4.99

Dilución 1:1 en temperatura 28°C: 3.78

Existe diferencia altamente significativa entre la dilución 1:1 respecto a las temperaturas 21°C y 28°C, siendo la mejor la dilución 1:1 y 21°C.

5. FERMENTACIÓN ACÉTICA

Terminado el proceso de obtención del mosto alcohólico y condicionado con 3% de acidez inicial expresado en ácido acético y 0.1% de fosfato de amonio como nutriente, se dio comienzo a la fermentación acética que tuvo como duración de 19 días como promedio, esto a una temperatura de 28°C llegando a obtenerse 6,9 g % de acidez acética en el mosto alcohólico mixto (tuna-guinda) dilución

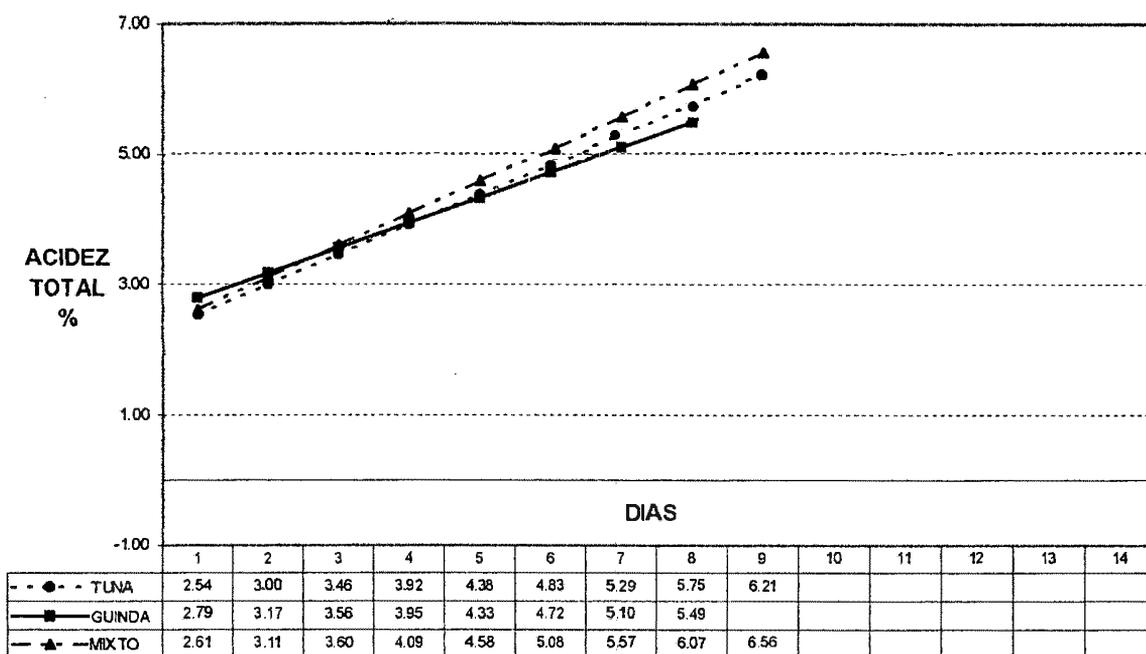
1:1 y un valor máximo de 7.16 g % de acidez acética a una temperatura de 28°C, el mosto alcohólico mixto (tuna-guinda) dilución 1:1. **Tabla IX** y **Figura N° 08** y **09**. Estos valores son similares a los obtenidos por Quintana (1988) utilizando como substrato frutas sobre maduras (papaya, plátano, piña y mandarina) llegando a obtener un 7.22 g % y superior a lo obtenido por Medina (1983) que obtuvo 6.62 g % utilizando como substrato desechos de piña.

Por otro lado en el desarrollo de la fermentación acética se observó que durante los primeros días la transformación del alcohol a ácido acético se llevó a cabo en forma lenta hasta alcanzar un valor promedio de 3,5 g %, pasando luego a una etapa en la cual la transformación fue más acelerada, hasta llegar a un valor máximo de 7.16 g % de acidez, expresado en ácido acético. Esto permite corroborar que el proceso de fermentación acética durante la obtención del vinagre, utilizando tuna, guinda y mixto como substrato fue eficiente.

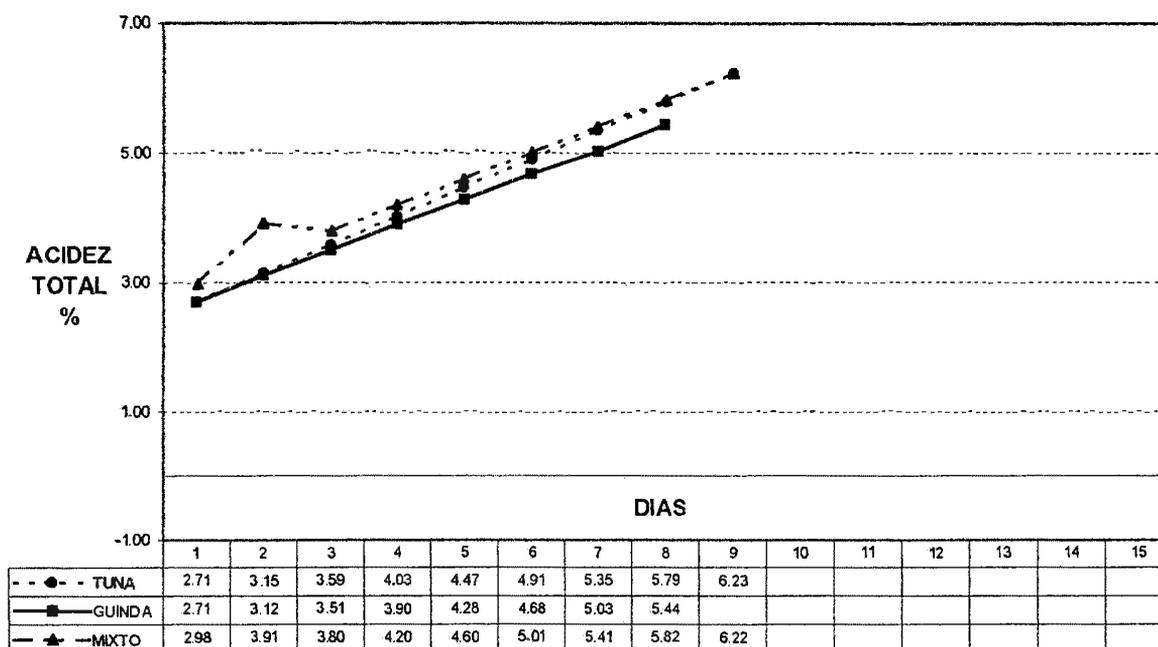
TABLA IX

VARIACION DE LA ACIDEZ TOTAL (% DE ACIDO ACETICO) DURANTE LA FERMENTACION ACETICA, Acetobacter ascendens A DIFERENTES DILUCIONES Y TEMPERATURAS.

Días	TUNA						GUINDA						MIXTO					
	Dilución 1:1		Dilución 2:1		Dilución 1:1		Dilución 2:1		Dilución 1:1		Dilución 2:1		Dilución 1:1		Dilución 2:1			
	T° 21°C	T° 28°C																
1	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00		
3	3,00	3,03	3,00	3,05	3,00	3,08	3,00	3,00	3,00	3,00	3,03	3,00	3,03	3,00	3,03	3,03		
5	3,02	3,15	3,03	3,27	3,04	3,20	3,03	3,03	3,25	3,04	3,31	3,04	3,31	3,05	3,39	3,39		
7	3,47	3,65	3,67	3,96	3,76	4,04	3,72	3,75	3,75	3,64	4,14	3,64	4,14	3,79	4,62	4,62		
9	3,96	4,28	3,90	4,64	4,21	4,35	4,14	4,27	4,27	4,00	4,52	4,00	4,52	3,96	5,01	5,01		
11	4,41	4,78	4,16	4,37	4,55	4,94	4,56	4,86	4,86	4,44	4,95	4,44	4,95	4,26	5,34	5,34		
13	4,76	5,19	4,69	5,38	4,81	5,14	4,75	5,09	5,09	4,86	5,44	4,86	5,44	4,71	5,58	5,58		
15	5,15	5,82	5,22	5,78	5,08	5,37	5,15	5,42	5,42	5,58	6,01	5,58	6,01	5,28	5,74	5,74		
17	5,54	6,48	5,50	6,28	5,28	5,37	5,50	5,42	5,42	5,95	6,90	5,95	6,90	5,72	5,76	5,76		
19	5,80	6,48	5,79	6,28	5,55	5,37	5,77	5,42	5,42	6,24	6,90	6,24	6,90	5,88	5,76	5,76		
21	6,10	6,48	6,05	6,28	5,70		5,74			6,80	6,90	6,80	6,90	6,18	5,76	5,76		
23	6,32		6,21		6,81		5,77			7,05		7,05		6,70				
25	6,69		6,52		6,81		6,06			7,16		7,16		6,85				
27	6,69		6,52		6,81		6,59			7,16		7,16		6,85				
29	6,69		6,52				6,59			7,16		7,16		6,85				
31							6,59					6,59						



