

T-UES
1506
A 787 P
2001
Ej. 2

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA
INGENIERIA QUIMICA



"Producción de vinagre, por el método de cultivo sumergido utilizando especies nativas de microorganismos acéticos, a partir del agua de coco residual del procesamiento de la copra para la producción de aceite."

PRESENTADO POR:

SANDRA MONICA ARTIGA MORATAYA
ANA SABRINA PEREZ AYALA
OLGA DINORA RENDEROS PACHECO

15100934

PARA OPTAR AL TITULO DE
INGENIERA QUIMICO



4995 15100934

CIUDAD UNIVERSITARIA, FEBRERO DEL 2001

Recibido el 12 de febrero 2001

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR



RECTORA :

DRA. MARIA ISABEL RODRIGUEZ

SECRETARIA GENERAL:

LICDA. LIDIA MARGARITA MUÑOZ VELA

FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA

DECANO :

ING. ALVARO ANTONIO AGUILAR ORANTES

SECRETARIO :

ING. SAUL ALFONSO GRANADOS

ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA

DIRECTORA :

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Eugenia Salvadora Gamero Rodriguez".

ING. EUGENIA SALVADORA GAMERO RODRIGUEZ





UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE INGENIERIA Y ARQUITECTURA
ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA

TRABAJO DE GRADUACION PREVIO A LA OPCION DE:
INGENIERA QUIMICO

TITULO :

"Producción de vinagre, por el método de cultivo sumergido utilizando especies nativas de microorganismos acéticos, a partir del agua de coco residual del procesamiento de la copra para la producción de aceite."

PRESENTADO POR:

SANDRA MONICA ARTIGA MORATAYA
ANA SABRINA PEREZ AYALA
OLGA DINORA RENDEROS PACHECO

TRABAJO DE GRADUACION APROBADO POR:

COORDINADORA :

LICDA. ANA ISABEL PEREIRA DE RUIZ

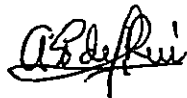
ASESORAS :

ING. TANIA TORRES RIVERA
LICDA. XOCHITL GODOY DE VILLATORO

SAN SALVADOR, FEBRERO DEL 2001

TRABAJO DE GRADUACION APROBADO POR:


COORDINADORA :



LICDA. ANA ISABEL PEREIRA DE RUIZ

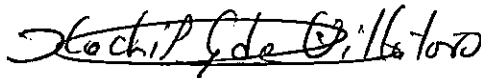


ASESORA :



ING. TANIA TORRES RIVERA

ASESORA :



LICDA. XOCHITL GODOY DE VILLATORO

AGRADECIMIENTOS

Nuestros agradecimientos a:

Ing. Eugenia Salvadora Gamero Rodríguez

M.Sc. Delmy del Carmen Rico Peña

Licda. Ana Isabel Pereira de Ruiz

Licda. Xochitl Godoy de Villatoro

Ing. Tania Torres Rivera

Ing. Ana Cecilia de Flamenco

Ing. Armando Renderos Rosales

Dr. Orlando Silva

Licda. Doris Cardona

Licda. Odette Rauda

Lic. Roberto Enrique Renderos

Personal que labora en GESAL, MAG, e ISTA

Junta directiva de la cooperativa "EL JOBAL"

Sra. Sandra Lorena Recinos

Sr. Juan Rodolfo Mendoza

Sr. Oscar Morán

Fam. Renderos Pacheco

Fam. Artiga Morataya

Fam. Pérez Ayala

Tania Cecilia Madrid Cornejo

Nelly Lisseth Henríquez Flamenco

Óscar Humberto Arias

David Gutiérrez Figueroa

Ing. Numa Pompilio Guevara

Ing. Sandra Parras

Ing. Kathya Cecilia Domínguez

Ing. Mercedes Henríquez

Ing. Javier Bojórquez

Licda. Cindy Emely de Martínez

Licda. Sara Leticia Blanco.

Y a todas las personas que siempre estuvieron pendientes de nuestro trabajo y nos ayudaron con sus gestos de apoyo y confianza en nosotros.

Por su apreciable, invaluable y desinteresada colaboración en la realización y culminación de este trabajo.

DEDICATORIA

*"Maravillosos son tus testimonios;
Por tanto, los ha guardado mi alma"*

Salmo 119.129

Mi dedicatoria se resume a quienes más influencia han tenido en la finalización de éste objetivo.

En primer lugar a La Divina Providencia por permitirme este logro, a María Santísima; a mis padres el Sr. Luis Gilberto Pérez Ayala y la Sra. Judith Ayala de Pérez por su apoyo incondicional, sacrificio y fortaleza que me brindaron.

Al igual que mi tía Sra. Luz Argentina Ayala por su desinteresada ayuda. A los consejos oportunos que me brindaron el Lic. Rubén García Pacheco y la Sra. María Elena de García.

Ana Sabrina

DEDICATORIA

*"Hubiera yo desmayado, si no habría de creer
que vería la bondad del Señor..... en mi vida."*

Salmos 27:13

Señor tengo tanto porque estar agradecida contigo, comenzando por la vida misma que me has brindado, por ser Tú la fuente de mi fortaleza y el que alienta mi corazón para llegar hasta el final.

Señor te agradezco por mis padres y hermanos, porque los creaste con las cualidades que me ayudarían a llegar a ser lo que soy ahora, por todo el amor y comprensión que ellos me han brindado hasta el día de hoy.

Gracias Señor por todas las personas que son mis amigos, y yo se que no es necesario que escriba sus nombre, pues ellos se dan por aludidos, porque por medio de ellos Tú me hiciste sentir tu amor.

Señor gracias por poner siempre las personas idóneas para que recibiéramos la orientación adecuada y por proveer siempre la ayuda oportuna para que este trabajo llegara a su culminación.

Se que hay muchas palabras para expresarte lo magnifico que Tú eres pero una sola palabra puede describir lo que siento en estos momentos en mi corazón, y es "GRACIAS".

Sandra Mónica

DEDICATORIA

*"Señor, ¡qué numerosas son tus obras!
Tú las hiciste sabiamente,
Tus criaturas se ven por todas partes"
Salmos 105:24.*

Dedico este trabajo a Dios que es el resumen del amor y la creación, y que a puesto en los seres que me rodean todo cuanto soy y necesito.

Que puso en mis padres, Mercedes y Mauricio, la gracia de la vida, el amor y la dedicación; en mis hermanos, Roberto, Mauricio y Ernesto, el cariño y la presencia fraternal.

En mis abuelos, Maruca, papá Armando y mamá Oty, el ejemplo de una vida que se fraguó en sabiduría, honestidad, entrega al trabajo y a la familia y con una bondad sin límites.

En Oscar, la presencia cercana y sincera llena de paciencia, que me hace querer ser mejor cada día.

En mis amigos, la alegría, la solidaridad la confianza y el apoyo.

Y en las personas que he encontrado durante mi vida que han logrado dejar algo nuevo por aprender.

Gracias, Señor por todo y por todos.

Olga Dinora.

RESUMEN

El agua de coco es una sustancia rica en carbohidratos y minerales que la hacen de gran utilidad para diversos usos, entre los cuales se encuentran la producción de vinagre, ya que el agua de coco constituye un medio adecuado para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos utilizados en este proceso.

En El Salvador la fabricación de aceite de coco genera múltiples desechos como lo son: el casco, la cascara y el agua de coco.

De los anteriores solamente el agua de coco no esta siendo utilizada por lo que en este trabajo se presenta una alternativa de utilización y consumo popular de fácil manipulación.

Para definir el método a ser utilizado en la fabricación de vinagre se procedió a evaluar las etapas involucradas en este como lo son la fermentación alcohólica y la acetificación.

Primero se tomaron mediciones de las concentraciones de alcohol por medio de un cromatógrafo de gases a lo largo de cinco días para conocer el día en el que se contarían con las condiciones óptimas de concentración de etanol (7% v/v), para la inoculación adecuada del acetobacter; dando como resultado que el segundo día de fermentación era el óptimo.

Para la etapa de acetificación se evaluaron básicamente dos métodos:

- Aireación natural. El cual dio como resultado un 4.84% de ácido acético en un periodo de 16 días.
- Con aireación artificial. Este se dividió en dos métodos:
 - Fermentación alcohólica seguida de acetificación, la cual dio un resultado de 1.44% v/v de ácido acético en un periodo de 14 días.

- Acondicionamiento del sustrato adicionando 7% v/v de etanol y continuando con la acetificación. El resultado obtenido de este método fue 1.19 % v/v de ácido acético en un periodo de 10 días.

En base a los resultados anteriores se optó por el método con aireación natural, ya que el porcentaje de ácido acético obtenido fue mayor y de acuerdo con las variables que afectaban el proceso de acetificación se decidió comprobar si el tipo de madre y la adición de vinagre iniciador era determinante en la producción de ácido acético.

Estadísticamente se comprobó que las variables anteriores (tipo de madre y cantidad de vinagre iniciador agregado) afectan el proceso de producción de ácido acético, aunque es necesario realizar más estudios para determinar en qué volumen de vinagre iniciador resulta más adecuado en la producción de vinagre de agua de coco.

INDICE

<u>CONTENIDO</u>	<u>Pág.</u>
INTRODUCCIÓN.....	1
I. EL COCOTERO	3
I.1 ORIGEN Y DISPERSIÓN	3
I.1.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL COCOTERO.....	4
I.1.2 CONDICIONES DE CULTIVO	5
I.2 MORFOLOGÍA DEL COCOTERO	6
I.2.1 CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO DEL COCOTERO	8
I.3 UTILIZACIÓN DE LAS DIVERSAS PARTES DEL COCOTERO	12
I.3.1 UTILIZACIÓN Y COMPOSICIÓN DEL AGUA DE COCO	13
I.4 DISTRIBUCIÓN ACTUAL DEL COCOTERO EN EL MUNDO	19
I.5 DISTRIBUCIÓN ACTUAL DE LAS PLANTACIONES DE COCOTERO EN EL SALVADOR	20
I.6 SITUACIÓN ACTUAL DE LA INDUSTRIA DE ACEITE DE COCO EN EL SALVADOR	24
II. PROCESOS PARA LA OBTENCIÓN DE VINAGRE	33
II.1 EL PROCESO DE FERMENTACIÓN	33
II.2 MECANISMO DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	34
II.3 MICROORGANISMOS DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	35
II.3.1 FISIOLOGÍA DE LA LEVADURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
II.3.2 ENZIMAS DE LEVADURA	38

<u>CONTENIDO</u>	<u>Pág.</u>
II.3.3 COZIMAZA	39
II.3.4 FACTORES QUE AFECTAN LA ACCIÓN ENZIMÁTICA	40
II.4 ACETIFICACIÓN	41
II.4.1 BACTERIAS ACETIFICANTES	42
III. GENERALIDADES SOBRE EL VINAGRE	47
III.1 HISTORIA	47
III.2 SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE VINAGRE	50
III.2.1 MÉTODOS DE CULTIVO SUPERFICIAL	50
III.2.2 MÉTODO CONTINUO O DE FERMENTACIÓN SUMERGIDA	52
III.3 FACTORES ESENCIALES DE COMPOSICIÓN Y CALIDAD DEL VINAGRÉ	53
III.3.1 MATERIAS PRIMAS	53
III.3.2 INGREDIENTES FACULTATIVOS	54
III.3.3 CONTENIDO TOTAL DE ÁCIDO	54
III.3.4 CONTENIDO DE ALCOHOL RESIDUAL	54
III.4 PREPARACIÓN PARA EL MERCADO	55
III.4.1 CLARIFICACIÓN.....	55
III.4.2 FILTRACIÓN	56
III.4.3 ENVEJECIMIENTO	57
III.4.4 PRÁCTICAS PERMITIDAS EN LA FABRICACIÓN DE VINAGRE	57

<u>CONTENIDO</u>	<u>Pág.</u>
IV. ETAPA EXPERIMENTAL PARA LA PRODUCCIÓN DE VINAGRE	
A PARTIR DE AGUA DE COCO.....	58
IV.1 ETAPA DE PRODUCCIÓN ALCOHÓLICA	58
IV.1.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	59
IV.1.2 MEDICIÓN DEL PORCENTAJE DE ALCOHOL EN LAS MUESTRAS	60
IV.1.3 RESULTADOS DE LA ETAPA DE PRODUCCIÓN ALCOHÓLICA	61
IV2. DETERMINACIÓN DEL MÉTODO A UTILIZAR PARA LA ACETIFICACIÓN	63
V. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ACÉTICAS	68
V.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS EN MEDIO SÓLIDO	68
V.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS EN MEDIO LÍQUIDO	68
V.3 OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS	68
V.4 PRUEBAS DE MOVILIDAD	69
V.5 PRUEBAS BIOQUÍMICAS	69
V.5.1 PRUEBAS DE CATALASA	69
V.5.2 COLORACIÓN CON YODO	70
V.5.3 OXIDACIÓN DEL ALCOHOL ETÍLICO	70
V.5.4 SOBREOXIDACIÓN DEL ÁCIDO ACÉTICO	70
V.5.5 REACCIÓN DE LA CELULOSA	70

<u>CONTENIDO</u>	<u>Pág.</u>
V.6 PRUEBAS DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN	
DEL GÉNERO	71
V.7 AISLAMIENTO DE LA BACTERIA ACÉTICA	71
V.7.1 OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LOS CULTIVOS	72
V.7.2 COLORACIÓN POR YODO	72
V.7.3 PRUEBA DE MOVILIDAD	73
V.7.4 OXIDACIÓN DEL ALCOHOL ETÍLICO	73
 VI. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE ELABORACIÓN	
DE VINAGRE.....	80
VI.1 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	86
VI.1.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	86
 VII. PROPUESTA DE PROCESO DE PRODUCCIÓN DE VINAGRE	
A NIVEL DE PLANTA PILOTO O ARTESANAL A PARTIR	
DE AGUA DE COCO RESIDUAL DEL PROCESAMIENTO DE	
LA COPRA	89
VII.1 ETAPAS A SEGUIR EN LA PRODUCCIÓN DE VINAGRE A	
PARTIR DE AGUA DE COCO RESIDUAL	
DEL PROCESAMIENTO DE LA COPRA PARA	
LA PRODUCCIÓN DE ACEITE.....	92

<u>CONTENIDO</u>	<u>Pág.</u>
VIII. OBSERVACIONES	96
IX. CONCLUSIONES	98
X. RECOMENDACIONES	99
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
ANEXOS	104
ANEXO A: ESTABLECIMIENTO DE PLANTACIONES DE COCOTERO	105
ANEXO B: ANÁLISIS DE CALIDAD PARA VINAGRES.....	112
ANEXO C: VALOR NUTRITIVO DEL DULCE DE PANELA	115
ANEXO D: ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO EN MUESTRAS DE AGUA COCO	117
ANEXO E: GRÁFICO DE REGRESIÓN PARA LOS DATOS OBTENIDOS EN LA ETAPA DE PRODUCCIÓN ALCOHÓLICA	150

<u>CONTENIDO</u>	<u>Pág.</u>
ANEXO F: GRÁFICOS DE REGRESIÓN PARA LOS DATOS OBTENIDOS EN LA ETAPA EXPERIMENTAL DE ACETIFICACIÓN	152
ANEXO G: GRÁFICOS DE REGRESIÓN PARA LOS DATOS OBTENIDOS EN LA ETAPA DE OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO	156
ANEXO H: COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO	161
ANEXO I: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO ACÉTICO EN MUESTRAS DE VINAGRE	163
ANEXO J: MÉTODO ESTADÍSTICO APLICADO PARA EL ANÁLISIS DE LOS DATOS EXPERIMENTALES: EXPERIMENTOS FACTORIALES 2^k	165
ANEXO K: GUÍA ARTESANAL DE ELABORACIÓN DE VINAGRE DE AGUA DE COCO	171
ANEXO L: EXPORTACIONES E IMPORTACIONES DE VINAGRE COMESTIBLE Y SUCEDÁNEOS COMESTIBLES DEL VINAGRE OBTENIDOS CON ÁCIDO ACÉTICO PARA EL PERÍODO DE 1996 A 1999	184

INDICE DE CUADROS

<u>CONTENIDO</u>	<u>Pág.</u>
Cuadro 1.1. Principales datos analíticos de varios productos del coco.....	11
Cuadro 1.2. Pesos relativos de los diferentes componentes del fruto del cocotero	11
Cuadro 1.3. Diversos componentes del agua deCoco.....	13
Cuadro 1.4. Análisis del agua de cocos maduros.....	16
Cuadro 1.5. Análisis cuantitativo de carbohidratos en el agua de cocos maduros (República Dominicana y Malasia).....	17
Cuadro 1.6. Aminoácidos de agua de cocos maduros (República Dominicana).....	18
Cuadro 1.7. Elementos traza encontrados en el agua de coco.....	18
Cuadro 1.8. Cuadro comparativo de la composición de la copra seca y fresca.....	28
Cuadro 1.9. Cuadro de proporciones de ácidos grasos en la composición del aceite de coco.....	30
Cuadro 1.10. Composición aproximada de la torta de harina de coco.....	31
Cuadro 2.1a. Características de cada especie acética.....	44
Cuadro 2.1b. Características de cada especie acética.....	44
Cuadro 2.2. Características de desarrollo de las bacterias acética.....	45
Cuadro 2.3. Características de diferenciación Gluconobacter y Acetobacter.....	46
Cuadro 4.1. Resultados del monitoreo de la producción alcohólica en muestras de agua de coco acondicionadas.....	61

<u>CONTENIDO</u>	<u>Pág.</u>
Cuadro 4.2. Resultados de las pruebas para determinación del método de producción acética en muestras de agua de coco.....	64
Cuadro 5.1. Observaciones de las colonias obtenidas de muestras de agua de coco después de 24 hrs. de incubación a 25°C.....	72
Cuadro 5.2. Diferenciación de bacterias ácido acéticas.....	73
Cuadro 5.3. Resultados de pruebas hechas a bacterias encontradas en muestras de agua de coco	74
Cuadro 5.4. Resultados de las observaciones microbiológicas en muestras de agua de coco monitoradas durante 5 días.....	79
Cuadro 6.1. Resultados de análisis de acidez hechos a muestras de agua de coco realizados para comprobar el efecto de variables de iniciación (cantidad de vinagre iniciador madurez de la madre agregada) en la etapa de acetificación	85
Cuadro 6.2. Resultados del análisis estadístico aplicado a los datos de concentración de ácido acético obtenidos a partir de la combinación de dos factores de iniciación de la etapa de acetificación	87
Cuadro 7.1. Nomenclatura del diseño de planta para la elaboración de vinagre a partir de agua de coco procedente de la fabricación de aceite.....	91

INDICE DE FIGURAS

<u>CONTENIDO</u>	<u>Pág.</u>
Figura 1.1. Variedades de palmas de coco.	4
Figura 1.2. Diferentes partes de la planta del cocotero.....	8
Figura 1.3. Fruto del cocotero	10
Figura 1.4. Principales zonas del cultivo del cocotero en el mundo.....	19
Figura 1.5. Mapa de uso actual del suelo en El Salvador.....	22
Figura 1.6. Ubicación de las plantaciones de coco dedicadas a la producción de aceite.....	23
Figura 1.7. Costa de la isla Espíritu Santo, en la Bahía de Jiquilisco. Departamento de Usulután	24
Figura 1.8. Esquema de producción de aceite coco.....	25
Figura 1.9. Vista de uno de los patios donde se depositan los coco en la Cooperativa "El Jobal" de la isla Espíritu Santo en la Bahía de Jiquilisco. Usulután	26
Figura 1.10. Obreras extrayendo copra en la Cooperativa "El Jobal" de la isla Espíritu Santo en la Bahía de Jiquilisco. Usulután.....	27
Figura 1.11. Prensa hidráulica utilizada en la extracción de aceite de coco. Cooperativa "El Jobal" de la isla Espíritu Santo en la Bahía de Jiquilisco. Usulután.....	29
Figura 1.12. Patio utilizado para partir los cocos en el proceso de extracción de aceite.....	31
Figura 2.1. Fotografía de una levadura del genero Saccharomyces en plena Fisión binaria.....	36

<u>CONTENIDO</u>	<u>Pág.</u>
Figura 2.2. Influencia de la temperatura (a) y el pH (b) en la velocidad de reacción enzimática	40
Figura 4.1. Gráfico de resultados promedio obtenidos por método durante la fermentación alcohólica	62
Figura 4.2. Comportamiento de la producción de ácido acético Promedio en muestras de agua de coco por los Métodos 1, 2 y 3.	65
Figura 4.3. Recipientes donde se produce vinagre aplicando una aireación natural en la etapa de acetificación.....	66
Figura 4.4. Montaje utilizado para aplicar aireación artificial en la etapa de Acetificación.....	67
Figura 5.1. Fotografía de tinción Gram realizada a la muestra de agua de coco luego de tres días de haber sido expuesta al ambiente.....	75
Figura 5.2. Fotografía de tinción Gram realizada a la muestra de agua de coco luego de dos meses de haber sido expuesta al ambiente.....	75
Figura 5.3. Fotografía de tinción Gram realizada a la muestra de agua de coco luego de un día de haber sido expuesta al ambiente.....	76
Figura 5.4. Fotografía de tinción Gram de un cultivo hecho a la muestra de agua de coco luego de dos días de haber sido expuesta al ambiente.....	77

<u>CONTENIDO</u>	<u>Pág.</u>
Figura 5.5. Fotografía de tinción Gram realizada a la muestra de agua de coco luego de tres días de haber sido expuesta al ambiente.....	77
Figura 5.6. Fotografía de tinción Gram a muestra de agua de coco luego de cuatro días de haber sido expuesta al ambiente.....	78
Figura 5.7. Fotografía de tinción Gram hecha a muestra de agua de coco luego de cinco días de haber sido expuesta al ambiente.....	78
Figura 6.1. Variación de la concentración de ácido acético para el método 1 con respecto al tiempo.....	83
Figura 6.2. Variación de la concentración de ácido acético para el método 2 con respecto al tiempo.....	83
Figura 6.3. Variación de la concentración de ácido acético para el método 3 con respecto al tiempo.....	84
Figura 6.4. Variación de la concentración de ácido acético para el método 4 con respecto al tiempo.....	84
Figura 6.5. Comparación de los promedios de la concentración de ácido acético en los días 13 y 14 para los diferentes métodos utilizados	88
Figura 7.1. Flujograma de producción de vinagre a partir de agua de coco.....	89
Figura 7.2. Diseño de planta para la producción de vinagre a partir de agua de coco.....	90

INTRODUCCION

El cocotero es un árbol con múltiples beneficios, que se encuentra ampliamente esparcido por todo el trópico terráqueo y es fuente de una gran variedad de productos que van desde artesanías, alimentos, bebidas, hasta carbón activado, siendo un signo de las zonas tropicales.

El árbol junto a su fruto es explotado en Malasia, La India, Singapur, Costa Rica y otros países que han sabido desarrollar las técnicas de cultivo y explotación necesarias para obtener todas las riquezas que éste proporciona.

En El Salvador el cocotero es cultivo de pequeños propietarios, y se utiliza como planta ornamental en casas y jardines, o para extraer su agua y beberla; su explotación se ha venido reduciendo con las necesidades de tierra debidas a la densidad demográfica, la tendencia de la población a dar término a las asociaciones entre propietarios para formar Cooperativas y al poco interés que se le está dando a la agricultura en el país. Sin embargo todavía existen algunos lugares en la costa salvadoreña donde se explota el coco para otros fines que van más allá de los ornamentales, y se emplea este fruto para producir aceite y coco desecado. Estos lugares tuvieron su apogeo en la época de los años 80 y ahora la tendencia de los lugareños es buscar otros cultivos o formas de vida más rentables.

La industria del aceite de coco es una industria generadora de residuos que son de utilidad para los habitantes de las zonas donde se lleva a cabo el proceso de extracción. Para todos los residuos se ha logrado encontrar utilidad, a excepción del agua de coco, que está siendo lanzada al suelo y se acumula siendo criadero de insectos y una fuente de ácido acético capaz de acidificarlo, volviéndolo poco o nada útil para los cultivos. El agua de coco no es una fuente de contaminación a gran escala, ni mucho menos un residuo tóxico, pero sí es una fuente de minerales que la hacen apta para el desarrollo de microorganismos.

Como se ha planteado en trabajos similares a este, el agua de coco puede ser utilizada para el desarrollo y crecimiento de microorganismos que son fuente de masa proteica que ya es fuente alimenticia en países desarrollados, además tiene una aplicación limitada en la

inseminación artificial de ganado vacuno y porcino, estas dos opciones no son útiles para las personas que habitan las zonas donde se está generando el desperdicio.

Por otra parte el agua de coco es una bebida de gran demanda en los países tropicales, pues sirve como bebida refrescante y típica de los mismos, pero a medida que el coco va madurando el agua va cambiando de composición, con lo que cambian sus propiedades organolépticas. En la extracción de aceite los cocos a utilizar son cocos con alto grado de madurez, lo que posiblemente sea una de las causas por las que el agua es depositada en el suelo sin buscarle otras utilidades, aunque la principal causa de su desperdicio es el método de utilizado para partir los cocos, que no permite una recolección adecuada de la misma.

El propósito de este trabajo es proponer una solución factible, apegada al desarrollo económico y tecnológico de El Salvador y de los habitantes de las zonas donde se está generando este residuo, que como se podrá observar más adelante tiene múltiples factores que lo hacen propicio para el desarrollo de microorganismos, entre los que se encuentran los que son generadores de alcohol y posteriormente ácido acético.

Por otro lado debemos recordar que El Salvador, como el resto del mundo, está siendo influenciado por la necesidad de reducir los residuos de varias agroindustrias, que a la larga se vuelven en contaminantes para el ambiente, pues los productos fabricados bajo las prácticas de "Tecnologías más limpias" son preferidos por los países importadores de materias primas y productos que aquí, como en el resto de países en desarrollo son producidas.

I EL COCOTERO.

En primer lugar es necesario plantear los orígenes y usos de fruto, así como la composición de las diversas partes del mismo, ya que todos estos datos sirven de base para establecer la propuesta que aquí se plantea.

El cocotero es una planta distribuida en las zonas tropicales, su origen es tema de discusiones pues existen varias teorías al respecto aunque lo realmente importante de esta planta no es tanto su origen sino la riqueza de utilidades que nos presenta.

Hoy en día no hay ningún lugar en la tierra en el auténtico trópico geográficamente comprendido entre los 22 grados de latitud al norte y al sur de la línea ecuatorial, donde no haya arraigado una semilla de *Cocos nucifera*.

I.1 ORIGEN Y DISPERSION

Pocas plantas están más ampliamente distribuidas en la naturaleza que el cocotero, el cual, cuando las condiciones son favorables, se encuentra por todos los trópicos. Debido a esta amplia distribución, el hábitat original del cocotero viene siendo desde hace muchos años un tema de controversias.

Existen varias corrientes de opinión respecto al origen y dispersión subsiguiente al coco. La primera supone que tuvo origen en América, con dispersión posterior a Polinesia y Asia. Así Guppy (1906) sugiere que el coco tiene su origen en la costa del Pacífico de la América Tropical, mientras que Cook (1910) cree que se originó entre las palmas cocoides de los valles andinos de Colombia, con dispersión subsiguiente por obra de pueblos primitivos a las islas del Océano Pacífico y el Indico.

Una segunda posibilidad es una emigración hacia el sur por la Antártida, posibilidad apoyada por el descubrimiento de pequeñas nueces fósiles, en forma de pequeños cocos, en los lechos del Terciario tardío (Mioceno-pliocena) en la North Island de Nueva Zelanda (Corner, 1966). Así, pues, la migración del antepasado del coco puede haberse efectuado

pasando por la Antártida cuando dicho continente tenía un clima mucho más cálido y estaba comunicado con otras masas de tierra en el Hemisferio Sur (Purseglobe, 1968).

Existe una tercera corriente que asegura que no se han podido encontrar formas primitivas de palmeras de coco que permitan determinar con certeza su crecimiento en estado espontáneo o silvestre y afirma que el cocotero es originario de la Polinesia.

1.1.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL COCOTERO

El cocotero se clasifica botánicamente como:

Clase : *angiospermeae*
Subclase: *monocotiledoneae*
Orden : *palmares*
Familia: *palmaceae*
Género: *cocus*
Especie: *C-nucifera L.*



Figura 1.1. Variedades de palmas de coco.

Existen básicamente dos variedades de palma de coco, que se distinguen por su tamaño, principalmente; aunque la calidad del fruto y la forma de reproducción son diferentes de una variedad a otra.

Una de las variedades es la de porte alto, que mide de 20 a 25 metros de altura, el representado por número 1 en la figura 1.1, y presentan una fertilización cruzada, la calidad del fruto es de mejor calidad, se muestra en la figura 1.1 con el número 3, aunque es fácilmente atacado por "el amarillamiento letal", que es una enfermedad que acaba rápidamente con las plantaciones.

La otra variedad es la enana, que presenta un porte pequeño y cuya altura máxima es de 12 metros, número 2 en la figura 1.1, sus hojas son relativamente cortas y la calidad, forma y color del fruto es diferente que el de las variedades altas, representado por 4 en la figura 1.1. Y contrario a la otra variedad es más resistente a la enfermedad del "amarillamiento letal", que hasta el momento no ha encontrado cura una vez ha atacado a las plantaciones de coco.

I.1.2 CONDICIONES DEL CULTIVO

El Salvador reúne las condiciones necesarias para su desarrollo, aunque, como todo cultivo que luego será utilizado con fines industriales requiere condiciones especiales para un óptimo crecimiento y aprovechamiento al máximo de su cosecha.

I.1.2.1 CLIMA Y SUELO

Las exigencias de temperatura del cocotero son de 22°C mínima de temperatura media al año y 27°C temperatura máxima media.

Otras condiciones de clima son: de 1500 a 2500 mm de lluvia y que no haya más de tres meses de sequía en el año; humedad relativa de 70 a 80%, 2000 horas de luz solar por año, con un promedio mensual no menor de 120 horas de luz solar.

Los vientos asociados a la radiación solar aumentan la evapotranspiración y asimilación de nutrientes por planta.

El cocotero tiene preferencia por suelos ligeramente arenosos o arcillosos, profundos y permeables, con buena aireación en donde el sistema radical pueda arraigarse y desarrollar bien sus raíces fibrosas. Los suelos arenosos, cuyo contenido arcilloso no es alto, como en las principales zonas de cultivo son bastante apropiadas. Sin embargo, estos suelos en su mayoría son pobres en nutrientes. Es importante que el suelo posea buen grado de percolación y abundante cuantía de potasio.

El cocotero en general es muy tolerante a los diferentes valores de acidez del suelo, su cultivo se puede desarrollar tanto en suelos fuertemente alcalinos como en aquellos ácidos (pH de 5) y prospera a un pH de 7.5. Además responde a la fertilización mineral y orgánica, (CENTA, 1980).

En el anexo A se plantean aspectos relativos al establecimiento de nuevas plantaciones.

1.2 MORFOLOGÍA DEL COCOTERO.

El cocotero tiene la morfología típica de las monocotiledóneas, con tronco de igual diámetro en casi toda su longitud, terminando en una corona de hojas que se origina en una yema terminal. Ver en la figura 1.2 las diferentes partes de la planta.

- 1). Raíces: se originan en gran número de la base del tronco, las raíces adventicias son de 5 a 6 m de longitud y se ramifican en raíces secundarias, terciarias y cuaternarias.
- 2). Tronco. Casi liso, de color grisáceo, con nudos y ligeramente ensanchado en la base.
- 3). Hojas. Originarias de la yema terminal del tronco formando una corona de hasta 30 hojas.
- 4). Inflorescencia. Produce flores masculinas y femeninas.
- 5). Espata. Encierra la inflorescencia antes de la floración.