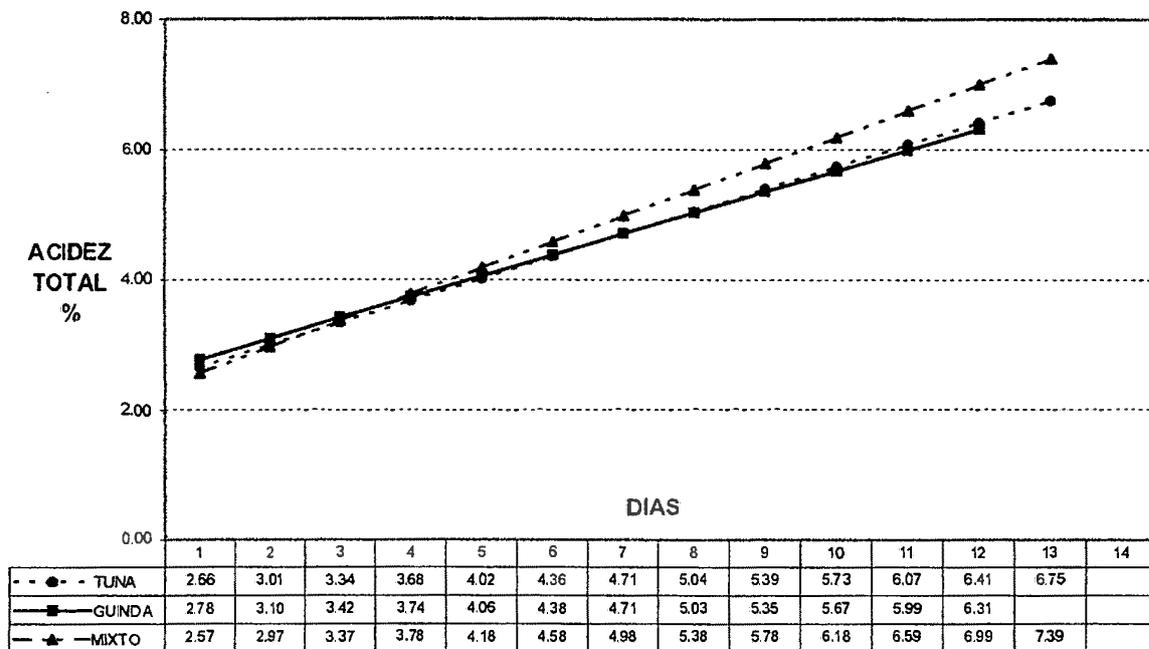
D: 1:1
T°C 28°C



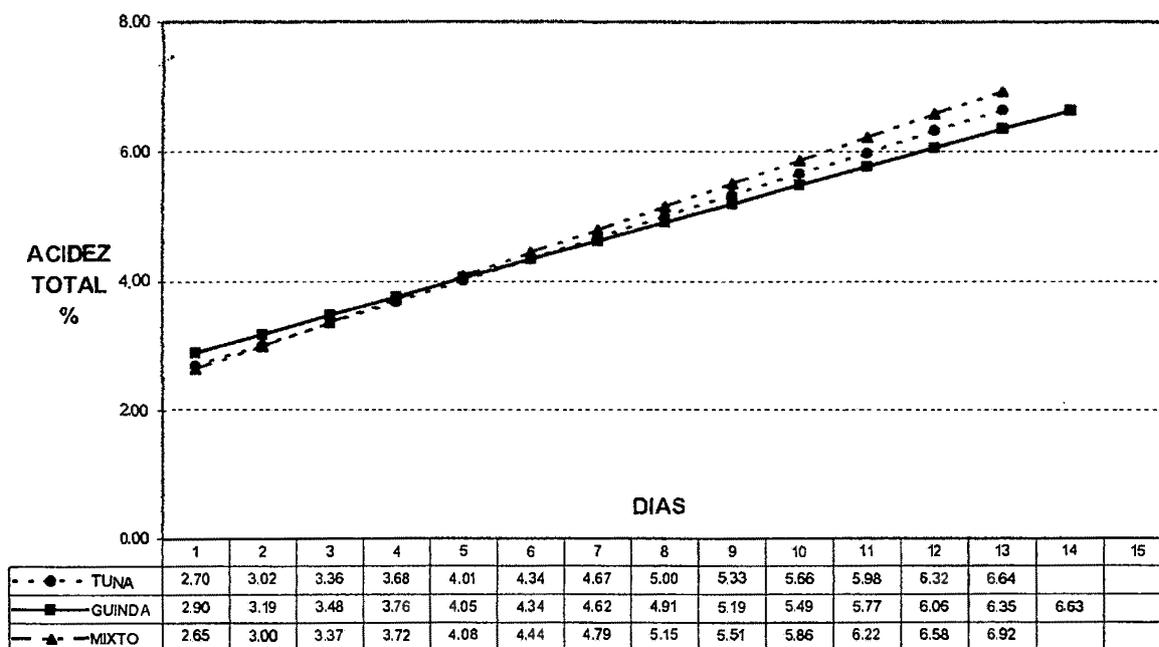
D:2:1
T°C 28°C

FIGURAN° 08

Gráfica ajustada de la acidez total(% ácido acético) durante la fermentación acética con Acetobácter ascendens a temperatura experimental (28°C).



D: 1:1
T °C 21 °C



D: 2:1
T °C 21 °C

FIGURAN° 09

Gráfica ajustada de la acidez total (% ácido acético) durante la fermentación acética con Acetobacter ascendens a temperatura ambiente (21°C).

B. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL CONTENIDO DE ACIDEZ (% DE ÁCIDO ACÉTICO) AL FINAL DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN ACÉTICA.

ANVA

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.c.	F 0.05
Substrato	2	1.9399	0.97	67.65	0.0001**
Dilución	1	0.5310	0.5310	37.04	0.0001**
Temperatura	1	2.9470	2.9470	205.55	0.0001**
Substrato * Dil	2	0.5893	0.2946	20.55	0.0001**
Subs *T°	2	0.9575	0.4788	33.39	0.0001**
Dil. *T°	1	0.1053	0.1053	7.35	0.0189*
Subs*Dil*T°	2	0.2417	0.1208	8.43	0.0052**
Error	12	0.1721	0.0143	--	
TOTAL	23	7.4838			

Como $F_c > F_t$, entonces existe diferencia altamente significativa entre los tratamientos, es decir la capacidad de fermentación acética por las bacterias acéticas se ve influenciada por el tipo de mosto alcohólico procedente de tuna, guinda y mixto; diluciones y temperaturas durante el proceso de acetificación.

B.1. ANVA DE EFECTOS SIMPLES DE LAS DILUCIONES (1:1 y 2:1) EN LAS TEMPERATURAS (21°C y 28°C) EN NIVEL DEL SUSTRATO TUNA.

SUBSTRATO TUNA	DILUCIONES		G.L.	S.C.	F.c.
	1:1	2:1			
21°C	13.38	13.04	1	0.0289	2.02 N.S.
28 °C	12.96	12.56	1	0.0400	2.78 N.S.

No existe evidencia significativa entre los mostos alcohólicos respecto a las diluciones y temperaturas empleados durante el proceso de acetificación.

B.2. ANVA DE EFECTOS SIMPLES DE LAS DILUCIONES (1:1 y 2:1) EN LAS TEMPERATURAS (21°C y 28°C) EN EL NIVEL DEL SUBSTRATO DE GUINDA

SUBSTRATO GUINDA	DILUCIONES		G.L.	S.C.	F.c.
	1:1	2:1			
21 °C	13.21	13.18	1	0.00025	0.02 N.S.
28 °C	10.74	10.84	1	0.0025	0.17 N.S.

No existe diferencia significativa entre el mosto alcohólico guinda en relación a la temperatura y diluciones durante el proceso de acetificación.

B.3. ANVA DE EFECTOS SIMPLES DE LAS DILUCIONES (1:1 y 2:1) EN LAS TEMPERATURAS (21°C y 28°C) EN EL NIVEL DEL SUBSTRATO MIXTO.

SUBSTRATO MIXTO	DILUCIONES		G.L.	S.C.	F.c.
	1:1	2:1			
21 °C	14.32	13.70	1	0.0961	6.70*
28°C	13.80	11.52	1	1.2996	90.64*

Prueba de Tukey

Substrato Mixto: - Dilución 1:1 en temperatura 21°C: 7.16

- Dilución 2:1 en temperatura 21°C : 6.85

Substrato Mixto: - Dilución 1:1 en temperatura 28°C : 6.90

- Dilución 2:1 en temperatura 28°C: 5.96

Existe diferencia significativa entre el mosto alcohólico mixto respecto a las diluciones y temperaturas empleadas, siendo las mejores la dilución 1:1 del mosto alcohólico mixto a una temperatura de 21°C y 28°C.

B.4. ANVA DE EFECTOS SIMPLES DE LAS TEMPERATURAS (21°C y 28°C) EN LAS DILUCIONES (1:1 y 2:1) EN EL SUBSTRATO TUNA.

SUBSTRATO TUNA	TEMPERATURA		G.L.	S.C.	F.c.
	21°C	28 °C			
1:1	13.38	12.96	1	0.0441	3.07 N.S.
2:1	13.04	12.56	1	0.0576	4.02 N.S.

No existe diferencia significativa del mosto alcohólico tuna respecto a las temperaturas y diluciones empleados durante el proceso de acetificación.

B.5. ANVA DE EFECTOS SIMPLES DE LAS TEMPERATURAS (21°C y 28°) EN LAS DILUCIONES (1:1 y 2:1) EN EL SUBSTRATO GUINDA.

SUBSTRATO GUINDA	TEMPERATURA		G.L.	S.C.	F.c.
	21 °C	28 °C			
1:1	13.21	10.74	1	1.5252	106.38**
2:1	13.18	10.84	1	1.3689	95.48**

Prueba de Tukey

Substrato Guinda:- Temperatura 21°C en dilución 1:1 : 6.61

- Temperatura 28°C en dilución 1:1 : 5.37

Substrato Guinda: - Temperatura 21°C en dilución 2:1 : 6.59

- Temperatura 28°C en dilución 2:1 : 5.42

Existe diferencias altamente significativas del mosto alcohólico guinda respecto a las temperaturas y diluciones empleadas, siendo las mejores las diluciones 1:1 y 2:1 a una temperatura de 21°C.

B.6. ANVA DE EFECTOS SIMPLES DE LAS TEMPERATURAS (21°C y 28°C) EN LAS DILUCIONES (1:1 y 2:1) EN EL SUBSTRATO MIXTO

SUBSTRATO MIXTO	TEMPERATURA		G.L.	S.C.	F.c.
	21 °C	28 °C			
1:1	14.32	13.80	1	0.0676	4.71 N.S.
2:1	13.70	11.52	1	1.1881	82.86**.

Prueba de Tukey

Substrato Mixto: - Temperatura 21°C en dilución 2:1 : 6.85

- Temperatura 28°C en dilución 2:1 : 5.76

Existe diferencia altamente significativa entre el mosto alcohólico mixto respecto a las temperaturas y dilución 2:1, siendo el mejor la dilución 2:1 a una temperatura de 21°C.

B.7. ANVA DE EFECTOS SIMPLES DE LOS SUBSTRATOS (TUNA, GUINDA Y MIXTO) EN LAS DILUCIONES (1:1 y 2:1) EN LA TEMPERATURA 21°C

T° 21°C	SUBSTRATO			G.L.	S.C.	C.M.	F.c.
	TUNA	GUINDA	MIXTO				
1:1	13.38	13.21	14.32	2	0.3574	0.1787	24.92**
2:1	13.04	13.18	13.70	2	0.1209	0.0605	4.22*

Prueba de Tukey

Temperatura 21°C:

- Substrato Tuna en dilución 1:1 : 6.69
- Substrato Guinda en dilución 1:1 : 6.61
- Substrato Mixto en dilución 1:1 : 7.16

Temperatura 21°C:

- Substrato Tuna en dilución 2:1 : 6.52
- Substrato Guinda en dilución 2:1 : 6.59
- Substrato Mixto en dilución 2:1 : 6.85

Existe diferencia altamente significativa entre la temperatura 21°C respecto a los mostos alcohólicos y diluciones empleados durante el proceso de acetificación siendo el mejor el mosto alcohólico mixto, dilución 1:1 y 2:1.

B.8. ANVA DE EFECTOS SIMPLES DE LOS SUBSTRATOS (TUNA, GUINDA y MIXTO) EN LAS DILUCIONES (1:1 y 2:1) EN LA TEMPERATURA 28°C

T°	SUBSTRATO			G.L.	S.C.	C.M.	F.c.
	TUNA	GUINDA	MIXTO				
28 °C							
1:1	12.96	10.74	13.80	2	2.4996	1.2498	87.17**
2:1	12.56	10.84	11.52	2	0.7504	0.3772	26.17**

Prueba de Tukey

Temperatura 28°C:

- Substrato Tuna en dilución 1:1 :6.48
- Substrato Guinda en dilución 1:1 : 5.37
- Substrato Mixto en dilución 1:1 : 6.90

- Temperatura 28°C:**
- Substrato Tuna en dilución 2:1 : 6.28
 - Substrato Guinda en dilución 2:1 : 5.42
 - Substrato Mixto en dilución 2:1 : 5.76

Existe evidencia altamente significativa de la temperatura 28°C respecto a los mostos alcohólicos y diluciones, siendo el mejor el mosto alcohólico mixto y dilución (1:1) y una dilución (2:1) ambos a una temperatura de 28°C.

B.9. ANVA DE EFECTOS SIMPLES DE LAS DILUCIONES (1:1 y 2:1) EN LOS SUBSTRATOS (TUNA, GUINDA Y MIXTO) EN LA TEMPERATURA 21°C.

TEMPERATURA	DILUCION		G.L.	S.C.	F.c.
	1:1	2:1			
21 °C					
TUNA	13.38	13.04	1	0.0289	2.08 N.S.
GUINDA	13.21	13.18	1	0.0002	0.016 N.S
MIXTO	14.32	13.70	1	0.0961	6.702*

Prueba de Tukey

- Temperatura 21°C:**
- Dilución 1:1 en substrato mixto : 7.16
 - Dilución 2:1 en substrato mixto : 6.85

Existe diferencia significativa entre la temperatura 21°C respecto a la dilución y mosto alcohólico mixto, siendo mejor la dilución 1:1 en el mosto alcohólico mixto

B.10. ANVA DE EFECTOS SIMPLES DE LAS DILUCIONES (1:1 y 2:1) EN LOS SUBSTRATOS (TUNA, GUINDA Y MIXTO) EN LA TEMPERATURA 28°C.

TEMPERATURA	DILUCION		G.L.	S.C.	F.c.
	1:1	2:1			
28 °C					
TUNA	12.96	12.56	1	0.040	2.78 N.S.
GUINDA	10.74	10.84	1	0.0025	0.17 N.S
MIXTO	13.80	11.52	1	1.2996	90.64*

Prueba de Tukey

Temperatura 28°C:

- Dilución 1:1 en substrato mixto : 6.9
- Dilución 2:1 en substrato mixto : 5.76

Existe diferencia significativa entre la temperatura 28°C respecto a las diluciones del mosto alcohólico mixto, siendo mejor la dilución 1:1.

B.11. ANVA DE EFECTOS SIMPLES DE LOS SUBSTRATOS (TUNA, GUINDA y MIXTO) EN LAS TEMPERATURAS (21°C y 28°C) EN LA DILUCIÓN 1:1.

DILUCION	SUBSTRATO			G.L.	S.C.	C.M.	F.c.
	TUNA	GUINDA	MIXTO				
21:							
2:1 °C	13.38	13.21	14.32	2	0.3574	0.1787	12.46**
28 °C	12.96	10.74	13.80	2	0.2498	0.0605	87.17**

Prueba de Tukey

Dilución 1:1.- - Substrato Tuna en temperatura 21°C : 6.69

- Substrato Guinda en temperatura 21°C : 6.61

- Substrato mixto en temperatura 21°C : 7.16

Dilución 1:1.- - Substrato Tuna en temperatura 28°C : 6.48

- Substrato Guinda en temperatura 28°C : 5.37

- Substrato mixto en temperatura 28°C : 6.90

Existe diferencias altamente significativas entre la dilución 1:1 respecto a los mostos alcohólicos y las temperaturas; siendo el mosto alcohólico mixto el mejor a una temperatura de 21°C y 28°C.

B.12. ANVA DE EFECTOS SIMPLES DE LOS SUBSTRATOS (TUNA, GUINDA y MIXTO) EN LAS TEMPERATURAS (21°C y 28°C) EN LA DILUCIÓN 2:1

DILUCION	SUBSTRATO			G.L.	S.C.	C.M.	F.c.
	TUNA	GUINDA	MIXTO				
2:1 °C	13.04	13.18	13.70	2	0.1209	0.0605	4.22*
28 °C	12.56	10.84	11.52	2	0.7504	0.3752	26.17**

Prueba de Tukey

Dilución 2:1.- - Substrato Tuna en temperatura 21°C : 6.52

- Substrato Guinda en temperatura 21°C : 6.59

- Substrato Mixto en temperatura 21°C : 6.85

Dilución 2:1.- - Substrato Tuna en temperatura 28°C : 6.28

- Substrato Guinda en temperatura 28°C : 5.42

- Substrato Mixto en temperatura 28°C : 5.76

Existe diferencia altamente significativa entre la dilución 2:1 respecto a los mostos alcohólicos y temperaturas empleadas, siendo mejor el mosto alcohólico mixto a 21°C y el mosto alcohólico tuna a 28°C.

B.13. ANVA DE EFECTOS SIMPLES DE LAS TEMPERATURAS (21°C y 28°C) EN LOS SUBSTRATOS (TUNA, GUINDA y MIXTO) EN LA DILUCIÓN 1:1

TEMPERATURA	DILUCION		G.L.	S.C.	F.c.
	1:1	2:1			
28 °C					
TUNA	13.38	12.96	1	0.0441	3.07 N.S.
GUINDA	13.21	10.74	1	1.5252	106.37 **
MIXTO	14.32	13.80	1	0.0676	4.71 N.S.

Prueba de Tukey

Dilución 1:1.- - Temperatura 21°C en substrato guinda : 6.61

- Temperatura 28°C en substrato guinda : 5.37

Existe diferencia altamente significativa entre la dilución 1:1 respecto a las temperaturas y el mosto alcohólico guinda, siendo el mejor el substrato guinda a una temperatura 21°C.

B.14. ANVA DE EFECTOS SIMPLES DE LAS TEMPERATURAS (21°C y 28°C) EN LOS SUBSTRATOS (TUNA, GUINDA Y MEZCLA) EN LA DILUCIÓN 2:1

TEMPERATURA	DILUCION		G.L.	S.C.	F.c.
	1:1	2:1			
28 °C					
TUNA	13.04	12.56	1	0.0576	4.02 N.S.
GUINDA	13.18	10.84	1	1.3689	95.47**
MIXTO	13.70	11.52	1	1.1881	82.86**

Prueba de Tukey

Dilución 2:1.- Temperatura 21°C en el substrato Guinda : 6.59

- Temperatura 28°C en el substrato Guinda : 5.42

Dilución 2:1.- Temperatura 21°C en el substrato Mixto : 6.85

- Temperatura 28°C en el substrato Mixto : 5.76

Existe diferencia altamente significativa entre la dilución 2:1 respecto a las temperaturas y mostos alcohólicos guinda y mixta, siendo los mejores el mosto alcohólico guinda y mixto, ambos a una temperatura de 21°C.

6. EVALUACIÓN FISICO-QUIMICA DE PRODUCTO FINAL.

Terminado el proceso de la acetificación el producto obtenido fue filtrado en frascos oscuros con tapa hermética para su posterior pasteurización. Realizada ésta operación, se mantuvieron los frascos en reposo por espacio de una semana con la finalidad de coadyuvar a la

clarificación por decantación en forma natural, así como para conseguir que el producto tome cuerpo y una maduración adecuada. Al cabo de este tiempo se procedió a la toma de pequeñas muestras para realizar el análisis físico - químico de los vinagres obtenidos, cuyos resultados se muestran en la **TABLA X**. Así, se puede apreciar que los valores obtenidos están dentro de los rangos establecidos por la Norma Técnica Peruana (INDECOPI, 1970), respecto a la elaboración de vinagre, determinando con esto la calidad del producto de tal manera que llegue al consumidor con óptimas características. El punto más importante que se puede resaltar, es la acidez alcanzada en la presente investigación de **7.16%** valor que resulta inclusive más alto que lo estipulado en la Norma Técnica Peruana, pudiendo éste producto ser muy útil para satisfacer las necesidades de la industria conservera o también para ser diluido a un 4% de acidez para el consumo humano.

7. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

En la **TABLA XI** se reporta el análisis microbiológico de los vinagres obtenidos de tuna, guinda y mixto, teniendo como parámetros microbiológicos: a los microorganismos Mesófilos Aerobios viables, Coliformes Totales y Fecales, Enterococos y Lactobacillus; observándose que están dentro de los valores normales según la Norma Técnica Peruana. Por tanto la presencia de estos valores dentro de los valores permisibles se debe a que durante el proceso de elaboración se emplearon agentes estabilizantes fisico-químicos (sulfitos y pasteurizado). Así como también la acidez debida al ácido acético.

TABLA X
COMPOSICIÓN FÍSICO - QUÍMICA DE LOS VINAGRES OBTENIDOS

VARIABLES	TUNA			GUINDA			MIXTO			
	Dilución 1:1	Dilución 2:1		Dilución 1:1	Dilución 2:1		Dilución 1:1	Dilución 2:1		
	T°: 21°C	T°: 28°C	T°: 21°C	T°: 21°C	T°: 28°C	T°: 21°C	T°: 21°C	T°: 28°C	T°: 21°C	T°: 28°C
DENSIDAD A 20°C (1.010 a 1.023)	1,02	1,02	1,02	1,02	1,01	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02
pH Potenciométrico (2,6)	3,29	3,30	3,16	3,44	3,32	3,32	3,34	3,38	3,25	3,42
ACIDEZ TOTAL en gramos de ácido acético por 100 mL (Mín. 4%)	6,67	6,48	6,52	6,61	6,59	5,42	7,16	6,90	6,85	5,47
ACIDEZ FLJA en gramos de ácido sulfúrico por 100 mL (0,1a 0,3)	0,25	0,25	0,26	0,24	0,18	0,20	0,28	0,26	0,27	0,22
Alcohol en volumen a 20°C (Máx. 1%)	0,40	0,28	0,34	0,26	0,36	0,40	0,30	0,32	0,36	0,26
Extracto libre de azúcares reductores (Mín. 0,7%)	0,72	0,80	0,67	0,44	0,60	0,62	0,42	0,74	0,50	0,70
Extracto seco a 100°C (Mín. 1,2%)	2,20	2,26	2,21	2,73	2,65	2,67	2,75	2,62	2,68	2,55
Cenizas Totales (Mín. 0,1%)	0,30	0,27	0,26	0,52	0,56	0,40	0,52	0,62	0,47	0,60

CONCLUSIONES

Habiendo terminado, el desarrollo de los objetivos propuestos en el presente trabajo de tesis se llegó a las siguientes conclusiones:

1. El mosto que presentó mayor contenido de azúcares totales y azúcares fermentecibles fue el de guinda (12.64 °Brix y 7.24 mg/mL, respectivamente) seguido por la mezcla tuna-guinda y el mosto de tuna.
2. La bacteria acética aislada y posteriormente sometida a observación macroscópica, microscópica y pruebas bioquímicas fue identificada como Acetobacter ascendens.
3. El mayor porcentaje de etanol, alcanzado (7.92 g/%), en la fermentación alcohólica fue con la mezcla de mostos tuna-guinda en cantidades iguales, diluida 1:1 con agua, a la temperatura de 28°C por espacio de 6 días.

4. El mayor grado de acetificación alcanzado (7.16%), en la fermentación acética de los mostos mezcla tuna-guinda, provenientes de la dilución 1:1 a temperatura ambiental (21°C) por espacio de 25 días.
5. Todos los vinagres obtenidos tanto de tuna, guinda y mezcla de ambas tienen características fisico-químicas comprendidas dentro de la Norma Técnica Peruana respectiva.
6. El informe de ensayo de laboratorio, en relación a las características microbiológicas revela ausencia de contaminación fecal o cualquier otro signo de alteración por causa microbiana en todos los vinagres.

RECOMENDACIONES

Se plantean las siguientes recomendaciones:

- 1.** Promover, organizar y llevar a efecto convenios con instituciones como el Ministerio de Salud, Ministerio de Agricultura y otras a fin de difundir mediante campañas la importancia y ventajas del consumo masivo de productos naturales, tales como vinagres elaborados con frutas regionales que actualmente enfrentan una competencia desleal con los productos del comercio informal.
- 2.** Ampliar los estudios técnico-económicos a fin de ver la posibilidad de producir vinagres con frutas regionales, utilizando el método ensayado.
- 3.** Probar la elaboración de vinagres de tuna y guinda con otros métodos, tales como el método rápido, método sumergido e incluso con técnicas de inmovilización celular; a fin de establecer el método más óptimo y rentable, bajo las condiciones existentes a nivel local y regional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALCAZAR, Tania (1997). Diseño de una planta piloto de extracción de aceite a partir de semillas de guinda. TESIS. UNSCH. Ayacucho-Perú.
2. ALEGRIA, V. (1982). Manual de prácticas de microbiología industrial. Ayacucho - Perú.
3. AMERINE, M. (1976). Análisis de vinos y mostos. Editorial Acribia. Zaragoza - España.
4. AQUARONE, E.; DE ALMEIDA, U. y BORZANI, W. (1983) Alimentos y bebidas producidos por fermentación. Volumen 5. Editorial Edgard Blucher. Ltda. Brasil.
5. BERGEY'S.(1957). Manual of determinative bacteriology. Volumen II. Editorial BOARD. U.S.A.
6. BERROCAL, R. (1968). Unas propiedades químicas de la tuna. Repport de Stage. UNSCH. Ayacucho.
7. BETALLELUZ, F. (1989). Obtención de etanol por bioconversión de cáscara de baya Opuntia ficus indica (tuna), utilizando células inmovilizadas de Pachisolen tannophilus ATCC 32691. Tesis. UNSCH. Ayacucho - Perú.
8. BOURGEOIS, C. (1995). Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza - España.
9. BROCK, T. y MADIGAN, M. (1993). Microbiología. 6ta edición Editorial Acribia S.A. España.

10. BRUCHMAN, E. (1980). Bioquímica técnica. Editorial Acribia. Zaragoza - España.
11. CALZADA, J. (1985). 143 frutales nativos. UNALM. Lima Perú.
12. COLLAZOS, C. (1996). Tabla peruana de composición de los alimentos. 7ma edición. Lima - Perú.
13. COLLINS, C. (1969). Métodos microbiológicos. EditAcribis. España.
14. CARBONELL, M. (1970). Tratados de viticultura y anexos sobre vinagres. Editorial AEDOS. España.
15. CARLO, A. (1948). Elementi di microbiología general ed applicator alle fermentazioni. Editorial Mino. Italia.
16. CRUES, W. (1948). Industrialización de frutas y hortalizas. Tomo II. Editorial Sueldo Argentino. Buenos Aires - Argentina.
17. CRUZ, M. (1996). Obtención de vinagre a partir de tuna (Opuntia ficus indica) variedad morada. Tesis UNAM. Lima- Perú.
18. CHIPANA, M. (1989). Producción de etanol a partir de la savia del Agave americana "cabuya", utilizando cepas de Saccharomyces cerevisiae ATCC 4126 Y Saccharomyces s SR-1. Tesis UNSCH. Ayacucho - Perú.
19. CHUCHON, S. (1989). Producción de etanol y proteína monocelular a partir de Oxalis tuberosa "oca" usando Saccharomyces cerevisiae ATCC 4126. Tesis UNSCH. Ayacucho - Perú.
20. FRAZIER, W. y WESTOFF, D. (1985). Microbiología de los alimentos. 3ra edición. Editorial Acribia. S.A. España.

21. GAMARRA, G. (1979). Tópicos selectos sobre fermentaciones industriales. Tomo II. UNMSM. Lima - Perú.
22. GARCIA GODOS, Paula (1994). Producción de etanol utilizando gramíneas naturales "ichu" como fuente de celulosa. Tesis UNSCH. Ayacucho - Perú.
23. GARRIDO, N. (1954). Elaboración de vinagres. Selecta enciclopedia práctica. Nº 38. Edit. SINTES. España.
24. HATTA, B.(1998). Curso de elaboración de vinos, vinagres y licores. UNALM. Lima - Perú.
25. INDOAGRO. (1997). Tuna y cochinilla. Editorial Fondo de desarrollo de proyectos. Lima - Perú.
26. INDECOPI. (1970). Vinagre. 209.020. Requisitos
27. INDECOPI. (1970). Método para determinar el extracto seco total. 209.021.
28. INDECOPI. (1970). Método para determinar cenizas 209.022.
29. INDECOPI. (1970). Método para determinar la acidez fija. 209.024
30. JAGNOW, G. y DAWID, W.(1991). Biotecnología, introducción con experimentos modelo. 1ra edición. Editorial Acribia. S.A. España.
31. JORGENSEN, A. (1969). Microbiología de las fermentaciones industriales. 7ma edición. Editorial Acribia . Zaragoza - España.
32. LESLIE, A. (1971). Análisis moderno de alimentos. Editorial Acribia S.A. Zaragoza - España.

33. MAYER, L. (1963). Métodos de la industria química. 2da parte orgánica. Editorial Reverté S.A. Argentina.
34. MEDINA, N. (1983). Obtención de vinagre a partir de desechos de piña. Tesis - UNALM. Lima - Perú.
35. MILLER, G. (1959). Analytical chemistry methods in microbiology. U.S.A.
36. PASCUAL, María (1992). Microbiología alimentaria. Metodología Analítica para alimentos y bebidas. Editorial Díaz Santos S.A. Madrid. España.
37. PRESCOTT, S. y DUNN, D. (1976). Microbiología Industrial. 3ra Edición. Editorial Acribia. Madrid - España.
38. PARODI, L. (1964). Enciclopedia argentina de agricultura y jardinería. Tomo II. Editorial ACME. S.A. Buenos Aires -Argentina.
39. PEREZ, S. (1980). Morfología y estructura de las levaduras. En : "Seminario internacional de la cerveza". UNMSM. lima - Perú.
40. QUINTANA, N. (1988). Obtención de vinagre a partir de frutas sobre maduras. Tesis. UNALM. Lima - Perú.
41. ROUGIEUX, R. (1964). Técnicas de microbiología agrícola y técnicas de la industria agrícola. Edit Acribia. Zaragoza - España.
42. TICONA, T. (1981). Obtención de etanol y vinagre de plátano. Tesis UNALM. Lima - Perú.
43. VERMAN, A. (1994). Bebidas, tecnología química y microbiológica. Editorial Acribia. Zaragoza - España.