- 6). Espádice. Está conformada por un eje central, del cual parten varias ramas laterales con las flores.
- 7). Flor femenina. Se origina en una base de las ramas de la espádice, es globosa, el ovario posee tres óvulos de los cuales sólo uno es fértil.
- 8). Flor masculina. Se forma encima de las femeninas. Cada flor femenina está acompañada generalmente por dos pequeñas flores masculinas fértiles.
- 9). Racimo de frutos. Después de la fecundación, la inflorescencia se convierte en un racimo de frutos, sobre el cual persiste la espata floral.
- 10). Fruto. La flor femenina fecundada se transforma en un enorme fruto que contiene una sola semilla. (Sánchez Potes, 1987)

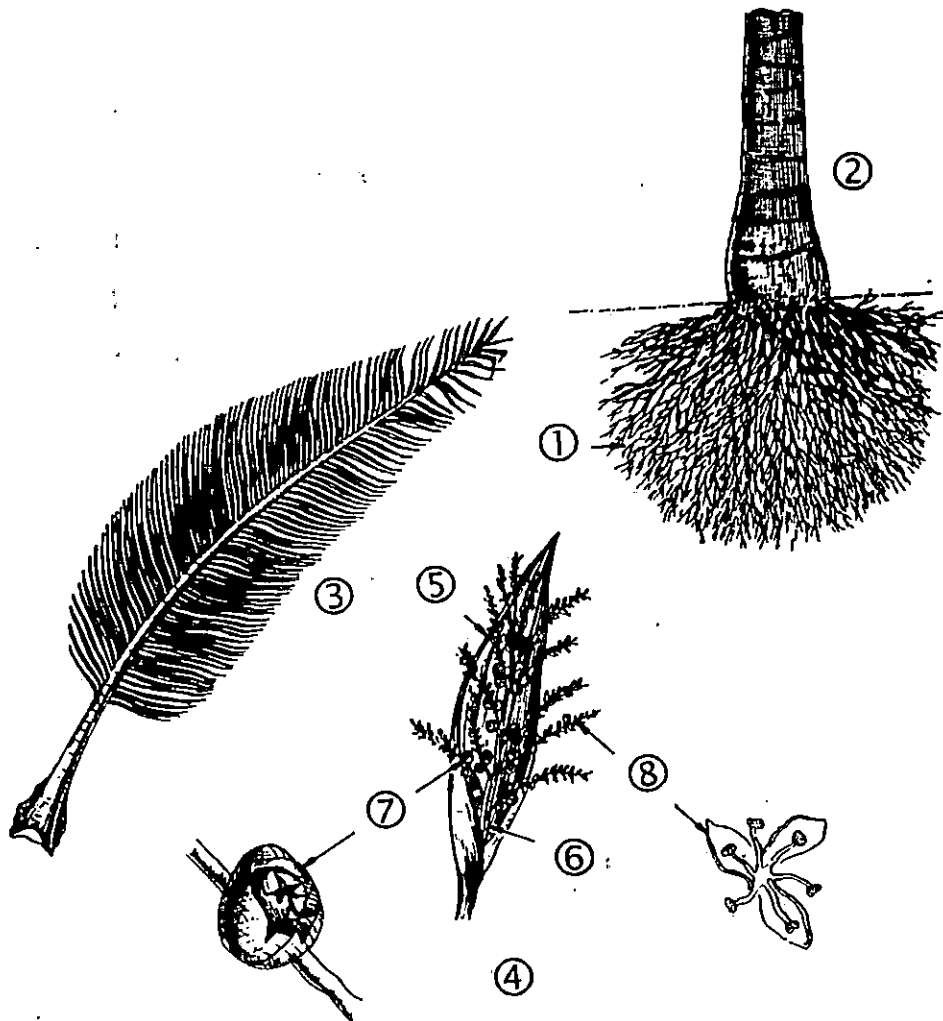


Figura 1.2. Diferentes partes de la planta del cocotero.
(Sánchez Potes, 1987).

1.2.1 CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO DEL COCOTERO

Transcurre cerca de un año entre la diferenciación de las flores femeninas y las aberturas de la espata y un año entre ésta y la maduración de los frutos. Un corte transversal muestra de afuera hacia adentro, las siguientes partes:

- 1). Una epidermis lisa, c erea, de color variable.
- 2). Un mesocarpio fibroso, de color marrón claro, grueso.
- 3). Un endocarpio lignificado, muy duro, de color oscuro, con tres aristas longitudinales y tres poros germinativos.

La semilla está conformada por:

- 4). Un albumen blanquecino, brillante, de 1 a 2 cm de espesor, con alto contenido de aceite, rodeado de un tegumento seminal delgado.
- 5). Un liquido opalescente o agua de coco, que lleva tres cuartas partes de la cavidad central.
- 6). Un embrión localizado en el albumen, debajo de uno de los poros germinativos. (Sánchez Potes, 1987).

Las diferentes partes del fruto se pueden observar en la figura 1.3.

El fruto en drupa voluminosa de mesocarpio fibroso, nuez huesosa con tres agujeros en la base; albumen cartilaginoso, blanco, comestible, embrión situado cerca de uno de los agujeros de la nuez. (Guzmán, 1976).

El cocotero se desarrolla a partir de una sola semilla en la fibrosa. El ovario es tricarpelado, del que suele desarrollarse solamente una sección. El fruto es más o menos ovoide, dependiendo su forma exacta de la variedad, que también condiciona su tamaño, frecuentemente mayor que una cabeza de hombre.

Por debajo de la piel exterior lisa, o exocarpio, hay una cubierta fibrosa, o mesocarpio, formando ambos la cáscara, cuyo espesor (a menudo de más de 5 cm) depende de la variedad. Por debajo de ésta, cubierta por un casco muy duro, o endocarpio, está la nuez misma.

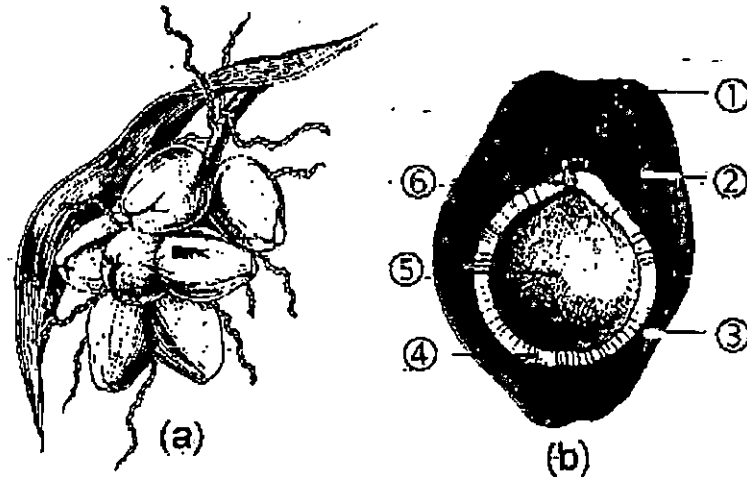


Figura 1.3. Fruto del cocotero: (a) Racimo de frutos, (b) diferentes partes del fruto.
(Sánchez Potes, 1987).

El casco tiene tres bordes aproximadamente longitudinales y tres depresiones bien definidas en la base, que corresponden a la división de los tres carpelos originales en la flor, que se conocen con el nombre de poros germinativos. Normalmente, dos de estos poros u "ojos" son menores y bastante duros, mientras que el tercero es un "ojo" blando. Inmediatamente debajo del ojo blando está situado el germen o embrión, y, cuando la nuez germina la plántula se abre paso por aquí .

La "carne" o endospermo del casco es delgada, y, cuando es joven, parece jalea, pero se hace más gruesa a medida que la nuez va madurando hasta llegar a 1 cm o más. En la primera fase (4 a 5 meses), cuando la nuez está creciendo se desarrolla la cáscara y el casco, y en la totalidad del interior está llena de agua de coco. En la segunda fase (que dura de 6 a 8 meses), la cáscara y el casco se endurecen y engrosan. En la tercera fase, el endospermo se desarrolla y madura.

La copra está totalmente formada a los 300 días y, a los 12 meses, el casco está completamente endurecido y la nuez madura. El casco, que se forma al mismo tiempo que el embrión, en su período inicial blando y blanco, se endurece y oscurece a los 7-8 meses; el cambio de color empieza por la parte superior, y posteriormente alcanza la base cerca de

los poros germinales poco antes de 7-9 meses, siendo el peso medio de 3 a 4 Kg.
La composición del fruto húmedo se describe en el cuadro 1.1.

Estas cifras son bastante uniformes para nueces maduras de varios tamaños de la misma variedad, y, por tanto pueden utilizarse como medida para determinar el rendimiento de copra, procediendo simplemente a pesar las nueces.

Cuadro 1.1. Principales datos analíticos de varios productos del coco.

Producto	Humedad	Grasa	Proteína	Carbohidratos	Minerales	Fibra
Porcentaje						
Agua de coco.	93	1	1	5	1	-
Pulpa blanda verde.	93	1	1	3	1	-
Pulpa firme verde.	82	2-3	1	2-3	1	-
Leche de coco.	52	27	4	16-18	1	1

(Grimwood, 1977)

Los pesos relativos de los diferentes componentes son variables, pero los promedios suelen ser los que se presentan en el cuadro 1.2.

Cuadro 1.2. Pesos relativos de los diferentes componentes del fruto del cocotero.

Parte del fruto	Porcentaje aproximado
Cáscara	35 %
Casco	12 %
Copra	25 %
Agua	25 %

(Grimwood, 1977)

1.3 UTILIZACIÓN DE LAS DIVERSAS PARTES DEL COCOTERO

El cocotero es un árbol con una gran diversidad de usos, a continuación se mencionan algunos.

- TRONCO: Para la construcción de casas, puentes, establos para el ganado y acueductos. La madera vieja y madurado de la parte interior del tronco suministra material muy útil y la costumbre de remojarla en agua salada durante un mes mejora la calidad.
- HOJAS: Incineradas rinden mucha potasa empleadas en la jabonería.
- FLORES: Por medio de una sencilla manipulación, genera azúcar y cortando la punta del espádice, exuda un licor azucarado muy agradable y refrescante, y después alcohólico, muy fuerte y embriagador.
- SAVIA: Se utiliza para la fabricación Toddy (o tuba), bebida obtenida por fermentación natural. También puede convertirse en otros productos, tales como alcohol, azúcar, melaza, jaggery y vinagre.
- PERICARPIO: Sirve para fabricar cepillos, escobas y otros utensilios para limpiar muebles y entablados; así como para la fabricación de sacos.
- CASCO O ENDOCARPIO: Este se consume principalmente como combustible in situ, pero una parte se transforma en carbón vegetal, parte del cual se exporta a los países desarrollados para la conversión en carbón activo. El casco finamente molido se usa en pequeña proporción como carga en termoplásticos.
- ALMENDRA O NUEZ :Se utiliza para extracción de aceite, leche de coco, coco rayado para confitería, harina de coco.
- AGUA DE COCO: Se consume como bebida refrescante, se utiliza para la fabricación de vinagre, medios de cultivos microbiológicos, como sustitutivo del plasma sanguíneo y para casos severos de mal nutrición

A continuación se describirá detalladamente la utilización del agua de coco, así como también se presentará su composición química.

I.3.1 UTILIZACION Y COMPOSICIÓN DEL AGUA DE COCO.

El agua de coco es una bebida higiénica, refrescante y su valor alimenticio se estima por los componentes que se muestran en el cuadro 1.3.

Este líquido, está encerrado en la carne o albumen y contiene sustancias promotoras del crecimiento de identidad desconocida, con un contenido muy pequeño de ácido ascórbico (vitamina C). Ahora bien, su composición cambia durante los procesos de desarrollo, germinación. (Grimwood, 1977).

Cuadro 1.3. Diversos componentes del agua de coco.

Componentes	Porcentaje
Agua	92%
Aceites	1%
Proteínas	1%
Hidratos de carbono	5%
Minerales	1%

(Gattioni, 1960)

Generalmente a los 5 meses el fruto ha alcanzado su tamaño definitivo y empieza a formarse la carne o almendra gelatinosa. Un coco lleno de agua y de sabor agradable se cosecha entre los 6 y 8 meses. A esta edad la cantidad de agua varía entre 600 a 400 gramos, o sea el equivalente de líquido de 3 botellas de soda. El agua, que es apenas dulce y un poco acidulada, va concentrándose y consumiéndose hasta desaparecer por completo a medida que avanza y termina la madurez del fruto, que demora 12 meses. (Gattoni, 1960).

El agua de coco tierno (7 - 8 meses) es una bebida importante en zonas de producción del coco, y es consumida diariamente grandes cantidades, por los habitantes de la zona, los agricultores que producen cocos en pequeñas áreas prefieren vender el coco antes de que

madure completamente para que sea consumida su agua y no dejarle madurar para producir copra.

En países como Indonesia, Filipinas y Tailandia, los fabricantes de productos derivados de la copra han intentado producir bebidas del agua de coco, utilizando un proceso rápido de pasteurización que es realizado a una alta temperatura (semejante al que se utiliza para la leche), que tiene la desventaja de eliminar algunos elementos nutritivos y afecta el delicado sabor, aunque elimina el crecimiento de las bacterias. Todo esto afecta seriamente la comercialización del mismo, aunque existe en el mercado bebidas que se venden como agua pura de coco en empaques para productos alimenticios delicados tales como el Tetrabrik.

Otra de las aplicaciones que ha tenido el agua de coco es para sustituir al plasma sanguíneo, ya que es una bebida isotónica natural, con el mismo equilibrio electrolítico que nuestra sangre, durante la guerra del Pacífico de 1941-45, las partes en conflicto utilizaron habitualmente el agua de coco, extraído directamente del fruto con este fin.

Se ha comprobado que el agua de coco es un sustitutivo útil para infusiones intravenosas. El agua es estéril dentro de la nuez, y puede retirarse fácilmente con ayuda de un tubo insertado; causa reacción diurética en casos de nefritis y en cirrosis atrofica con ascites. Además se ha empleado con éxito en casos de mal nutrición aguda y deshidratación.

Desde hace muchos siglos, el agua de coco viene usándose en los países de origen para curar varias enfermedades. A veces por sí misma, o frecuentemente mezclada con leche de coco, se ha utilizado en el tratamiento de gusanos intestinales y para aliviar los trastornos estomacales, y en caso de cólera, en que la presencia de sustancias salinas y albúminas controla el vómito. Se afirma que disminuye los sarpullidos causados por la viruela y el sarampión, y se cree que es beneficiosa para la piel en general. (Grimwood, 1977).

Se ha demostrado que el agua de coco es un excelente medio de cultivo bacteriológico, se presta al crecimiento e incluso lo estimula. Al adicionar de 10 a 25% del agua de coco a un medio nutritivo ordinario casi duplica sus cualidades culturales en el caso de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus faecalisalcaligenes* y *Bacillus Velihii*. También se ha

demostrado que el agua de coco contiene uno o varios factores esenciales para el crecimiento y desarrollo de embriones muy jóvenes del *Datura stramonium*. Después, se ha comprobado eficaz para favorecer el crecimiento por ejemplo del girasol, del mosaico del tabaco y del cultivo del tejido de patatas, así como el crecimiento in vitro de plantas a partir de raíces de zanahoria. Cuando se añade a un medio de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*, incluso a una dilución de 10,000, disminuye a 12 los 20 días que normalmente se necesitan para el crecimiento máximo.

Kluveiromices fragilis crece bien sobre agua de coco maduro, con rendimientos que llegan hasta 0.54 g de levadura seca por gr. de azúcar total a 40 °C. Sólo se necesita añadir urea (u otra fuente nitrogenada) a una concentración de 1 gr./lt al agua de coco para obtener rendimiento máximos, ya que hay en su estado natural suficientes sustancias minerales y vitaminas. Después de lavada y secada la levadura recogida tiene un aspecto crema pálido, poco olor y un sabor agradable a nuez. Se conserva bastante tiempo en almacén.

Un procedimiento para cultivar *K. fragilis* sobre agua de coco únicamente sería viable si se dispusiera sobre grandes suministros periódicos de este líquido, por ejemplo, una fábrica de coco desecado. Para una instalación que elaborase 800,000 cocos aproximadamente, se producirían unos 112,000 litros de agua de coco cada día. Suponiendo que esta agua de coco contenga 3% de carbohidratos y que pueda obtenerse un 50% de rendimiento de levadura, en 300 días laborables podrían producirse casi 500 toneladas de levadura seca. La *K. fragilis* es una fuente rica de aminoácidos y vitaminas, que contiene 45% de proteína.

Como el agua de coco se infecta fácilmente al dejarla abandonada, se necesitan métodos para preservarlas en gran escala antes de la inoculación. Experimentos de laboratorio han demostrado que el Metabisulfito sódico a una concentración del 0.25% preserva el substrato durante 24 horas. Esta concentración puede rebajarse a 0.03%, ajustando el pH del agua de coco desde 5.4 (normal) a 3.9.

El agua de coco maduro no es una fuente económica de carbohidratos. La concentración de carbohidratos es pequeña (alrededor del 2%) y, además, contiene grandes cantidades de otras materias orgánicas e inorgánicas. Algunos autores llegan a la conclusión de que la

producción de alcohol industrial por fermentación no presenta interés, aunque una fermentación adicional dará una solución diluida de ácido acético (alrededor del 0.5%).

Lahille recomienda conservar la potasa en el agua añadiendo cal 0.54 g de levadura seca por gr. de azúcar total a 40 °C para formar una papilla que puede utilizarse como fertilizante. (Grimwood, 1977). En el cuadro 1.4 se presenta la composición del agua de cocos maduros.

Cuadro 1.4. Análisis del agua de cocos maduros.