44. VILLAVERDE, Zoraida. (1987). Estudio técnico de la producción continua de etanol en un fermentador de relleno con células inmovilizadas. Tesis. UNSCH. Ayacucho. Perú.
45. VOGT, E. (1972). Fabricación de vinos. Editorial Acribia. Zaragoza - España.
46. WARD, O. (1991). Biotecnología de la fermentación. Editorial Acribia S.A. España.

ANEXOS



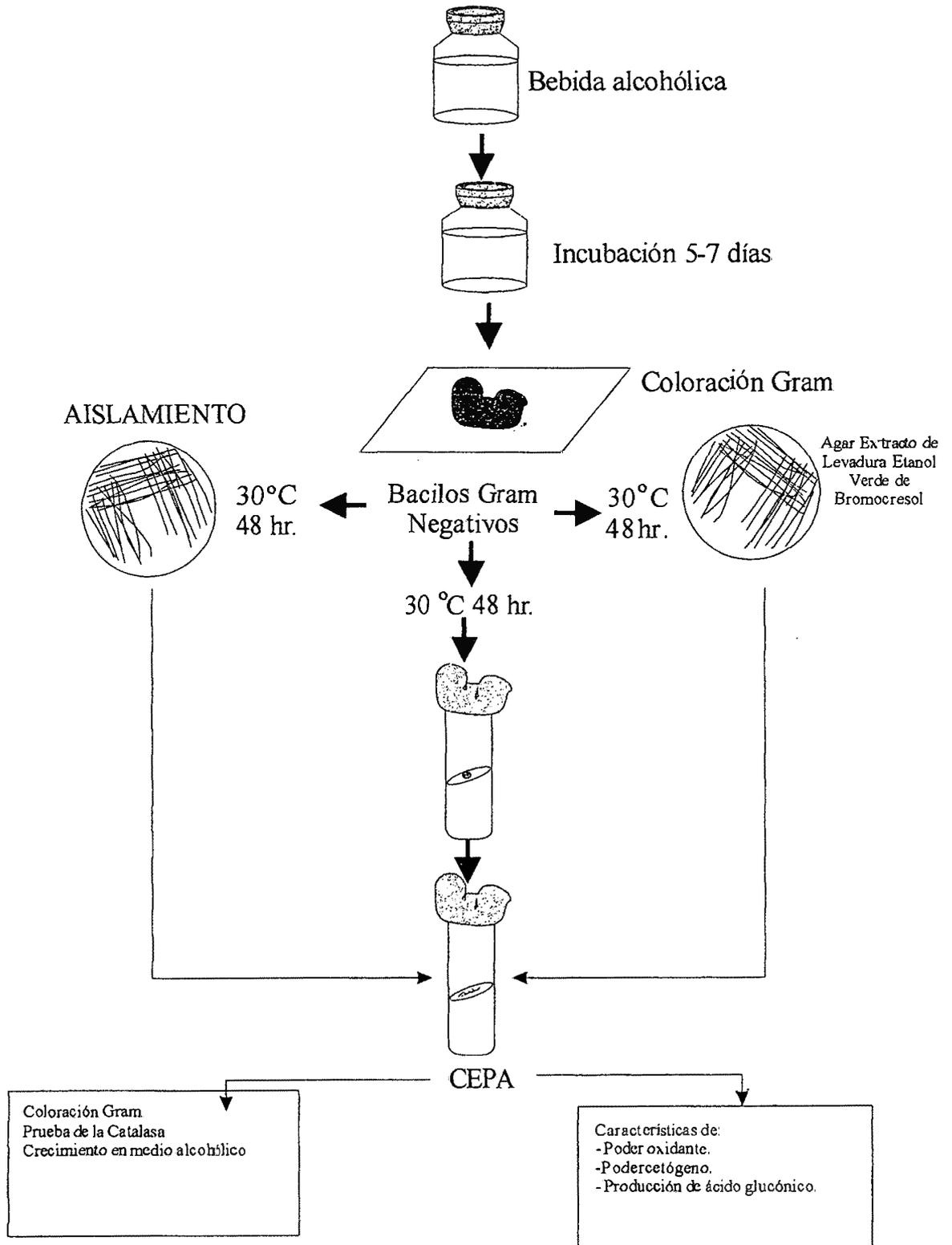
ANEXO N° 01**COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL AGAR EXTRACTO DE
LEVADURA ETANOL VERDE DE BROMO CRESOL**

Extracto de levadura.....	30.0g
Verde de Bromocresol (2.2% solución acuosa).....	1.0 mL
Agar.....	20.0 g.
Agua destilada.....	1000.0 mL
pH: 7.4	

Nota.- Se disolvió el extracto de levadura y el agar a vapor fuente y se adicionó la solución verde de bromocresol, se repartió en frascos de baquelita, se esterilizó, enfrió a 45 - 50°C y se añadió 0.3 mL de etanol al 50% (Alegría, 1982)

ANEXO 02

ESQUEMA DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE BACTERIAS ACETICAS



ANEXO 03**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA
POR EL MÉTODO DE MILLER (Miller, 1959)**

La concentración de azúcares reductores expresado como glucosa se determinó siguiendo el método de Miller usando el ácido 3,5 - dinitrosalisílico (DNS), citado por Villaverde (1987).

REACTIVOS:**Mezclar:**

Agua destilada.....	1416.0 mL
DNS.....	10.6 g.
NaOH.....	19.8 g.
Disolver la muestra anterior y añadir:	
Tartrato de sodio y potasio.....	306.0 g.
Fenol (fundido a 50°C).....	7.6 mL
Metabisulfito de sodio.....	8.3 g.

Procedimiento.

1. Colocar 1 mL de muestra en un tubo de ensayo y añadir 3 mL del reactivo DNS (las muestras deben de contener de 0.2 a 1 g. de glucosa por litro).
2. Colocar estos tubos en agua hirviendo por 5 minutos.

3. Enfriar a temperatura ambiente y diluir la muestra hasta 20 mL con agua destilada.
4. Siguiendo el mismo procedimiento preparar glucosa estándar y para el blanco, utilizar agua destilada.
5. Leer al espectrofotómetro usando una longitud de onda de 550 nm. Para el presente trabajo, los valores de la absorbancia y concentración de la muestra estándar fueron:

<u>Azúcares reductores (g/L)</u>	<u>Absorbancia</u>
0.2	0.124
0.4	0.264
0.6	0.413
0.8	0.535
0.1	0.667

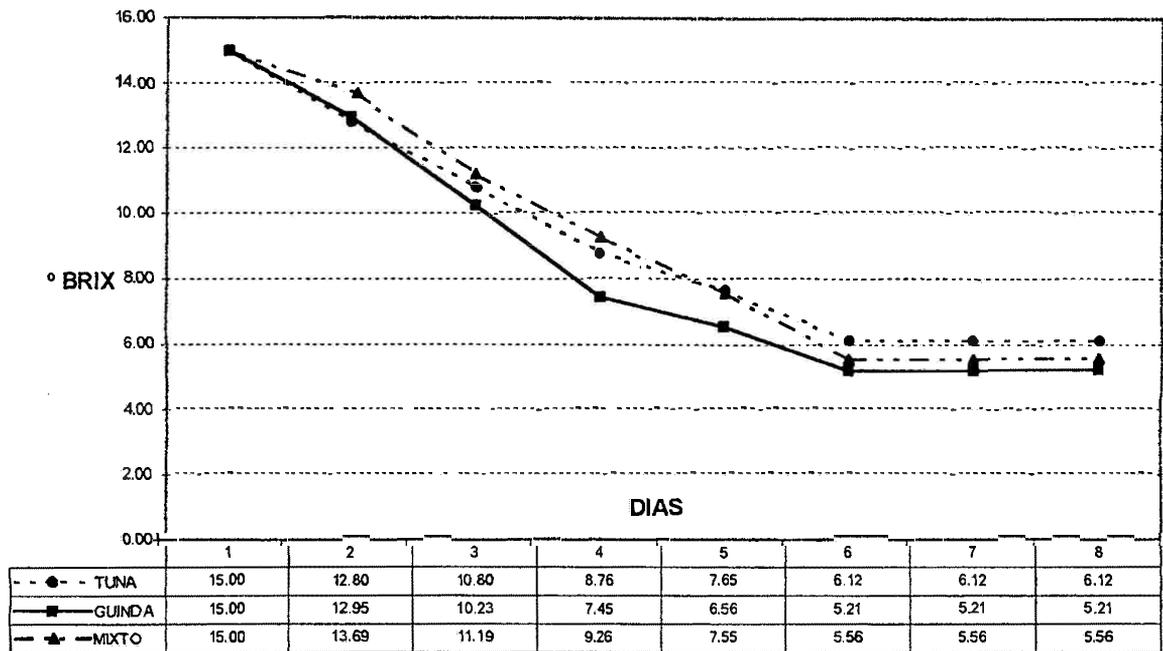
Estos datos fueron programados en una calculadora Casio fx - 4000P para obtener la siguiente ecuación:

$$Y = -0.006 + 0.678 (x)$$

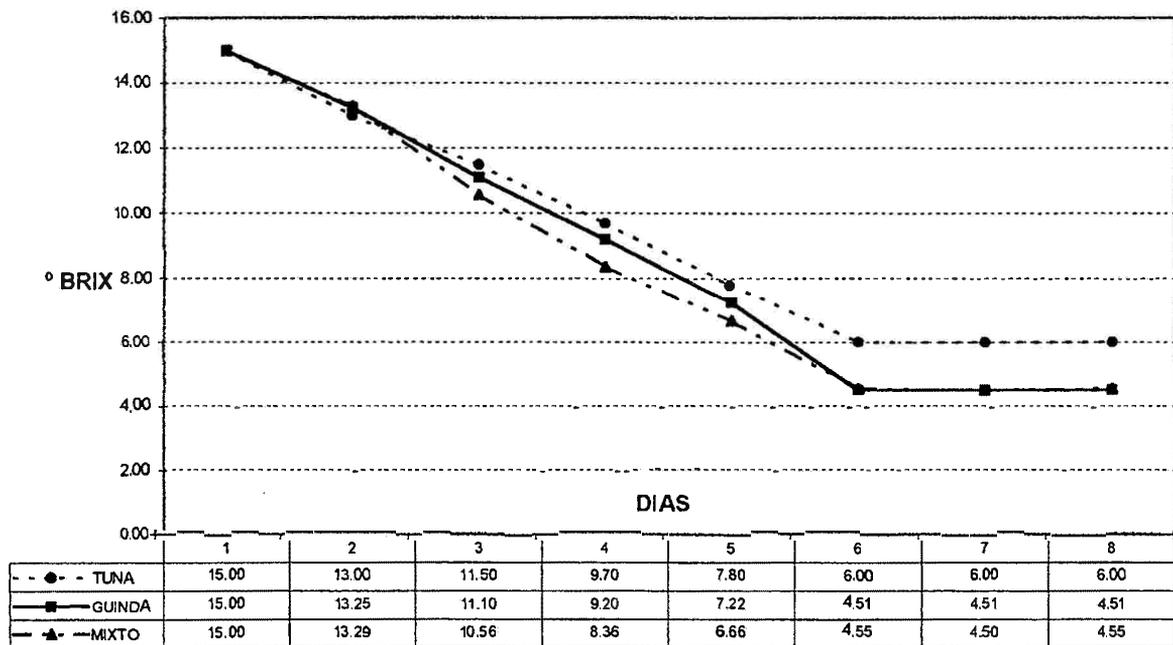
Con un coeficiente de correlación de :

$$r = 0.9994.$$

ANEXO04



D: 1:1
T °C 28 °C

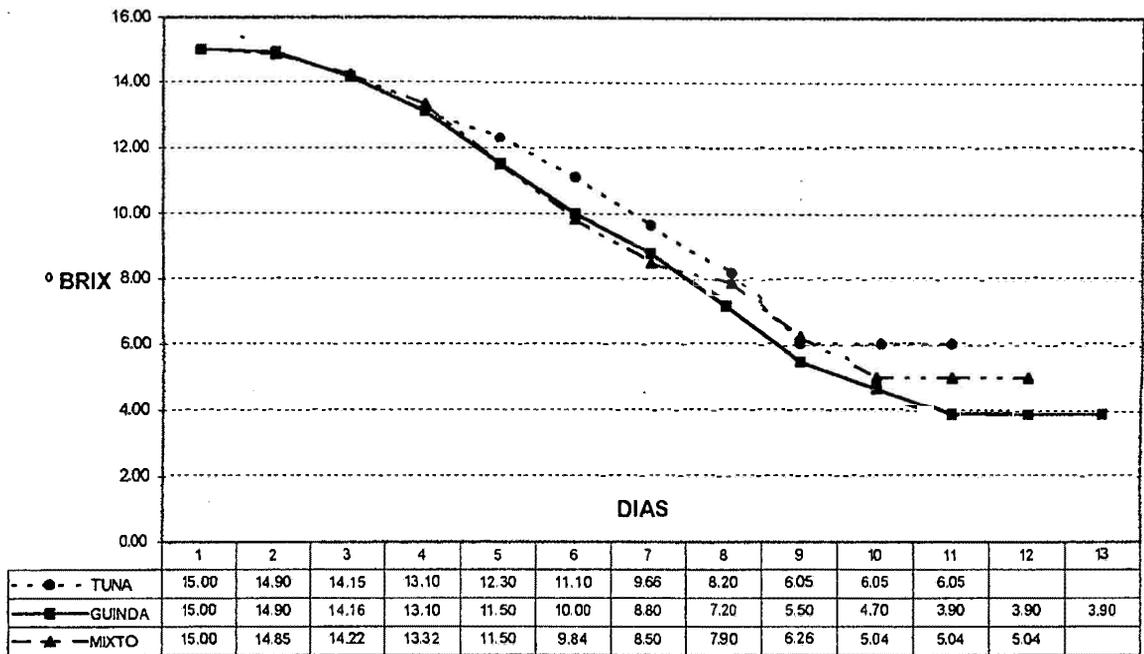


D: 2:1
T °C 28 °C

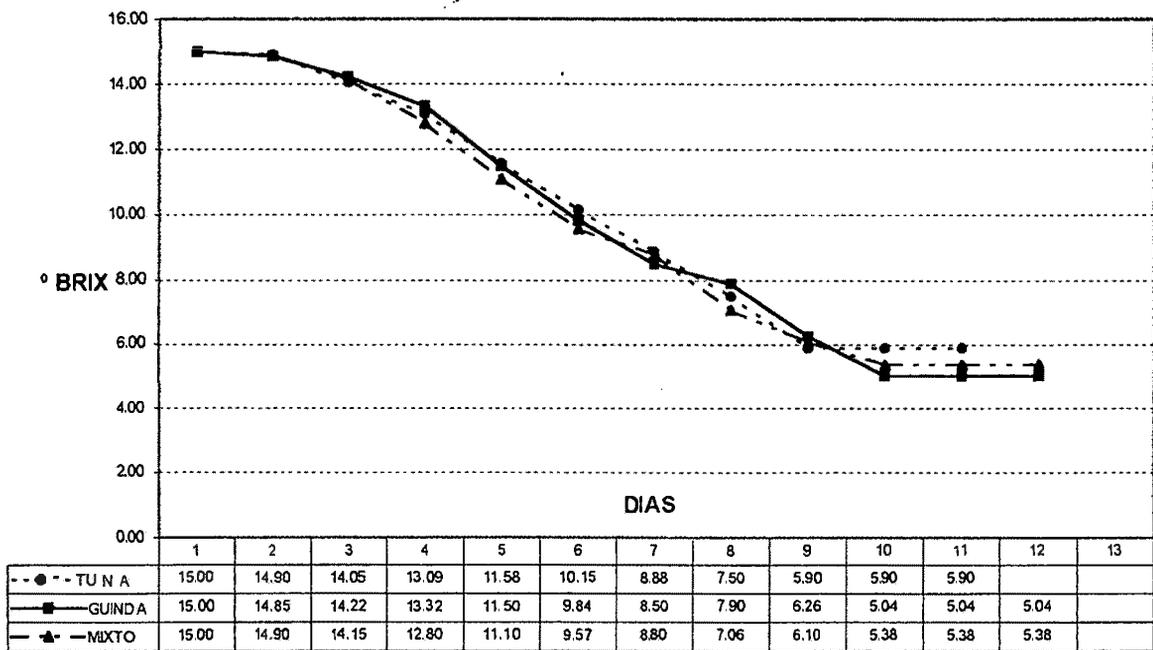
FIGURAN° 10

Gráfica no ajustada de la variación de los azúcares totales durante la fermentación alcohólica, con Saccharomyces cerevisiae ATCC 4126 a temperatura experimental (28°C).