Componentes	Límites	Peso medio
 Gramos por 100 mililitros.	
Sólidos totales	3.9 - 5.5	4.71
Azúcares reductores (como azúcar invertido)	0.23 - 1.30	0.80
Azúcares reductores adicionales después de inversión (sacarosa)	0.93 - 3.15	1.28
Cenizas	0.50 - 0.84	0.62
Sólidos orgánicos no identificados	-	2.01
Humedad	-	95.29

(Grimwood, 1977)

Como puede observarse en los cuadro anteriores los constituyentes más importantes son los carbohidratos, pero hay gran confusión en cuanto a su identidad en un principio se sugirió que había glucosa, fructosa y sacarosa. Posteriormente se encontró sorbitol en cantidades considerables junto con m-inositol y s-inositol posteriormente se informó sobre la presencia de galactita en el cuadro 1.5 se reproduce el análisis cuantitativo de muestras típicas de agua de coco maduro en República Dominicana y Malasia. (Grimwood, 1977)

Varios investigadores se han dado cuenta de la presencia de cantidades considerables de manitol; sin embargo, este compuesto solamente se ha encontrado en agua de coco podrida, es decir, agua que se ha tenido almacenada durante algún tiempo después de

sacada de la nuez. Se cree que se ha formado por reducción bacteriana de hexosas existente en estado natural en el agua de coco.

Sólo se encuentran cantidades muy pequeñas de proteínas y grasas hasta el momento de germinación de la nuez.

Cuadro 1.5. Análisis cuantitativo de carbohidratos en el agua de cocos maduros (República Dominicana y Malasia)

Carbohidratos	República Dominicana	Cocos de Malasia
 Porcentaje	
Glucosa	0.18	} 0.75
Fructosa	0.20	
Sacarosa	3.94	1.88
Sorbitol	1.02	0.94
m-Inositol	Indicios	Indicios

(Grimwood, 1977.)

El agua de coco madura contiene varias vitaminas, pero en cantidades poco importantes. El ácido ascórbico es la principal vitamina presente. Se han citado cantidades que oscilan entre 7 - 37 mg/ lt. Se encontró también ácido nicotínico 0.64 µg/ml, ácido pantoténico 0.52 µg/ ml, biotina 0.02 µg/ ml, riboflavina 0.01 µg/ ml y ácido fólico 0.003 µg/ ml. Se ha informado también sobre la presencia de indicios de tiamina y piridoxina.

Se ha encontrado aminoácidos proteínicos libres en agua de coco a razón de 4.135 µg/ 100 µg de residuo insoluble en alcohol a partir de coco maduros. En el cuadro 1.6 puede verse la composición en aminoácidos.

Varios investigadores han informado sobre la presencia de factores de crecimiento en el agua de coco. Shanz y Stewart señalaron la presencia de 1,3 - difenilurea (5.8 µg/ ml), y de indolacéticoarabinosa.

La potasa es el principal constituyente del agua de coco, aunque se hayan encontrado indicios de otros varios elementos. Indudablemente el contenido de elementos traza dependerá en gran medida de las cantidades del suelo. En el cuadro 1.7, se resumen los elementos traza identificados en el agua de coco. (Grimwood, 1977)

Cuadro 1.6. Aminoácidos de agua de cocos maduros (República Dominicana).

Aminoácidos	µg. / 100 mg de residuo insoluble en alcohol	Nitrógeno de aminoácido en porcentaje de nitrógeno proteínico total
Acido cistérico	217	3.86
Acido aspártico	190	2.94
Acido glutámico	890	12.47
Serina	166	3.25
Glicina	277	7.61
Treonina	62	1.07
Alanina	61	1.41
Histidina	197	7.86
Lisina	398	11.23
Arginina	663	31.4
Prolina	478	8.57
Valina	73	1.28
Leucina	246	3.86
Fenilalanina	14	0.18
Tirosina	92	1.05
Hidroxiprolina	indicios	indicios
Metionina-sulfóxido	111	1.92

(Grimwood, 1977)

Cuadro 1.7. Elementos traza encontrados en el agua de coco

Elemento	K	Na	Ca	Mg	Fe	Cu	P	S	Cl
Mg/100 ml	312	105	29	30	0.1	0.04	37	24	183

(Grimwood, 1976)

1.4 DISTRIBUCION ACTUAL DEL COCOTERO EN EL MUNDO

Las principales zonas en las que crece el coco en el mundo están situadas a unos 22° de ambos lados del Ecuador, (véase figura, 1.4). Fuera de estos límites, el cocotero tiende generalmente a crecer con lentitud, es principalmente vegetativo, y tiene valor comercial reducido o nulo. Child (1964) ha resumido los límites dentro de los cuales puede encontrarse el cocotero. En la India crece hacia el Norte hasta Lucknow (latitud 26°24'), aunque no suele fructificar allí, en Africa, los límites septentrionales con Cabo Verde (15°N) en la Costa Occidental, y Djibouti (11°30'N) al Este; y, en el Pacífico el cocotero se encuentra en el Norte hasta las Islas Bonin (26°N), y al Sur hasta la Isla Pitcairn (25°S). En América del Sur se encuentra esta palma entre Brasil a una latitud de 27°S, y en América del Norte, en Florida, a una latitud de 25°N, aunque los intentos de cultivarla allí a gran escala no han tenido gran éxito. (Grimwood, 1977).



Figura 1.4. Principales zonas del cultivo del cocotero en el mundo.

1.5 DISTRIBUCION ACTUAL DE LAS PLANTACIONES DE COCOTERO EN EL SALVADOR.

En El Salvador el cultivo del cocotero ha disminuido debido al déficit territorial y a las diferentes reformas agrarias que se han estado llevando a cabo desde el comienzo del conflicto armado. Las plantaciones de cocotero que actualmente existen se dedican a la venta de cocos para consumo de su agua fresca y su fruto. Por lo mismo, existen pocos lugares que produzcan cocos en cantidades suficientes que sean destinados a la industria aceitera. Un ejemplo claro es el de la Cooperativa de Tihuilocoyo, que se dedicaba a la producción de cocos para la obtención de aceite, la cual desapareció y por decisión de los integrantes sus tierras han sido parceladas para construcción de viviendas y la siembra de otros cultivos diferentes al cocotero, los cocos que se obtienen son pocos y se venden como fruta, así como lo hacen otras cooperativas del occidente del país donde su producción es poca, aunque es registrada por el Ministerio de Agricultura y Ganadería como lugares de donde se obtienen estos frutos (ver figura 1.5).

Por otro lado en toda la costa salvadoreña existen Palmas de Coco (es el nombre con el que se conocen estos árboles), que son parte de pequeñas propiedades privadas y cuyos frutos son básicamente de consumo doméstico, las tierras que son dedicadas especialmente para plantaciones de cocotero son pocas y se encuentran distribuidas en la zona oriental del país, en las costas e islas del departamento de Usulután, en donde están las cooperativas: El Jobal, en la Isla El Espíritu Santo; Corral de mulas, en la Península de San Juan del Gozo; San Sebastián, en la Isla del mismo nombre y Madresal, en la Isla Madresal, tal como puede observarse en la figura 1.6.

En estas cooperativas se cultivan cocos con la finalidad de producir coco desecado o aceite, aunque debido a las dificultades que tienen para comercializar sus productos se están dedicando también a generar otros que sean fácilmente colocados en el mercado nacional e internacional.

Las cooperativas San Sebastián, Madresal y Espíritu Santo, procesan únicamente la copra hasta obtenerla seca para luego venderla a otros lugares en tierra firme donde se fabrica aceite o se vende el coco desecado para comercializarlo como alimento.

La Cooperativa El Jobal, que es la más grande y organizada de las antes mencionadas, se encuentra produciendo aceite de coco, además de otros subproductos de la industria del aceite de coco, como la harina residual de copra, que se utiliza para fortificar alimento de cerdos y carbón activado o carbón para cocina, que es producto de investigaciones recientemente realizadas.



MAPA DE USO ACTUAL DEL SUELO EL SALVADOR 1997

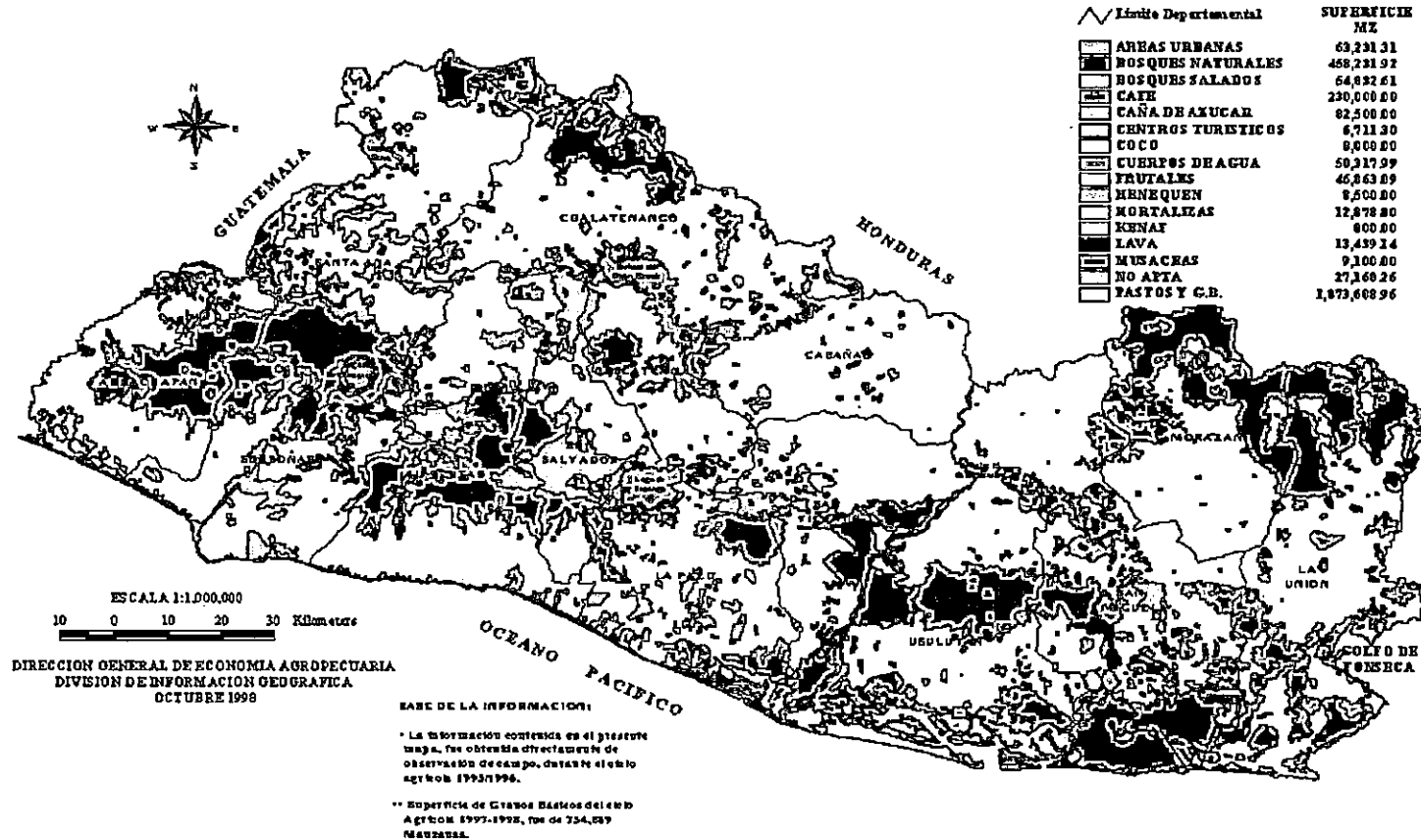


Figura 1.5. Mapa de uso actual del suelo en El Salvador donde se pueden observar las zonas dedicadas al cultivo del cocotero en color rosa.¹

¹ Mapa cortesía del Ministerio de Agricultura y Ganadería División de Economía Agropecuaria. El Salvador 1998.

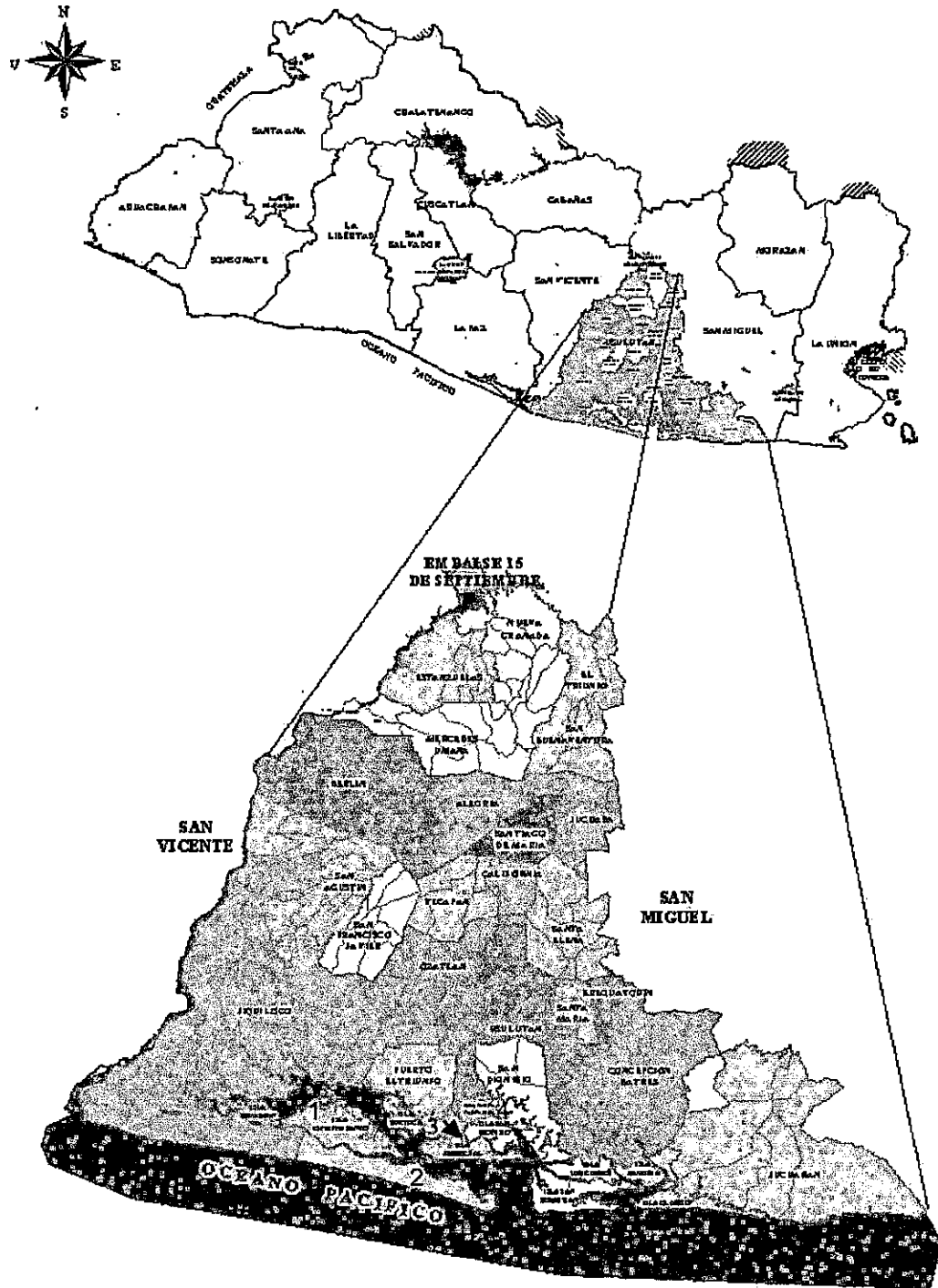


Figura 1.6. Ubicación de las plantaciones de coco dedicadas a la producción de aceite. 1- Isla y Cooperativa El Espíritu Santo, 2- Cooperativa Corral de Mulas, 3- Isla Madresal y 4- Isla San Sebastián.

1.6 SITUACION ACTUAL DE LA INDUSTRIA DE EXTRACCION DE ACEITE DE COCO EN EL SALVADOR .

En El Salvador sólo se cuenta con dos extractoras de aceite de coco, una se encuentra ubicada en la carretera que conduce a Santa Ana, en la que se procesa el aceite después de comprar la copra seca a cooperativas como por ejemplo Corral de Mulas, San Sebastián y otras que se dedican a este rubro; y la cooperativa El Jobal ubicada en la isla El Espíritu Santo en la bahía de Jiquilisco, Usulután. (ver figura 1.7)

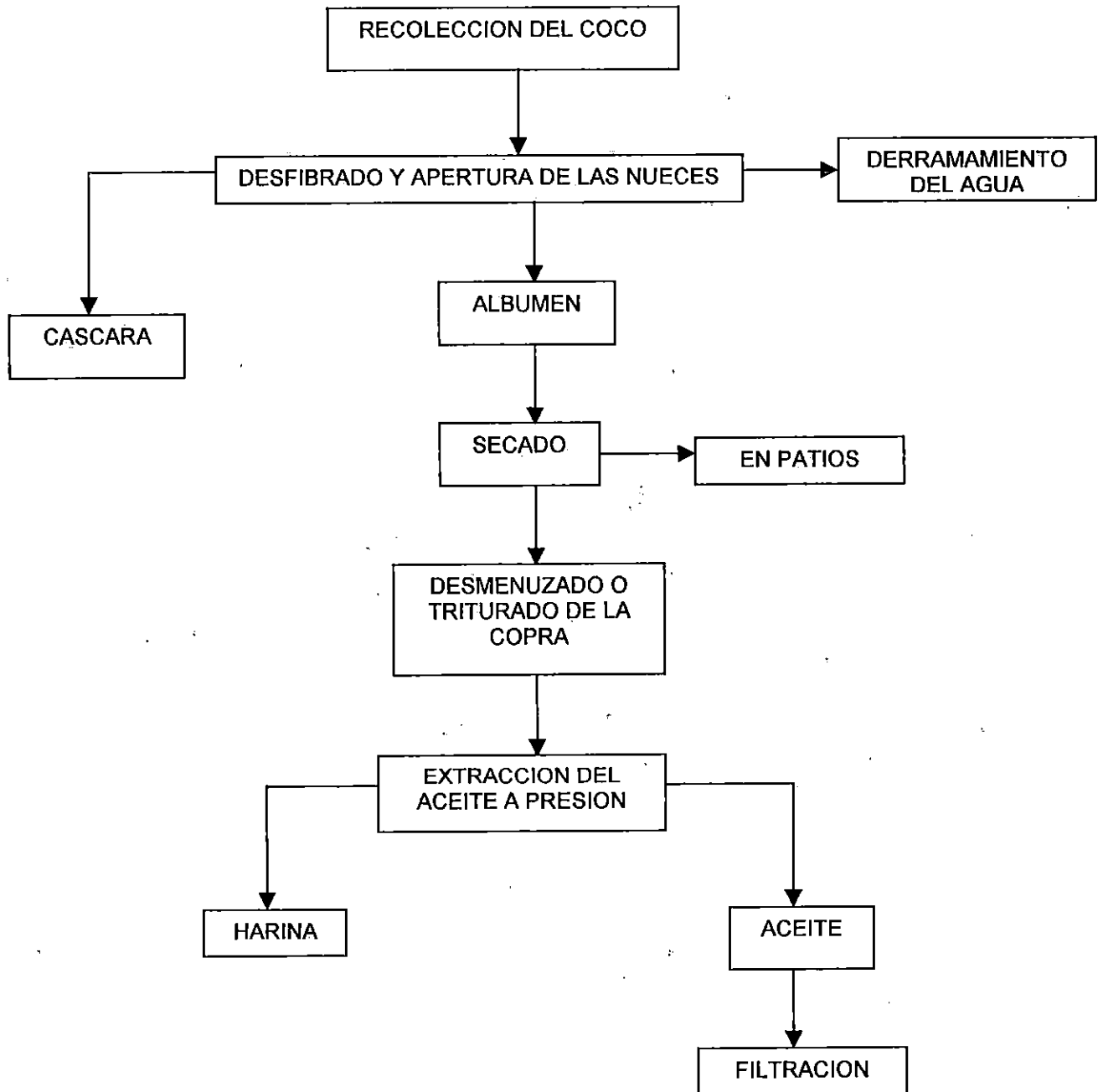
La cooperativa El Jobal fue fundada en 1980 y cuenta con una extensión de 400 mil manzanas, en las cuales se encuentran palmeras de la variedad enana y polinesio de hasta 60 años de edad. El patrimonio de esta cooperativa se basa en la extracción y el procesamiento de la copra para la fabricación de aceite de coco, por lo que ha sido tomada como base para el presente estudio.



Figura 1.7. Costa de la Isla Espíritu Santo, en la Bahía de Jiquilisco.
Departamento de Usulután.

En la figura 1.8 se muestra el flujograma de producción de aceite de coco utilizado en El Salvador

Figura 1.8. Esquema de producción de aceite de coco



La producción del aceite inicia con la recolección del coco, lo que implica la selección, corte y transporte del fruto, para luego ser llevado a patios de acopio (que miden alrededor de una manzana de extensión), cada día se depositan en este patio alrededor de 700 a 800 cocos. En la figura 1.9 puede observarse una zona del patio de acopio de la Cooperativa El Jobal.

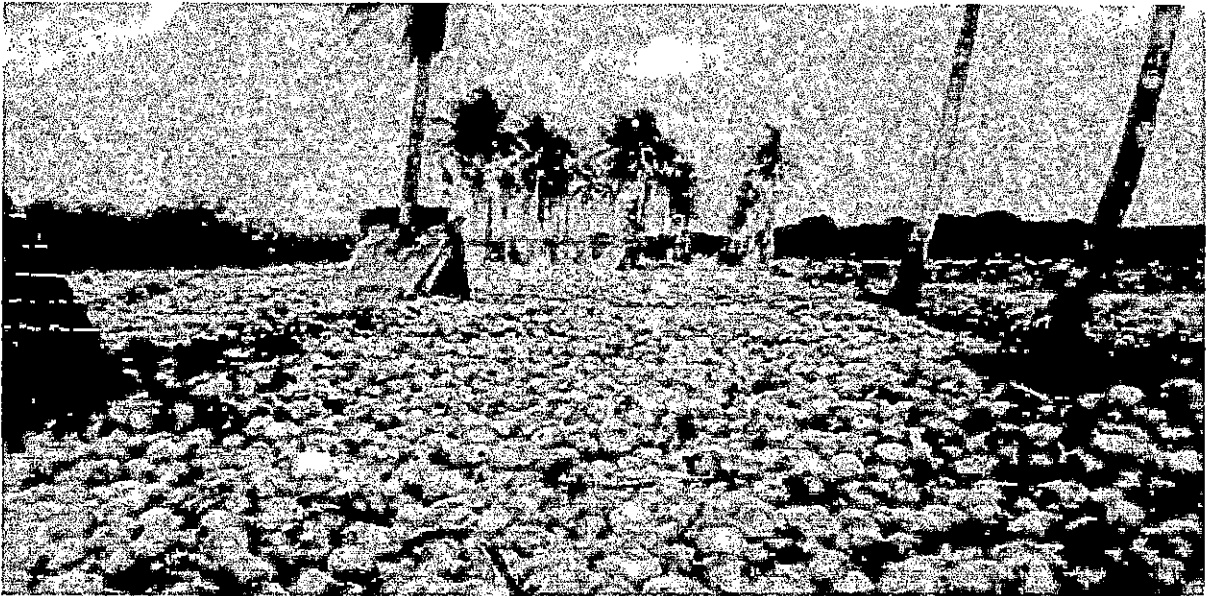


Figura 1.9. Vista de uno de los patios donde se depositan los cocos en la Cooperativa "El Jobal" de la Isla El Espíritu Santo. Bahía de Jíquilisco Usulután.

El patio de acopio está dividido en varias zonas, los cocos se parten en zonas diferentes para evitar la acumulación excesiva de agua de coco, es decir que no se utiliza siempre el mismo lugar, ya que el método que se utiliza para extraer la copra no permite la acumulación del agua de coco en recipientes, sino que ésta cae directamente al suelo aproximadamente de 400 a 500 lt/día, generando un problema en las zonas donde se parten los cocos, pues al entrar en contacto con el aire, el agua pierde rápidamente casi todas sus propiedades organolépticas y es un medio propicio para ser atacado por levaduras y bacterias, las cuales la fermentan y producen contaminación de los suelos, ya que ésta se transforma en ácido acético que al acumularse influye en la acidez del suelo, afectando a los cultivos más cercanos.

En la producción de copra a pequeña escala el agua de coco suele recogerse y darse a los cerdos y al ganado vacuno, cuando está fresca, pero es más frecuente que se constituya en un desperdicio.

El albumen es arrancado del coco por medio de unas cucharas afiladas, las cuales son manipuladas por mujeres que se dedican a este trabajo (que en la zona son conocidas como "copreras") ver figura 1.10.

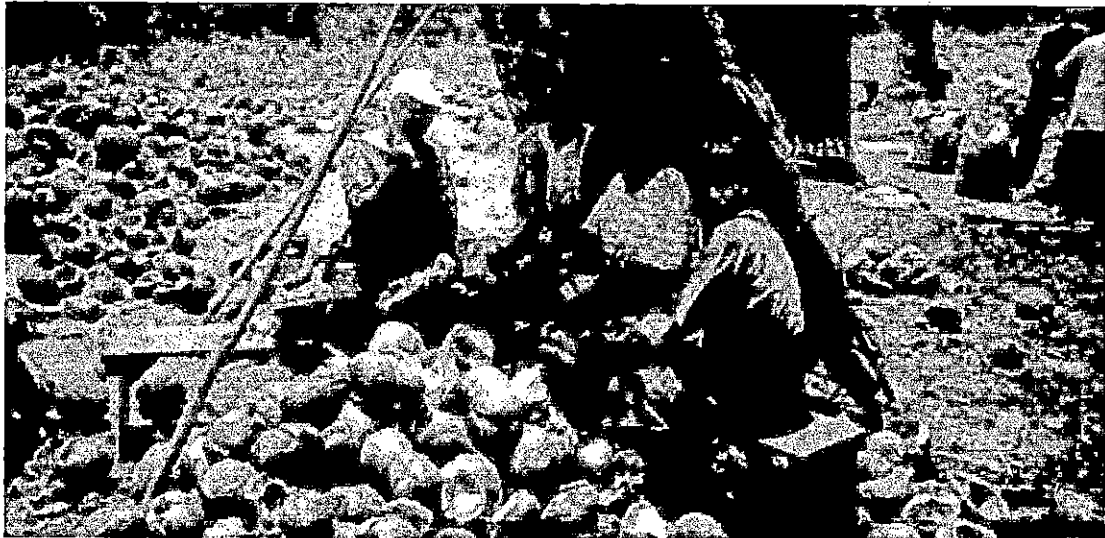


Figura 1.10. Obreras extrayendo copra en la cooperativa "El Jobal". Isla Espíritu Santo. Bahía de Jiquilisco. Usulután.

En cuanto a las cáscaras y los cascos de coco se utilizan en pequeñas cantidades para ser consumida por los habitantes de la isla, y según investigaciones recientes, la estopa de coco de la cooperativa El Jobal esta siendo utilizada por la empresa Carbón Activado de El Salvador (CADESAL), para la fabricación de carbón vegetal. (La Prensa Gráfica, 15/10/00)

Luego este albumen es pesado y es transportado en un camión con destino a los patios de secado en donde recibe un tratamiento térmico natural (se pone a secar al sol), que constituye la operación esencial en la preparación de la copra. Los patios de secado constan de un área de hormigón, ligeramente inclinadas en dirección a un sumidero, sobre el cual se coloca la copra. Si se tiene cuidado de realizar la apertura de los cocos desde el amanecer la copra queda expuesta durante un día entero a la acción benefactora del sol,

resultando una reducción del índice de humedad (ver cuadro 1.8) y una mayor resistencia a las bacterias. Estas áreas de secado se lavan y limpian cuidadosamente cada tarde, después de su uso. Luego la copra seca se empaca en sacos de henequén y es almacenada hasta su utilización.

Cuadro 1.8. Cuadro comparativo de la composición de la copra seca y fresca

	Copra fresca	Copra seca
Agua	51 %	12 %
Aceite	32 %	60 %
Proteína, celulosa, etc.	17 %	28 %

El método utilizado en El Salvador para la extracción de aceite de la copra madura es a presión, con ayuda de modelos muy potentes de prensas (ver figura 1.11), el color del aceite extraído es de un amarillo más o menos pardusco, a causa de la temperatura relativamente elevada alcanzada en estos equipos. El punto de fusión del aceite de coco (o de copra) oscila generalmente los 23 y los 26°C y puede ser incluso inferior a los 23°C. Se trata pues de un aceite (líquido) en el clima tropical, y en países de clima templado se presenta como una masa, de ahí el nombre de aceite "espeso". La densidad del aceite de copra es de 0.925 a 15°C. las proporciones de ácidos grasos que constituyen los glicéridos del aceite de coco de procedencia muy variada, oscilan entre los valores que se presentan en el cuadro 1.9 (Yan y Ziller, 1975)

Los procedimientos industriales para la extracción del aceite de coco, consiste en moler o rallar la copra en polvo fino semejante al aserrín de madera, que estando caliente es sometido a fuertes presiones en prensa hidráulicas. El aceite recién prensado se filtra y se purifica.

Se estima que una tonelada (2000 libras) de copra seca produce alrededor de 500 a 600 litros de aceite, según sea la calidad de la copra, y el precio de cada quintal de aceite de

coco oscila entre 310 a 280 colones. Después de extraído el aceite, el residuo de la copra queda en forma de afrecho prensado que es la torta de coco. (Gattoni, 1960).



Figura 1.11. Prensa hidráulica utilizada en la extracción de aceite de coco. Cooperativa "El Jobal". Isla Espiritu Santo. Bahía de Jiquilisco. Usulután. (Foto por La Prensa Gráfica, nov. 2000)

Se emplean cantidades menores en especialidades alimenticias, lubricantes, combustibles, cosméticos, ungüentos, cremas de afeitar, champúes y dentífricos. En muchas zonas apartadas, el aceite se sigue utilizando para el alumbrado, particularmente durante las épocas en que el suministro de petróleo es irregular. El uso de aceite de coco como combustible para motores diesel ha resultado antieconómico. La harina que se extrae de la carne de coco es una sustancia alimenticia de primer orden para bestias de trabajo y para los hombres también. (Guzmán, 1976).

Una tonelada de copra prensada, de la extracción de aceite, rinde más o menos 8 quintales de torta que se vende como afrecho de coco o harina (Gattoni, 1960).

La harina de coco, también llamada poonac está comprendida en la clase de alimentos moderadamente ricos en proteínas, como la torta de semilla de algodón sin descascarillar.

El contenido de aceite es aproximadamente igual al de la torta de linaza, y el contenido total de elementos minerales es aproximadamente el mismo que el de la mayoría de las otras tortas oleaginosas. La composición de poonac de coco muestra, además, que tiene una ración equilibrada de proteínas, carbohidratos y grasas, presentándose por tanto, para utilizarlo en la producción de leche en ganado vacuno, para la cría de cerdos jóvenes y para las gallinas ponedoras, como contiene compuestos de fósforo, potasio y sodio, el poonac, de coco puede servir también de fertilizante (Grimwood, 1977).

Cuadro 1.9. Cuadro de proporciones de ácidos grasos en la composición del aceite de coco

Ácidos Grasos	Número de carbonos	Valores (%)
Ácido caproico	6	Trazas
Ácido caprílico	6	5.4 - 9.5
Ácido cáprico	10	4.5 - 9.7
Ácido laúrico	12	44.1 - 51.0
Ácido mirístico	14	13.1 - 18.5
Ácido palmítico	16	7.5 - 10.5
Ácido esteárico	18	1 - 3.7
Total de ácidos saturados		91
Ácido Oleico	18	5 - 8.2
Ácido Linoleico	18	1 - 2.6
Total ácidos no saturados		9

(Yan y Ziller, 1975)

La torta de coco tiene una composición aproximada como la que se presenta en el cuadro 1.10.

Cuadro 1.10. Composición aproximada de la torta de harina de coco.

Componente	Porcentaje
Humedad	13.08%
Proteína cruda	18.26%
Grasa	10.75%
Fibra	8.54%
Cenizas	4.94%
Extracto libre de nitrógeno	44.43%

(Gattoni, 1960).