ANEXO 05



D: 1:1
T°C 21 °C

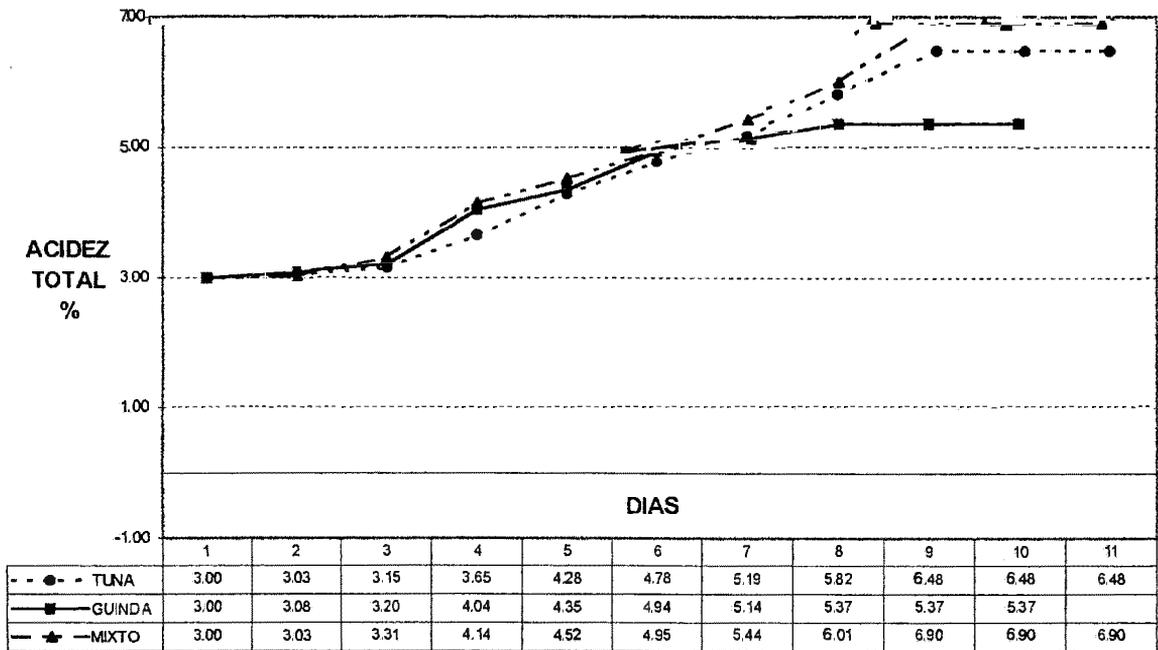


D: 2:1
T°C 21 °C

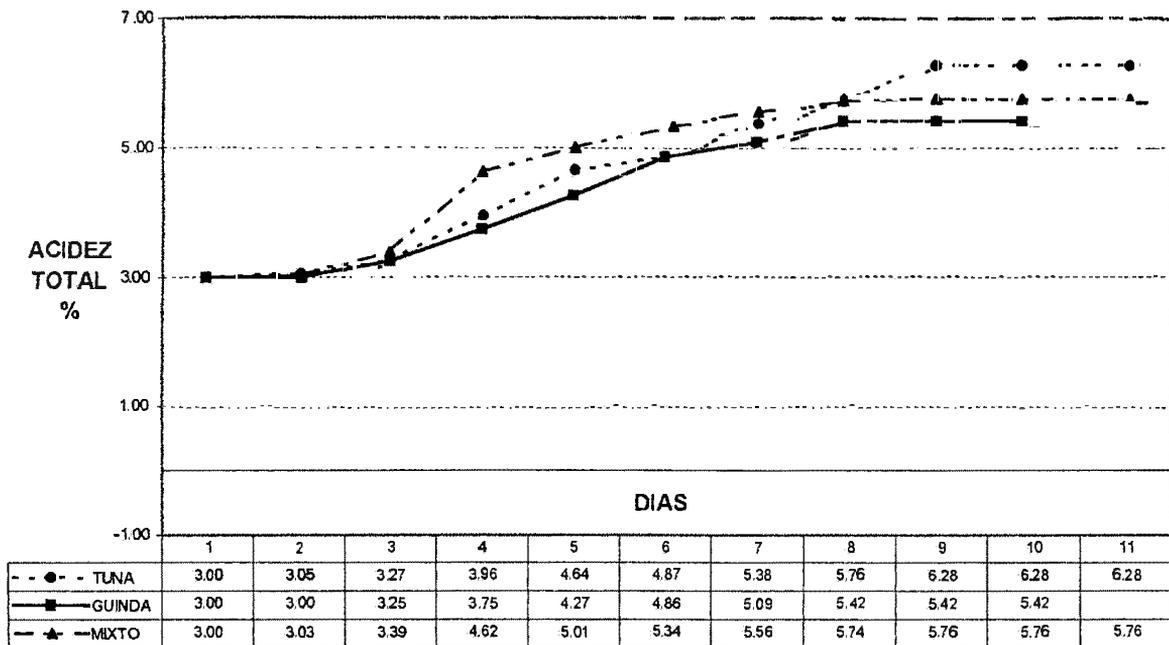
FIGURAN° 11

Gráfica no ajustada de la variación de los azúcares totales durante la fermentación alcohólica, con Saccharomyces cerevisiae ATCC 4126 a temperatura ambiente (21°C).

ANEXO 06



D: 1:1
T°C28°C

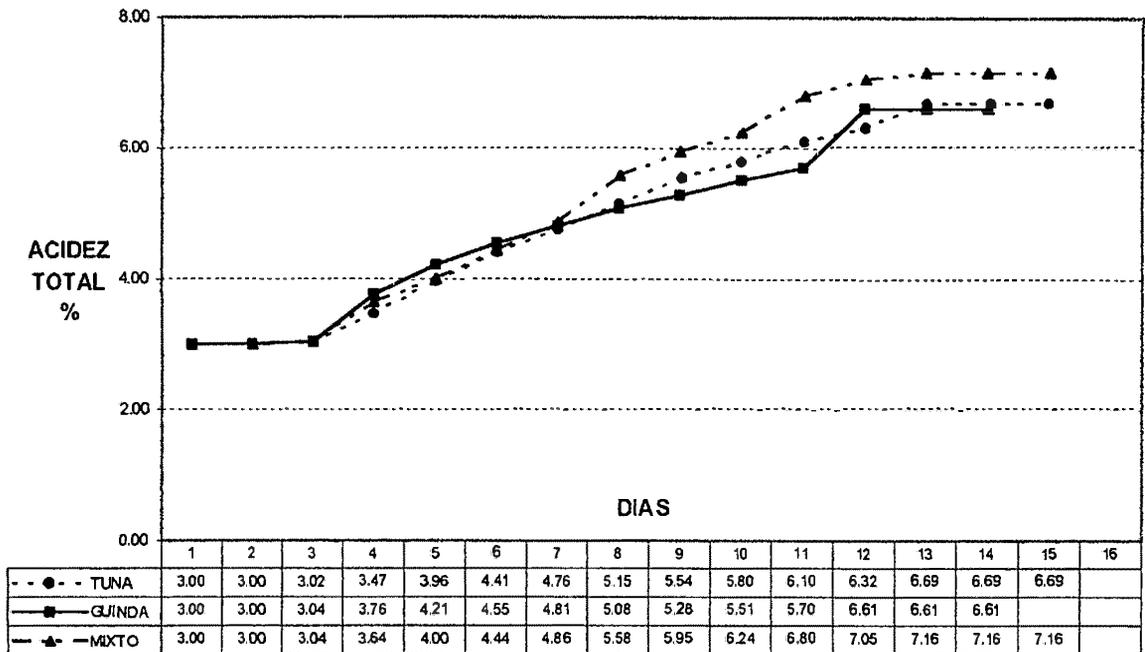


D: 2:1
T°C28°C

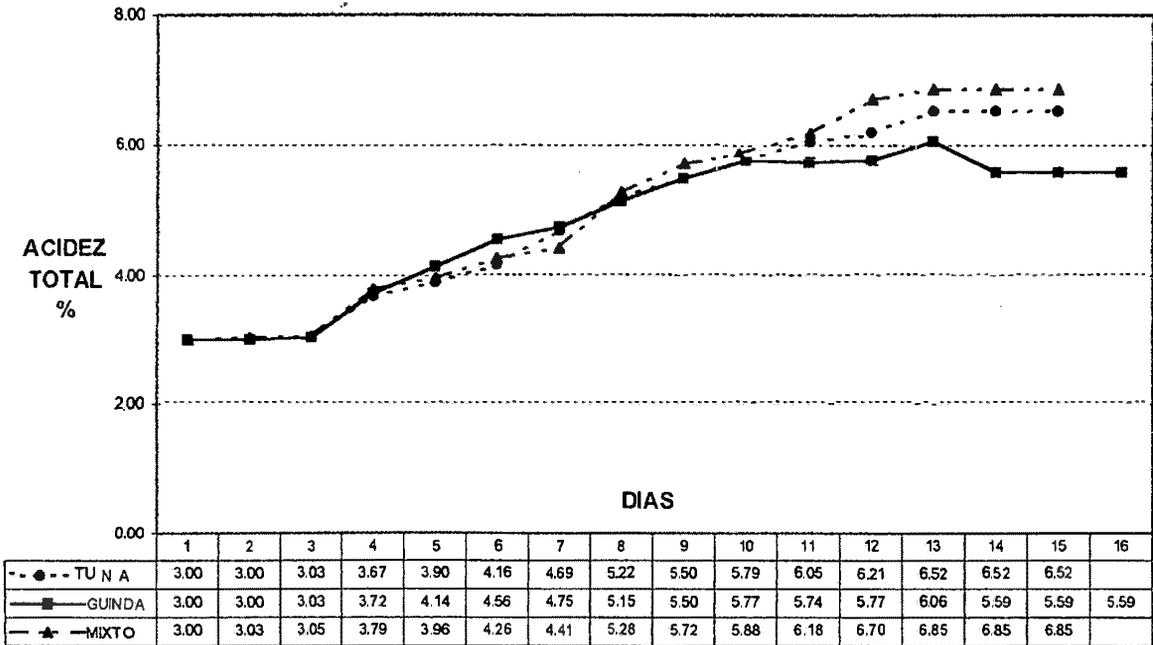
FIGURAN° 12

Gráfica no ajustada de la acidez total (% ácido acético) durante la fermentación acética con Acetobácter ascendens a temperatura experimental (28°C).