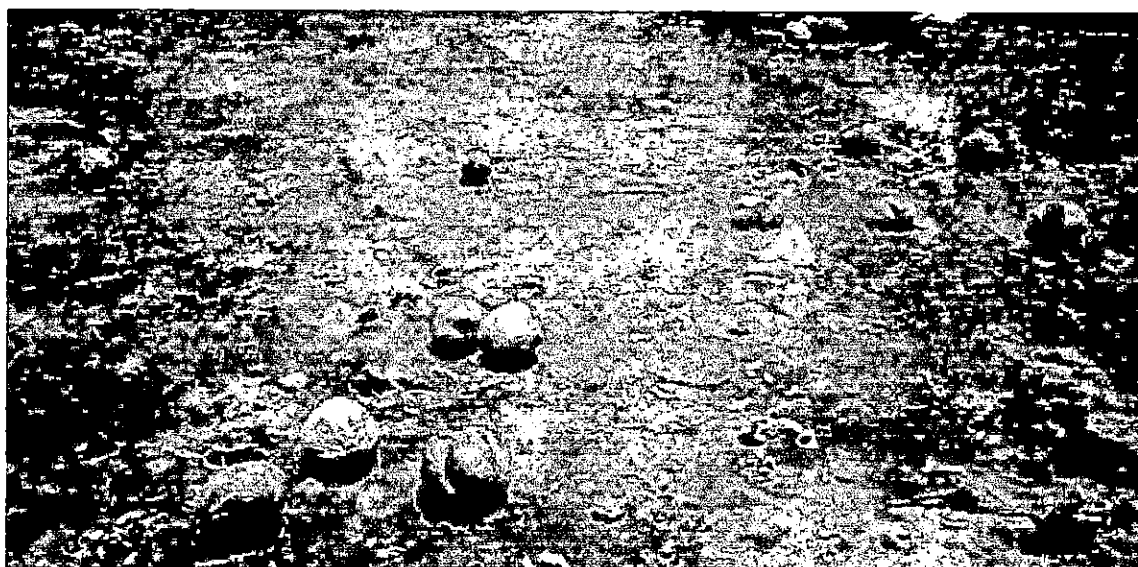


Figura 1.12. Patio utilizado para partir de los cocos en el proceso de extracción de aceite. Cooperativa "El Jobal". Bahía de Jiquilisco, Usulután.

Nuestro trabajo se encuentra enfocado en la utilización de uno de los residuos que es generado en esta industria con la finalidad de evitar en cierto grado la contaminación que se genera en la isla (ver figura 1.12) por este proceso, así como la minimización de las enfermedades provocadas por la reproducción excesiva de insectos tales como mosquitos y zancudos quienes son los causantes de enfermedades tales como el dengue hemorrágico, y otro tipo de infecciones por la acumulación de humedad en el lugar, así como la recuperación de los suelos debido a la acidez provocada por las posteriores fermentaciones que sufre el agua de coco.

II PROCESOS PARA LA OBTENCIÓN DE VINAGRE

El vinagre es uno de los condimentos y conservantes más antiguos que se conoce, que aporta aroma y sabor a los alimentos y mejora sus características de conservación. Se obtiene por la acidificación del alcohol, lo que quiere decir que se necesitan dos procesos microbiológicos separados y diferentes para producirlo.

La primera etapa en la producción de vinagre es la fermentación alcohólica, donde se pueden utilizar diversas materias primas que contengan azúcares fermentables por especies de levaduras del género *Saccharomyces*. La segunda etapa es de acetificación por especies del género *Acetobacter*.

A continuación se hace una descripción de las etapas requeridas para la producción de vinagre con sus respectivos procesos microbiológicos y las especies que en él participan.

II.1 EL PROCESO DE FERMENTACIÓN

El término fermentación se utiliza para designar todos los términos que describen diversas acciones microbianas.

La respiración y la fermentación no son procesos comparables. La respiración introduce oxígeno libre en el proceso, mientras que la fermentación o es anaerobia por completo o no es capaz de realizar la oxidación (deshidrogenación) hasta el estado en que todos los átomos de carbohidrato se oxidan a anhídrido carbónico. Estos últimos procesos son una especie de transición entre la respiración y la fermentación verdadera.

Cuando, por ejemplo, en los hongos se encuentran ácidos orgánicos como producto de una combustión incompleta, entonces este proceso se puede considerar como fermentación. Debido a los productos principales formados se habla de fermentación cítrica, fermentación oxálica, etc. las fermentaciones de este tipo se llaman fermentaciones oxidativas porque el oxígeno sirve como aceptador, mientras que otras fermentaciones en las cuales no intervine el oxígeno como aceptor sino otras sustancias, en especial aldehícas, como en la

fermentación alcohólica, se llaman fermentaciones de escisión o fermentaciones anoxidativas.

Las fermentaciones más importantes son:

Fermentaciones anoxidativas:	}	Fermentación alcohólica
		Fermentación láctica
		Fermentación propiónica
		Fermentación butílica
Fermentaciones oxidativas:	}	Fermentación acética
		Fermentación cítrica
		Fermentación fumárica
		Fermentación oxálica

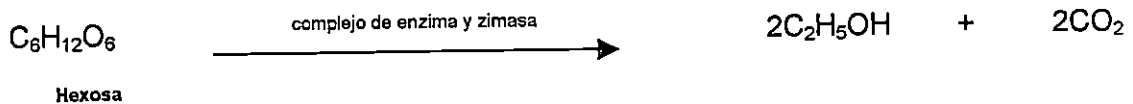
Nuestro interés para esta investigación se centrará en la fermentación alcohólica y la acetificación del alcohol.

II.2 MECANISMO DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.

En la fermentación alcohólica hay una transposición de los átomos de oxígeno de las moléculas de glucosa en relación con los átomos de carbono, empobreciéndose en oxígeno algunos átomos de carbono de la molécula de glucosa, cada átomo de carbono de la molécula de anhídrido carbónico tiene dos átomos de oxígeno, mientras que los átomos de carbono de la molécula de la molécula de alcohol sólo tienen medio átomo de oxígeno.

La fermentación alcohólica es un proceso que consiste en la hidrólisis del azúcar a anhídrido carbónico y etanol al resguardo de oxígeno libre. Dada la enorme importancia de este proceso se ha tratado más de cerca su proceso químico.

Una ecuación que representa simplemente el proceso total por el cual el azúcar es transformado en etanol y dióxido de carbono es la siguiente:



En realidad intervienen gran número de reacciones estrechamente relacionadas que pueden dividirse en pasos de oxidación-reducción y fosforilación, y ciertas reacciones especiales. Todas esas reacciones son catalizadas por enzimas muy específicas.

Los organismos capaces de producir fermentación alcohólica son *Saccharomyces* y otras especies de levaduras, *Turolopsis*, *Kloeckera*, *Candida*, ciertas especies de *Mucor* y algunas bacterias. Sin embargo, la fermentación alcohólica más importante es producida por especies *Saccharomyces*. (Saca Kury, 1980)

Los hidratos de carbono que se pueden fermentar son aquellos que contienen tres átomos de carbono o un múltiplo de los mismos. Los monosacaridos se pueden fermentar directamente, mientras que los di, tri, y polisacáridos tienen que ser hidrolizados a hexosas antes de ser fermentados.

Se conocen cuatro hexosas fermentables: glucosa, fructosa, manosa y galactosa. Las tres primeras siempre son fermentables, mientras que la última sólo puede ser fermentada por ciertos tipos de levaduras.

II.3 MICROORGANISMOS PARA LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

El término levadura se refiere a un microorganismo unicelular nucleado, que se reproducen ya sea sexual o asexualmente (la cual se divide en gemación y fisión binaria). En la figura 2.1 se presenta un ejemplo de una levadura del género *Saccharomyces* en fusión binaria. (Saca Kury, 1980).

La mayoría de las levaduras son células que tiene forma esférica o elipsoidal; generalmente con un diámetro entre 3 a 5 μ y de 5 a 10 μ de longitud. La pared de las levaduras es rígida y parece formada de un material semejante al que se encuentra en las células de los mohos. Algunas levaduras forman cápsulas gelatinosas. No se ha registrado en las levaduras ni movilidad, ni producción de flagelos.

El protoplasma de una célula de levadura está incluida en una pared celular separada por una membrana citoplasmática y contiene un núcleo, una gran vacuola y numerosos gránulos y glóbulos de grasa.

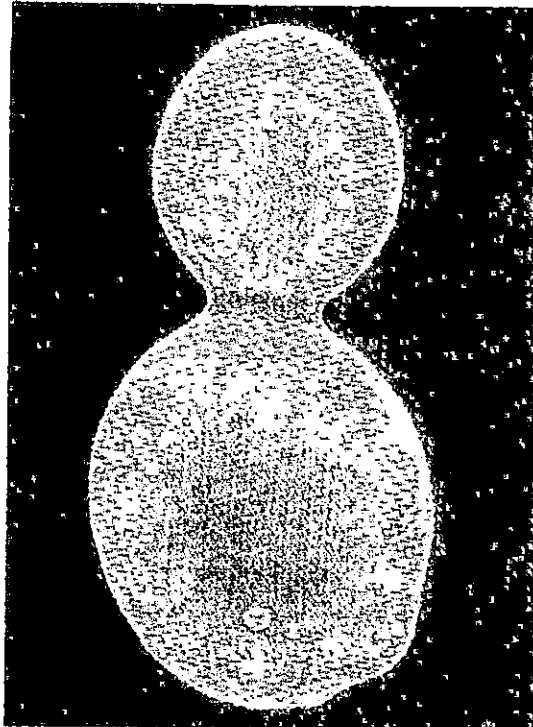


Figura 2.1. Fotografía de una levadura del género *Saccharomyces* en plena fisión binaria.

Las levaduras pertenecen a tres clases:

- Las esporobolomicetáceas
- Los basidiomycetos
- Las crypococcaceae (hongos imperfectos) (Saca Kury, 1980)

El género *Saccharomyces* es el más conocido y la especie de mayor importancia económica es la *Saccharomyces cerevisiae*, la cual es frecuentemente utilizada para la fermentación del pan y para la producción comercial de alcohol y de la mayoría de las bebidas alcohólicas; perteneciendo éstas al segundo grupo, el cual se reproduce por gemación. La gemación se lleva a cabo cuando aparece en la pared celular una pequeña protuberancia que poco a poco aumenta de tamaño. El citoplasma de la célula madre e

hija permanece unido por un cierto periodo, pero al término de este el vínculo que las une se rompe, formándose de esta manera una pared celular transversal doble, por lo que las dos células son fisiológicamente independientes y pueden separarse. En el sitio de separación aparece una cicatriz convexa de la yema en la célula madre, y una cóncava en la célula hija.

Las células de *Saccharomyces cerevisiae* redondeadas, que en cultivos puros predomina su forma celular pero no todas las células son morfológicamente idénticas, ya que estas formas dependen de las condiciones del medio, substrato nutritivo, temperatura, etc., o sea que si varía el medio variará la forma de la célula de una misma especie.

Las células de los sacaromicetos están provistas de un núcleo de 1μ de diámetro aproximadamente, y son fácilmente puestas en evidencia por las coloraciones nucleares con yodo (presentan una tinte pardo-rojizo).

II.3.1 FISIOLOGÍA DE LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*

- **Requerimientos nutricionales**

Necesita de los mismos elementos químicos que otras formas de vida:

Carbono, hidrogeno, fósforo, potasio, azufre. Magnesio, hierro, zinc, cobre y molibdeno.

- **pH**

Resisten pH mínimos de 3 y máximos de 7.5, pero su rango óptimo de crecimiento es de 4.5 - 5.

- **Temperatura**

No resisten temperaturas de congelamiento, ni temperaturas superiores a los 47°C , siendo su rango óptimo entre los 20°C y 30°C .

- **Agua**

Cantidad máxima del 40%.

En las levaduras industriales se suelen distinguir dos tipos:

1. Levaduras bajas, y
2. Levaduras altas

Las levaduras bajas en los líquidos que fermentan se presentan aisladas o en pequeños grupos de células nadando en el líquido o formando depósito en el fondo y actúan a temperaturas inferiores de 5°C a 10°C.

Las levaduras altas fermentan los azúcares solamente a temperaturas relativamente elevadas de 10°C a 25°C o más; en su multiplicación asumen frecuentemente formas agrupadas en montones ramificados formados por bastante células o quedan aisladas; las células de levadura durante la fermentación flotan en el líquido o son arrastradas por las burbujas de CO₂ y en la parte superior del líquido que fermentan existe un estrato muy abundante en levaduras mezcladas con la espuma; es evidente que no se trata en este caso de nada parecido a una membrana o velo, propiamente dicho. Cuando la fermentación decrece en intensidad las células de levadura alta se aíslan y caen al fondo del depósito.

II.3.2 ENZIMAS DE LEVADURA

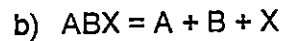
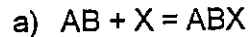
Casi todos los procesos bioquímicos que se llevan a cabo en el organismo vivo sólo puede realizarse con la velocidad precisa si están presentes uno o varios catalizadores estos catalizadores son las enzimas, que también se encuentran en las levaduras. (Jörgense, 1979)

Las enzimas que se hallan en las levaduras comprenden al menos tres grupos diferentes:

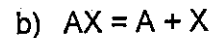
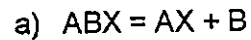
1. Las relacionadas con la respiración
2. Las relacionadas con la escisión de azúcares hasta el grado de hexosa
3. Las relacionadas con la fermentación

Las enzimas catalizan los cambios químicos complejos que tienen lugar en las soluciones nutritivas de azúcar. El que un carbohidrato sea o no fermentado depende de la naturaleza de las enzimas elaboradas por la levadura, siempre que sean favorables las condiciones para la fermentación y desarrollo. (Jörgense, 1979)

La reacción entre una molécula de catalizador X y una molécula de sustrato AB (por sustrato se entiende la sustancia sobre la cual actúa el catalizador) se podría desarrollar de la siguiente forma:



ó



Después de librarse X del sustrato puede continuar reaccionando con otras moléculas AB. Esto explica que muy pequeñas cantidades de catalizador son suficientes para influir sobre un proceso.

En algunos casos las enzimas están ligadas a las células y entonces se llaman **endozimas**; otras enzimas son excretadas por la célula, llamándose en este caso **exoenzima**.

Las enzimas se clasifican según sus acciones en: **hidrolasas** y **desmolasas**. Las **hidrolasas** originan la incorporación de agua y el desdoblamiento de la molécula de sustrato (hidrólisis). Las **desmolasas** tienen la propiedad de romper o formar cadenas de carbono; además éstas juegan un papel muy importante en los procesos de fermentación ya que son enzimas "oxidante", es decir que catalizan la separación de hidrógeno.

Las desmolasas pueden a su vez dividirse en: **oxidasas** y **deshidrogenasas**, y de las deshidrogenasas más importantes tenemos a la coenzima I o mejor conocida como cozimasa. (Jörgense, 1979)

II.3.3 COZIMASA

La cozimasa es una coenzima portadora de hidrógeno, la cual recoge dos átomos de hidrógeno para formar dihidrocozimasa y cederlos más tarde. Obra como un intermediario

entre dos apodehidrasas en el transporte de hidrógeno desde el sistema donador (gliceraldehido, ácido fosfórico- ácido fosfoglicérico) al sistema aceptor (acetaldehido - alcohol etílico) en la fermentación del etanol.

II.3.4 FACTORES QUE AFECTAN LA ACCIÓN ENZIMÁTICA

Los factores que influyen en alto grado sobre la acción enzimática son: la temperatura y el pH.

La influencia de la temperatura y del pH se encuentra representado por la figura 2.2 en la cual el curso de la curva se debe a que la enzima se inactiva con velocidad creciente al aumentar gradualmente la temperatura. En la rama ascendente, la inactivación es rebasada por la acción enzimática acelerada debido al aumento de la temperatura. En la rama descendente sucede lo contrario.

En cuanto a la curva de pH, el curso de la misma se debe a que la acción enzimática solo se realiza en el punto isoeléctrico de la proteína enzimática. En el punto óptimo de la escala de pH son isoeléctricos el 100% de la enzima, es decir, que la proteína confiere el mismo número de cargas positivas que negativas. Fuera de esta zona, se trata de mezclas activas e inactivas de proteínas enzimáticas.

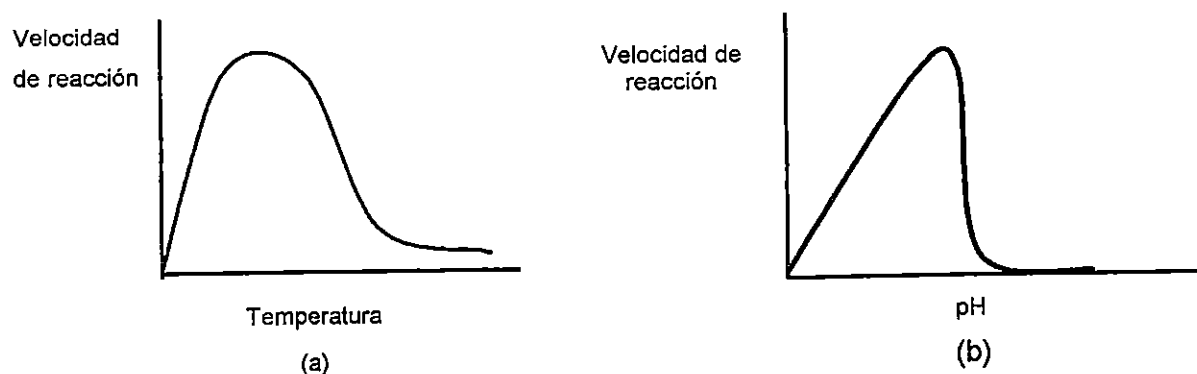
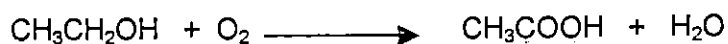


figura 2.2. Influencia de la temperatura (a) y pH (b) en la velocidad de reacción enzimática. (López Escobar, 1978)

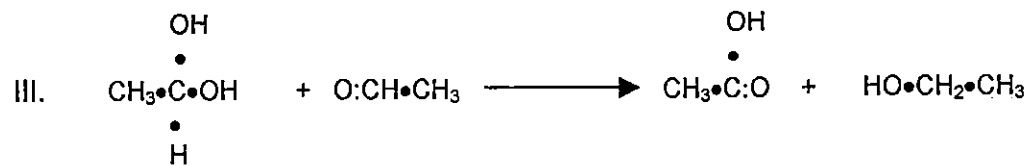
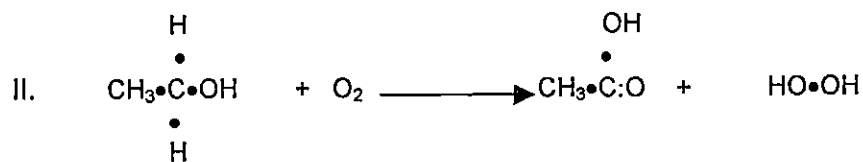
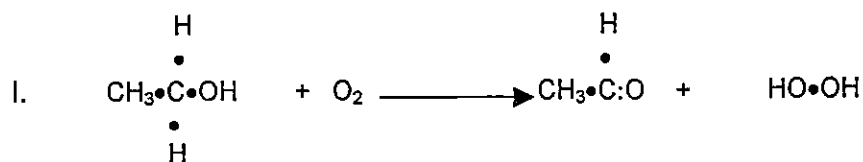
La inactivación térmica es irreversible, desnaturizándose la proteína. La inactivación por pH es reversible (se altera la acción enzimática al variarse el pH), debiendo añadirse que las alteraciones extremas de pH pueden inactivar la enzima de forma irreversible, es decir, desnaturizar la proteína. (Jörgense, 1979)

II.4 ACETIFICACIÓN

Esta fermentación consiste en la oxidación del alcohol etílico o azúcar a ácido acético. Los microorganismos que originan la fermentación acética son ante todo bacterias de ácido acético: *Acetobacter aceti*, *Xylinum*, *Schuezenbachii*, etc., otras bacterias acidógenas (que, sin embargo, forman ácido acético como producto secundario, a partir de carbohidratos) y por último varios hongos, como el *Rhizopus*, *Aspergillus* y otras especies al igual que a partir de hidratos de carbono. La ecuación de formación de ácido acético se transcribe así:



La fermentación se realiza a través del acetaldehído como producto intermedio y bajo la formación de oxigenada:



I y II tienen lugar en condiciones aerobias. Mientras que III, en la cual intervienen mutasas en la transformación de dos moléculas de acetaldehído (una de ellas en forma de hidrato) en alcohol y ácido acético, se realiza en condiciones anaerobias.

La propiedad fisiológica más característica de las bacterias acéticas es su capacidad de oxidar el alcohol etílico a ácido acético; de este proceso obtienen la energía precisa para la actividad vital.

El proceso descrito es fuertemente aerobio porque el oxígeno del aire tiene que actuar como aceptor del hidrógeno escindido por el alcohol etílico, bajo condiciones anaerobias, las bacterias acéticas pueden transformar el acetaldehído en ácido acético y etanol.

II.4.1 BACTERIAS ACETIFICANTES

En el manual Bergey's se encuentra una clasificación amplia de las bacterias la cual constantemente se está actualizando. Este manual clasifica las bacterias acéticas de la siguiente forma:

Clase:	<i>Schizomycetes</i>
Orden:	<i>Pseudomanadales</i>
Sub-orden:	<i>Pseudomonadineae</i>
Familia:	<i>Pseudomonadaceae</i>
Género:	<i>Acetobacter</i>

(Díaz, et al 1991) .

La propiedad característica de las bacterias acéticas es su capacidad de oxidar el etanol a ácido acético. Este género de microorganismos produce oxidación en un medio ácido (pH de 4.5 o menor). (Figueroa. et al 1994)

Esta tolerancia ácida es esencial para que un organismo produzca grandes cantidades de ácido. El nombre del género *Acetobacter* fue empleado originalmente para abarcar el grupo completo de las bacterias ácido acéticas, pero ahora está claro que las bacterias así

definidas son un grupo heterogéneo que comprende tanto microorganismos con flagelo peritrico como polar.

Los organismos con flagelo polar se relacionan con las pseudomonas, en las que difieren principalmente en su tolerancia ácida y su incapacidad para realizar una oxidación completa de los alcoholes. Estos organismos se clasifican en la actualidad en el género ***Gluconobacter***, algunas de sus características se presentan en el cuadro 2.3. (Brock, 1987).

El género ***Acetobacter*** comprende los organismos con flagelo peritrico; no tienen relación definida con otros bacilos gramnegativos. Además de su flagelación, *Acetobacter* difiere de *Gluconobacter* en que es capaz de oxidar además el ácido acético para formar CO₂.

Esta diferencia en la capacidad para oxidar ácido acético se relaciona con la presencia del ácido cítrico. *Gluconobacter*, que carece de un ciclo de ácido cítrico, es incapaz de oxidar ácido acético, mientras que el *Acetobacter* que tiene el ciclo puede oxidarlo. Los *Gluconobacter* se denominan en ocasiones oxidantes bajos, y los *Acetobacter*, sobreoxidantes.

El *Acetobacter* no forma esporas, y frecuentemente es móvil. Su forma general es de bastones cortos, que pueden formar cadenas. Las células jóvenes son gram-negativas, pero en cultivos más viejos, algunas se transforman en gram-variable. Son estrictamente aeróbicas y los valores de pH máximo soportable por ellas es de 7.0 a 8.0 y su pH óptimo es de 5.4 a 6.3. Sus especies se dividen en dos grupos:

- Los que no oxidan al ácido acético que son los pertenecientes al genero de las gluconobacterias: *Acetobacter melanogenum*, *Acetobacter rosem*, *Acetobacter suboxydans* y *Acetobacter oxydans*. (Saca Kury, 1980)
- Los que oxidan al ácido acético y lo transforman en dióxido de carbono y agua, que pertenecen a las acetobacterias, entre los que tenemos a los microorganismos que presenta los cuadros 2.1.a, 2.1.b y 2.2.

Cuadro 2.2. Características de desarrollo de las bacterias acéticas.

Bacteria acética	Temperatura mínima de desarrollo	Temperatura óptima de desarrollo	Temperatura máxima de desarrollo	% de alcohol máximo soportado	% de ácido acético producido
<i>Acetobacter aceti</i> (Hansen)	4°C - 5°C	34°C	42°C	11	6.6
<i>Acetobacter pasteurianum</i> (Hansen)	5°C - 6°C	34°C	42°C	9.5	5.2
<i>Acetobacter kuzingianum</i> (Hansen)	6°C - 7°C	34°C	42°C	9.5	6.6
<i>Acetobacter schutzenbachii</i> (Henneberg)	7.5°C	28.33°C	37°C	7	11
<i>Acetobacter xylinum</i> (Brown)	8°C	30°C	36°C	6 - 7	4.5

(Figuroa. et al 1994)

A continuación, en el cuadro 2.3, se presentan las características de diferenciación de los géneros *gluconobacter* y *acetobacter*.

Cuadro 2.1.a. Características de cada especie acética

Bacteria acética	Coloración con yodo	Enturbian el caldo	Reacción a la celulosa	Reacción a la catalaza	Formación de células anormales	Para producir ácidos ataca:	Oxidan el alcohol
<i>Acetobacter aceti</i>	-	-	-	+	+	Glucosa, glicerina	+
<i>Acetobacter pasteriaum</i>	+	-	-	+	++	Glucosa	+
<i>Acetobacter kuttingianum</i>	+	++	-	+	+	Glucosa	+
<i>Acetobacter schuetzenbachii</i>	+	+	+	+	-	Todos los azúcares	+
<i>Acetobacter Rancens</i>	-	Muy escaso	-	+	+		-
<i>Acetobacter xylinum</i>	-	-	+	+	-		+

(Pereira, et al 1976)

Cuadro 2.1.b. Características de cada especie acética

Bacteria acética	Formación de película	Tipo de película que forma	Forma de la bacteria	Movilidad	Formación de cadenas
<i>Acetobacter aceti</i>	++	Lisa, mucosa	Bacilos cortos un poco aplanados por el centro	-	+
<i>Acetobacter pasteriaum</i>	+	Encrespada, rugosa	Bacterias más gruesas que la anterior	-	+
<i>Acetobacter kuttingianum</i>	+	Rugosa	Bacilos	-	-
<i>Acetobacter schuetzenbachii</i>	+	Poco densa y resistente	Variada	-	+
<i>Acetobacter Rancens</i>	+	Seca y rugosa		-	+
<i>Acetobacter xylinum</i>	++	Sucesivas membranas grasas	Filamentosas, globosas	-	+

(Figuroa. et al 1994)

Cuadro 2.3. Características de diferenciación de los géneros *Gluconobacter* y *Acetobacter*.

	<i>Gluconobacter</i>	<i>Acetobacter</i>
Flagelos	Polar	Peritrico
Crecimiento a pH 4.5	+	+
Oxidación a pH 4.5 de etanol a ácido acético	+ (moderado)	+ (fuerte)
Oxidación de ácido láctico a CO ₂	-	+
Ciclo de Krebs	-	+
Producción de 5-Cetogluconato	+	Débil
Cetogénesis	+	Débil
Quinonas: Q10	+	-
Q9	-	+
Hidrólisis de lactosa y almidones	-	-
Hidrólisis de gelatina	Débilmente negativa	-
Hidrólisis de pigmentos verduscos y/o fluorescentes	-	-
DNA (%mol G + C)	55 - 64	60 - 64

(Figuroa. et al 1994)

III GENERALIDADES SOBRE EL VINAGRE

El CODEX ALIMENTARIUS define el vinagre como "un líquido apto para el consumo humano, producido exclusivamente con productos idóneos que contengan almidón o azúcares, o almidón y azúcares, por el procedimiento de doble fermentación, alcohólica y acética". A continuación se hace una descripción de su historia, los diversos métodos para fabricarlo, y los métodos de preparación para el mercado.

III.1 HISTORIA

Hasta principios del siglo XIX el único método de obtener vinagre era el método espontáneo de acidificación del vino ("Vin aigre"). En 1864 Pasteur descubrió que el vinagre era producido por unos microorganismos, "mycoderma aceti". Pasteur sugirió mejoras en el proceso de obtención del vinagre, en lo que se denomina Método Orleans o Método Pasteur, en el que se llenan toneles de madera con vino y vinagre en la misma proporción. A medida que se acidifica y se produce vinagre, se retira parte y se rellena con más vino.

Este método es lento (2-6 semanas) y presenta muchos riesgos, ya que el proceso es difícil de controlar y se puede contaminar con otros microorganismos no deseados que pueden convertir el alcohol en carbónico y agua en vez de acético.

En 1823 Schuetzenbach inventó el Método rápido para la obtención de vinagre. El método consistía en una batería de barriles apilados, cada uno de ellos con un doble fondo perforado y lleno de virutas de madera, donde se asentarán las bacterias acéticas. La base del tonel está perforada por debajo del doble fondo, permitiendo al aire entrar y difundir a través de las virutas. Por la parte superior del barril se alimenta, lentamente, el producto alcohólico. Dicho producto va percolando a través de la viruta y, al llegar a la parte inferior del barril, fluye por los orificios y cae al barril siguiente. En cada paso se aumenta el % de acético en 1-2%.

Más recientemente se utilizó el sistema de Cultivo Superficial en el que el vinagre se elabora en reactores en los que se controla la temperatura, suministro de aire y flujo de producto. La reacción de fermentación ocurre en la superficie del líquido. El tanque se llena con virutas o con otros materiales que tengan gran superficie y que actúan como filtro. El vinagre recircula desde el fondo del reactor hasta su superficie por medio de una bomba. En la superficie es añadido al reactor en forma de ducha. Durante el proceso de recirculación el vinagre se enfría para mantener constante la temperatura interior del reactor. El tanque está cerrado y la entrada de aire se regula por una válvula desde la parte inferior del tanque. Cada cierto tiempo (1-2 años) hay que cambiar el material de filtrado pues se ocluye por formación de limos. Otro inconveniente de este sistema es su bajo rendimiento (0,5-0,7 de acético en 24 horas) y el tamaño de la instalación. Las ventajas son que se trata de un sistema poco sofisticado y que produce vinagre de buena calidad.

Otro método es el de Cultivo Sumergido. En este caso la fermentación se produce en toda la masa de líquido a la vez, no sólo en su superficie y, por lo tanto, no se requiere material de filtración. El aire se suministra por una turbina situada en el fondo del reactor y que produce turbulencias en la masa líquida. La ventaja de este método es que es fácilmente controlable y la producción es alta (4-6% de acético en 24 horas).

Tras cualquiera de los métodos modernos y rápidos de obtención de vinagre se precisa una maduración, preferiblemente en madera, para mejorar el aroma. Posteriormente el vinagre se estandariza, filtra y pasteuriza. Algunas veces se añade sulfuroso para su conservación.

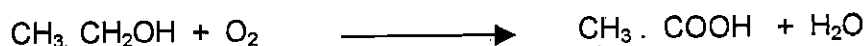
El vinagre es un condimento fabricado a partir de materiales azucarados o amiláceos mediante dos etapas:

1. Fermentación del azúcar para producir alcohol etílico
2. Oxidación del alcohol a ácido acético

La primera etapa es un proceso anaerobio efectuado por las levaduras naturalmente presentes en la materia prima o, preferiblemente, cultivos añadidos que son casi siempre blastomicetos, de la familia de las *Saccharomycetáceas* (levaduras) interviniendo también algunas *Mucedináceas* del género *Torulopxis* (universalmente designadas con el nombre

colectivo de Tómulas) y a veces algunos Eumicetos de los géneros *Mucor*, *Rhizopus*, *Endomyces*, *Aspergillus*... etc. que en condiciones anaerobias producen fermentación alcohólica débil. En conclusión las verdaderas levaduras alcohólicas son siempre de la familia de las *Saccharomycetáceas*, específicamente la *Saccharomyces cerevisiae* variedad *ellipsoideus*, quien produce grandes cantidades de alcohol.

Si se abandona una bebida alcohólica, no excesivamente rica en alcohol y en condiciones de aerobiosis, a temperaturas no muy bajas, pronto se producen en su superficie velos microbianos que pueden estar constituidos en un principio por blastomicetos, como los *Mycoderma*, y menos frecuentemente por otras levaduras, pero a la larga y muy pronto si la temperatura se conserva entre 25 y 30 °C, estos microorganismos son dominados por una flora esquizomicética de bacterias, llamadas acetificantes, que también son susceptibles de originar velos, de muy diferentes aspectos, cuya propiedad más importante es la de oxidar incompletamente al alcohol etílico, con producción de ácido acético, según el esquema.



En esta reacción se produce acetaldehído como compuesto intermedio. Entre los diversos productos finales se hallan pequeñas cantidades de aldehídos, ésteres, acetonas, Etc.

La naturaleza del proceso de acetificación de los líquidos alcohólicos fue puesta en claro por Pasteur que aisló de mezclas de vino aguado y vinagre un microorganismo al que denominó *Mycoderma aceti*, bacteria de 0.5-1μ a 1-1.5μ de longitud, un poco estrechas en la parte media en forma que recuerda algo a la del cacahuate.

Estudios posteriores de Hansen, Brown y otros autores demostraron que el mal llamado fermento acético de Pasteur no era el único capaz de la acción acetificante del alcohol etílico y que las bacterias acetificantes forman un grupo constituido por diversas especies. En conjunto se trata de bacterias o bacilos cortos, algunos casi coccus aislados, en diplos, o frecuentemente en cadenas, que forman velos de diversos aspectos (coloreables o no por el yodo, gruesos o finos, más o menos plegados, mucosos o secos, coherentes o frágiles... etc.) sobre los líquidos alcohólicos.

III.2 SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE VINAGRE

Básicamente existen dos sistemas de fermentación: el de cultivo superficial y el de cultivo sumergido, a continuación se describen los diferentes tipos con sus características, ventajas y desventajas:

III.2.1 MÉTODOS DE CULTIVO SUPERFICIAL:

III.2.1.1 Método Orleans (1864):

En este método se utiliza vino o sidra, los cuales se fermentan en barriles de madera o en cubas pequeñas cubiertas; el aire circula por unos agujeros situados en la parte superior y en los lados por encima del nivel del líquido. Se utiliza un barril en el cual se introduce una carga inicial de volúmenes iguales de vinagre fresco y la fermentación se desarrolla hasta que la acetificación se completa. Entonces se sacan tres cuartas partes del vinagre y se sustituyen por vino fresco. El proceso se repite tantas veces como sea posible mientras se saque un buen vinagre.