ANEXO07



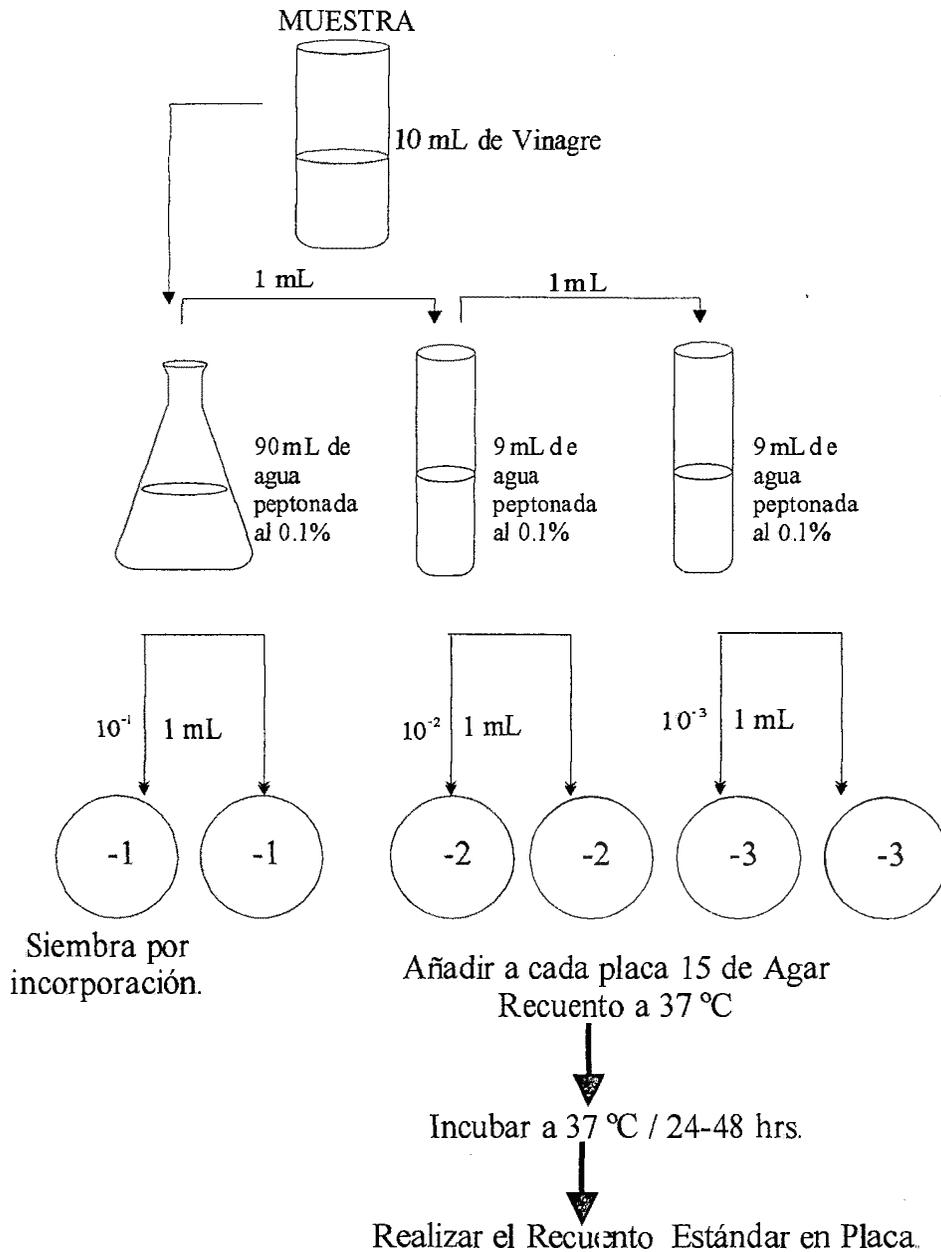
D: 1:1
T°C 21 °C



D: 2:1
T°C 21 °C

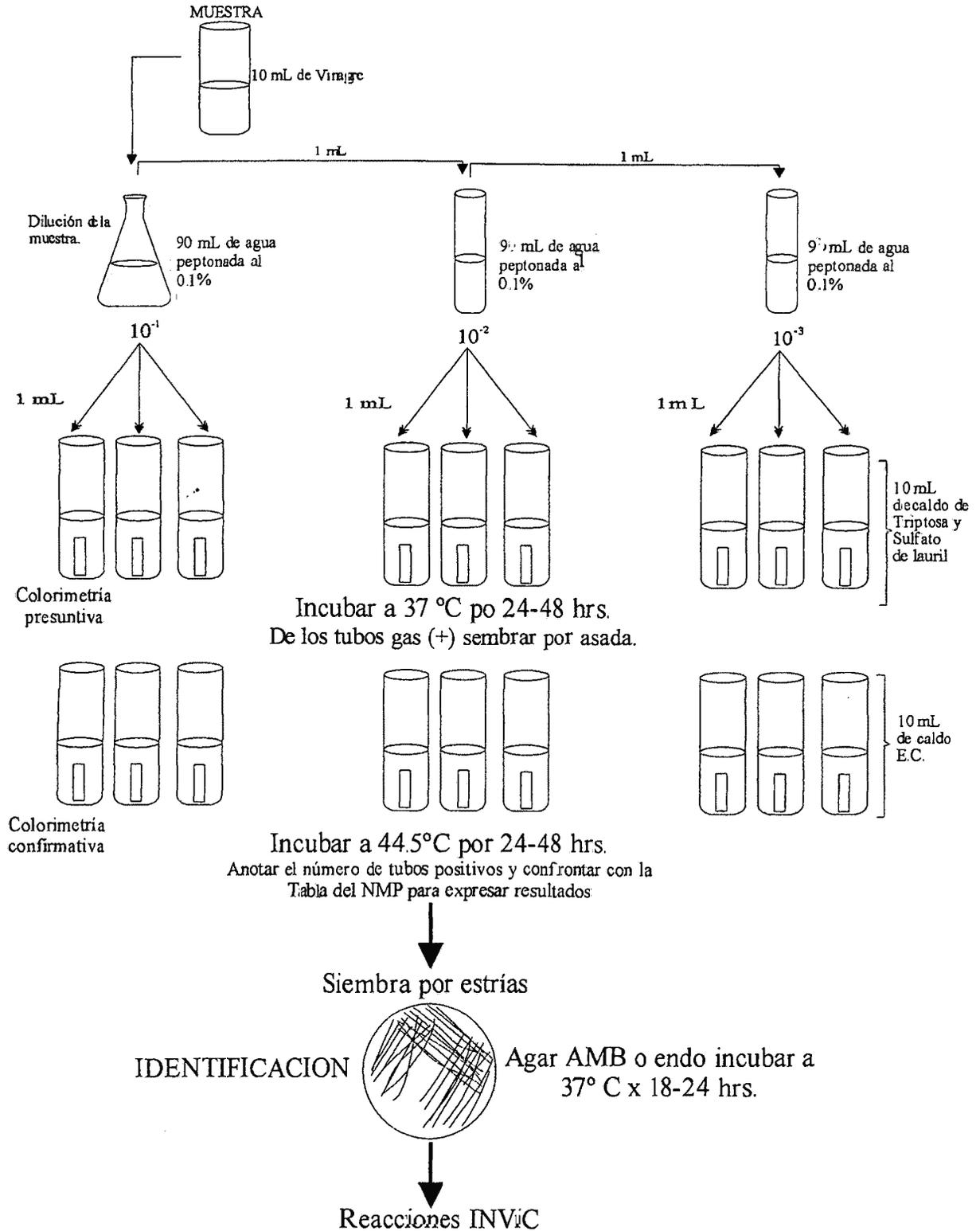
FIGURANº 13

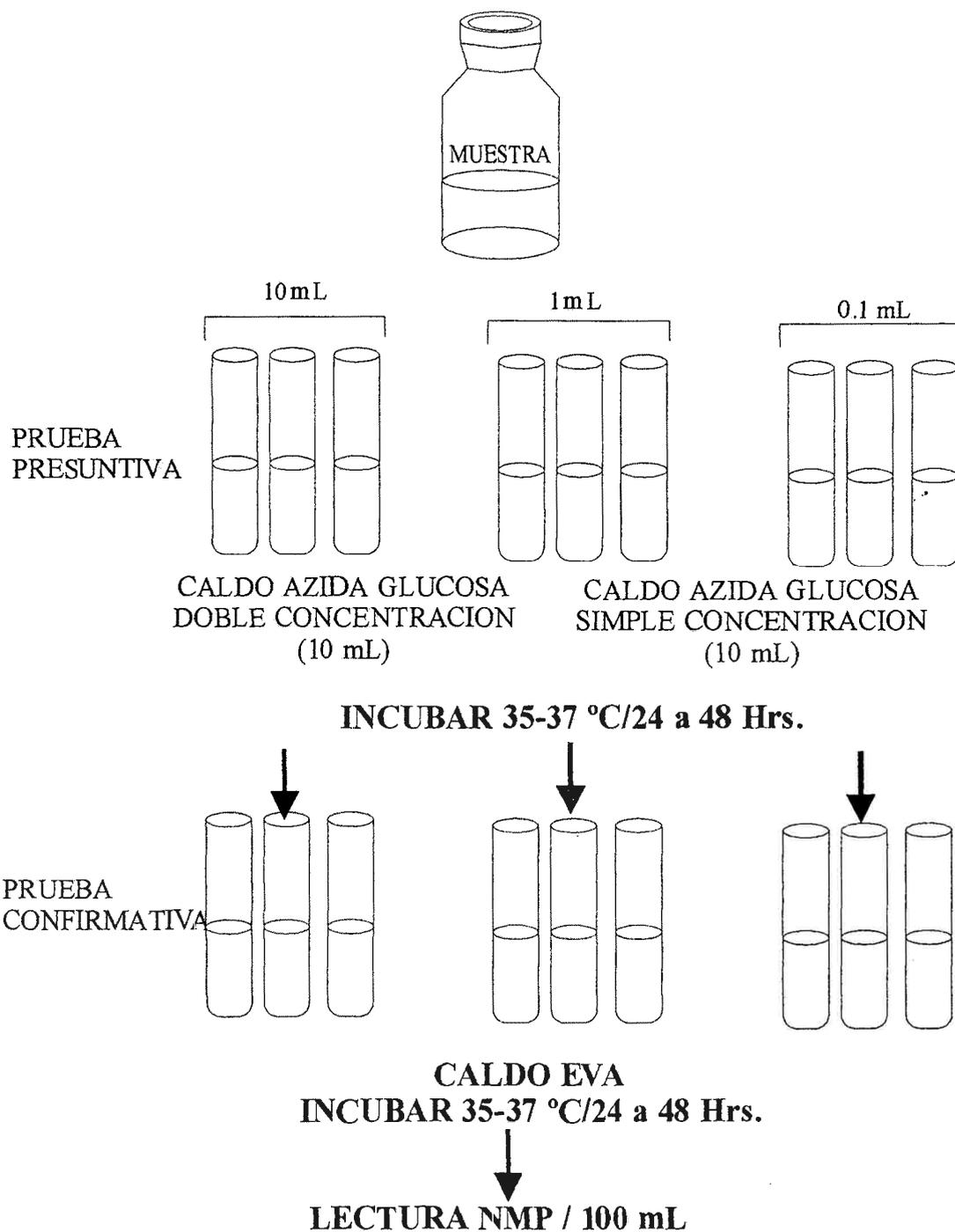
Gráfica no ajustada de la acidez total (% ácido acético) durante la fermentación acética con Acetobácter ascendens a temperatura ambiente (21°C).

ANEXO 08**NUMERACION DE MICROORGANISMOS
AEROBIOS VIABLES**

ANEXO 09

NUMERACION DE BACTERIAS COLIFORMES FECALES



ANEXO 10**NUMERACION DE ENTEROCOCOS
DETERMINACION DEL NUMERO MAS PROBABLE**

ANEXO 11**NUMERACION DE MICROORGANISMOS
AEROBIOS VIABLES**