Los fallos en la producción de un buen vinagre se deben generalmente a la sustitución gradual de los tipos adecuados de bacterias de vinagre por otros microorganismos, incluyendo algunas especies de las mismas bacterias de vinagre, que oxidan el ácido acético a dióxido de carbono y agua. El método Orleans es lento y sólo puede realizarse en recipientes pequeños. El vinagre así obtenido tiene un aroma y olor superiores, debido a que las condiciones en que se produce la conversión del alcohol a ácido acético permiten la acumulación de grandes cantidades de productos de reacciones laterales que conducen a productos como el acetato de etilo y la acetoina. Este vinagre se reserva generalmente para uso de mesa. Este método puede aplicarse a la escala doméstica.

Aspectos negativos del proceso:

- Lento (2-6 semanas)
- Fácilmente alterable
- Se forma dióxido carbónico y agua.

III.2.1.2 Método de virutas o método rápido:

La fermentación se realiza en un generador de vinagre, que es un recipiente compuesto de dos cámaras: la superior, de mayor capacidad se rellena hasta unos 20 cm. de la tapa con materiales sólidos de gran superficie. Las virutas de madera de haya se prefieren para la producción de vinagre destilado, y las de maíz o el coque se destinan a la producción de vinagre de vino, de sidra o de azúcar. La cámara superior se separa a través del material de relleno y escapa por la parte superior del generador. El líquido en fermentación se distribuye de manera intermitente desde la parte superior del relleno, efectuando una percolación a través de la masa; se recoge después en la cámara inferior, desde donde es bombeado a la parte superior, y se vuelve a recircular hasta que el contenido porcentual en alcohol se reduce a la mitad. El vinagre formado se retira y se añade una solución alcohólica nueva. Este proceso se repite hasta que los lodos de bacterias o la contaminación dan como resultado un rendimiento en ácido acético reducido o una baja producción.

Existen variaciones del método de virutas como los que se describen a continuación:

Proceso rápido de Schnetzenbach (1823)

En este método se utiliza una batería de toneles de madera derechos con falsos fondos perforados y llenos hasta el borde con virutas de madera (o zarcillos de la vid) que actúan como soporte de los microorganismos. Bajo el falso fondo del tonel se hacen pequeños agujeros por donde penetra el aire a través de las virutas. El vinagre avanza goteando de tonel en tonel a través de los agujeros. En cada paso aumenta un 2 % la acidez. Arriba del primer tonel una artesa de madera va dosificando pequeñas cantidades de vino.

Proceso moderno:

Una modificación de este método es la utilización de un aspersor plástico en un rotor para mejor reparto. El líquido alcohólico se hace recircular con una bomba y un tubo refrigerado. El recipiente donde se efectúa la acetificación es cerrado, pero existe una entrada de aire. Se controlan el flujo de aire y la temperatura del mismo, con el fin de mantener vivos a los

microorganismos, el aire circula del fondo del recipiente hacia arriba, y como material de relleno se usan materiales de gran superficie como tusas en lugar de virutas.

Aspectos negativos del proceso:

- Hay una pérdida de materias volátiles de un 10%. Con lo que se pierde el olor característico y agradable del vinagre.
- El material de soporte se contamina con el tiempo.
- El material de soporte se debe reemplazar anualmente.
- El nuevo material tarda tiempo en acondicionarse.
- El proceso de acondicionamiento es lento (7-10 días)

III.2.2 MÉTODO CONTINUO O DE FERMENTACIÓN SUMERGIDA

La producción de vinagre por fermentación sumergida ha experimentado un considerable desarrollo mediante el empleo de acetificadores ("acetators") capaces de transformar hasta 600 litros de alcohol absoluto en 24 horas. Como sustrato suele emplearse una mezcla de vinagre y algún otro material, así como alguna fuente adicional de carbono y nitrógeno.(Sánchez, 1961)

El empleo de un sistema de incorporación de aire en el generador ha hecho posible la producción de vinagre en continuo; con un rendimiento de 98%. En realidad, es un método de fermentación sumergida. El aire que entra a través de un agujero situado en el eje cuando la velocidad del rotor excede de un valor predeterminado. La mezcla íntima aire-líquido producida por la acción del rotor circula hacia las paredes del tanque antes de subir. Cuando alcanza la superficie del generador, el líquido se recircula bajando por el tubo de drenaje y combinándose con el aire. La fermentación produce un aumento en la temperatura que se regula mediante tubos de refrigeración.

Los acetificadores se construyen tanto de acero inoxidable como de madera, siempre que en este último caso todos los ajustes sean del primer material o de plástico. Están provistos de un buen sistema de aireación que además hace elevar la temperatura a 30°C que se

mantienen durante toda la fermentación mediante un control automático por termostato. El aparato lleva además un orificio superior por donde penetra, mediante bomba impelente, el líquido por fermentar; un tubo de salida en la parte inferior; un rotámetro y un dispositivo mecánico para destruir la espuma. (Sánchez, 1961)

Como inóculo se emplean las bacterias propias del vinagre o bien alguna cepa especial. A las 3 o 10 horas de operación, la intensidad de la fermentación se duplica, dependiendo de la concentración de ácido acético y alcohol en el sustrato. Cuando la concentración de alcohol es prácticamente cero, se suspende la fermentación y se recoge la mitad como pie de cuba para la siguiente fermentación. (Sánchez, 1961)

El rendimiento teórico debe ser de 1.036 kilos de Acido acético y 313 gramos de agua por litro de alcohol absoluto, o sea que la concentración máxima del vinagre es de 10%. Se sabe que 1% en volumen de alcohol produce 1% en peso de ácido acético. (Sánchez, 1961)

III.3 FACTORES ESENCIALES DE COMPOSICIÓN Y CALIDAD DEL VINAGRE

Todo producto antes de ser elaborado tiene una serie de requerimientos que los harán característico, el CODEX alimentarius da una serie de características que debe reunir una solución que contenga ácido acético para que pueda ser considerado vinagre.

III.3.1 MATERIAS PRIMAS

Las materias primas utilizadas o permitidas en la fabricación de vinagre son las siguientes:

- Productos de origen agrícola que contienen almidón, azúcares o almidón y azúcares, especialmente, pero no sólo de frutas, bayas, cereales en grano, cebada malteada, suero, miel.
- Vino de uvas, de frutas o bayas, de sidra.
- Alcohol destilado de origen agrícola.
- Alcohol destilado de origen silvícola.

III.3.2 INGREDIENTES FACULTATIVOS

Podrán añadirse al vinagre los ingredientes siguientes, en las cantidades necesarias para conferir al producto un aroma característico:

- Plantas, en particular hierbas aromáticas, especias y sus partes o extractos aptos para aromatizar.
- Suero
- Zumos (jugos) de frutas, o su equivalente de zumos concentrados de frutas.
- Azúcares
- Miel
- Sal de calidad alimentaria

III.3.3 CONTENIDO TOTAL DE ACIDO

- VINAGRE DE VINO: 60 gramos como mínimo, por litro (calculado como ácido acético).
- OTROS VINAGRES: 50 gramos como mínimo por litro (calculado como ácido acético).
- TODOS LOS VINAGRES: no más de la cantidad obtenible por fermentación biológica.

III.3.4 CONTENIDO DE ALCOHOL RESIDUAL

0.5 % v/v, como máximo, excepto en el vinagre de vino, que podrá ser del 1% v/v.

Para ver en forma detallada pruebas a realizar para determinar la calidad del vinagre, ver anexo B, donde se explican los análisis de calidad más importantes a realizar al vinagre.

III.4 PREPARACIÓN PARA EL MERCADO

Como todo producto que estará destinado a la comercialización y consumo posterior el vinagre debe de pasar por una serie de procesos que lo harán apto para permanecer en el mercado mientras es comprado o consumido y además le dará las características propias de cada fabricante.

III.4.1 CLARIFICACIÓN

La composición del vinagre depende del material utilizado en su fabricación. Los vinagres procedentes de frutas y licores malteados poseen reminiscencia del aroma de éstos materiales. También influye poderosamente el método de fabricación. Los vinagres elaborados por los métodos lentos son menos ásperos que los fabricados por los métodos rápidos (como la fermentación sumergida) porque durante su procesamiento han envejecido. El cultivo sumergido presenta mayor turbidez que los hechos por métodos de acetificación superficial, por lo que necesitará una clarificación previa a ser lanzado al mercado.

El vinagre debe ser muy claro; se clarifica mediante filtración y refinado, que consiste en la decantación de los materiales en suspensión añadidos. Gran parte del vinagre que en la actualidad se vende en el mercado es vinagre previamente pasteurizado, en masa, o en botellas. El tiempo y la temperatura del proceso de pasteurización son variables, a veces se emplean temperaturas de 60 a 65°C durante unos cuantos segundos.

Los métodos de clarificación pueden ser:

- **Autoclarificación:** que es un método lento, ya que se realiza por decantación. Y se precisa tener grandes cantidades de vinagre almacenado.
- **Clarificación físico-química:** que consiste en la formación complejos coloidales por adsorción, donde se agregan agentes clarificantes que forman coloides con los materiales a eliminar. Que son sustancias clarificantes, que forman coloides en la

sustancia, éstos a su vez grumos insolubles que caen al fondo del recipientes, los cuales pueden separarse del resto del producto.

Los clarificantes físico-químicos pueden ser:

- a) **Orgánicos:** son eficaces pero alteran la composición, además si se agregan en exceso también pueden generar un desequilibrio en la composición del vinagre. Los más utilizados son la gelatina, albúmina de huevo o de sangre y el Caseinato de potasio.
- b) **Inorgánicos:** forman un gel que atrapa las partículas, son buenos para atrapar proteínas. Los más utilizados son la Bentonita y Gel de sílice.
- c) **Mixtos**

III.4.2 FILTRACIÓN

Si el proceso de filtración es adecuado se ahorra el posterior proceso de estabilización.

Los tipos de filtración aplicados son:

- Desbaste : se realiza tras la clarificación y se utilizan partículas 10 micras.
- Abrillantamiento [Filtrado]: se realiza cuando se diluye el ácido acético y se ajusta la acidez con agua, se utilizan 1-10 micras. Se hace antes de embotellar.
- Esterilizante [Ultrafiltración]. Se utiliza celulosa o tierra de diatomeas de diferente porosidad.

La fuerza del vinagre se expresa en gramos, de decir diez veces el número de gramos de ácido acético por 100 ml de vinagre.

El rendimiento depende de los factores:

- viscosidad y tipo de impurezas.
- tamaño del poro de la celulosa o tierras diatomeas utilizadas para la filtración.
- presión de filtración.

III.4.3 ENVEJECIMIENTO

Antes de ser embotellado para la distribución como condimento, el vinagre se bombea del tanque que lo recibe en el generador a depósitos donde se guarda para que envejezca. Durante el envejecimiento y almacenaje, debe protegerse del aire, pues éste favorece el crecimiento de bacterias del ácido acético, la formación de la madre del vinagre y la pérdida de ácido acético por oxidación.

El período de almacenaje necesario para producir un vinagre suave sazonado varía con la fuente de la matriz del vinagre, las condiciones de acetificación, el tamaño y el tipo de los recipientes de almacenamiento. Durante este período, se esterifica el alcohol etílico residual por el ácido acético y otros ácidos orgánicos.

Los recipientes de almacenamiento deben mantenerse bien llenos para evitar la oxidación del ácido acético por las bacterias del vinagre a dióxido de carbono y agua, lo que puede ocurrir con vinagres de 6% de ácido acético o menor contenido. Los vinagres aromatizados con hierbas y especias se obtienen por formulación cuidadosa y se envejecen para obtener sabores más estables y más deseables.

III.4.4 PRACTICAS PERMITIDAS EN LA FABRICACIÓN DE VINAGRE

- Esterilización o Pasteurización
- Dilución con agua para obtener el grado adecuado.
- Filtración
- Clarificación: Gelatina, taninos, infusorios, bentonitas.
- Decoloración
- SO₂ hasta el límite permitido (250 mg/l)
- Facilitar la acetificación en extractos malta o levaduras, fosfatos o sales de aluminio.
- Cultivos acéticos
- Colorante: caramelo de mosto

(Rojas y Trequear, 1998).

IV ETAPA EXPERIMENTAL PARA LA PRODUCCIÓN DE VINAGRE A PARTIR DE AGUA DE COCO.

En esta etapa se describen los experimentos realizados para la producción de vinagre de agua de coco, ya que tal como se describió anteriormente la producción de vinagre consta de dos etapas: fermentación alcohólica, seguida de acetificación de la solución alcohólica producida.

Para que puedan darse ambas etapas es necesario establecer ciertas condiciones de trabajo pues que se está trabajando con microorganismos que necesitan hábitats especiales para crecer, reproducirse y desarrollar los procesos biológicos requeridos para la producción en la producción vinagre.

Inicialmente es necesario establecer el tiempo óptimo para realizar la etapa de producción alcohólica, en donde es necesario alcanzar una concentración en alcohol de 7% p/v. Una vez establecido el tiempo requerido para llegar a las condiciones idóneas en donde las bacterias acéticas puedan se puedan desarrollar se estudiarán diferentes modelos para la etapa de acetificación, a partir de esta parte se elegirá el modelo que genere un mayor rendimiento en ácido acético y luego se variarán condiciones de siembra de bacterias acéticas para poder establecer si al variar éstas la producción se ve afectada. Finalmente, y como un complemento de la etapa experimental se establece qué tipo de bacterias son las que se encuentran presentes en la producción de ácido acético, a partir de agua de coco, ya que pueden encontrarse bacterias del género *Acetobacter* o *Gluconobacter*, pues ambas producen ácido acético.

IV.1 ETAPA DE PRODUCCIÓN ALCOHÓLICA

Para producir vinagre es necesario contar con una solución alcohólica previa, sea proveniente de vino de frutas o cualquier otra sustancia fermentable. En esta etapa se tiene por objetivo determinar el tiempo de fermentación necesario para alcanzar las condiciones

óptimas de concentración alcohólica para luego proceder a la siembra de organismos acéticos.

Debido a que el agua de coco maduro no sobrepasa una concentración de azúcar mayor a los 5° Brix, y la concentración óptima necesaria para que las levaduras produzcan alcohol es de 16° Brix al agua de coco se le agregó dulce de panela para alcanzar las concentraciones de azúcares necesarias como fuente de carbono para las bacterias acéticas.

Se optó utilizar dulce de panela como regulador de los grados Brix por las siguientes razones:

1. El dulce de panela posee azúcares que se encuentran desdobladas, es decir que es más fácil para las bacterias digerir los azúcares simples que los que se encuentran enlazados como la sacarosa.
2. En este caso actúa como un colorante, ya que el color caramelo natural genera un aspecto agradable al vinagre producido.
3. Tiene un costo menor que el azúcar de mesa y es más accesible para las personas a las que va dirigido este experimento.

En el anexo C se describen algunas propiedades del dulce de panela.

A continuación se describe la forma en que se llevó a cabo el monitoreo de la producción alcohólica en muestras de agua de coco.

IV.1.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras se prepararon de la siguiente manera:

1. Se utilizó el agua de cocos maduros con un grosor promedio de 1.5 cm. de copra (que es el grosor aproximado de la copra para obtener aceite), se mezcló en un solo recipiente y se procedió a medir el valor de pH y grados Brix, cuyos valores respectivos fueron 5.5 y 5.

2. Se regularon los grados Brix de la mezcla de agua de los diferentes cocos para llevarla hasta las condiciones óptimas para la producción alcohólica, para lo que se agregó dulce de panela hasta obtener agua a 16° Brix.
3. Se depositaron cantidades iguales de agua de coco en recipientes previamente esterilizados, para evitar la invasión de algún microorganismo no deseado, agregándose 500 ml de agua en cada uno.
4. Se adicionó levadura *Saccharomyces cerevisiae*, de uso en panadería, en proporción de 1 gramo de levadura por litro de agua de coco, es decir, se agregaron 0.5 gramos a cada recipiente.
5. Los recipientes fueron puestos a fermentar en condiciones anaerobias, dejando sólo un pequeño agujero por donde se hace pasar una manguera para **liberar el CO₂** producido durante la fermentación alcohólica. La manguera es conectada a un recipiente que contiene una solución antiséptica. En esta ocasión se utilizó lejía comercial.

IV.1.2 MEDICIÓN DEL PORCENTAJE DE ALCOHOL EN LAS MUESTRAS

Las muestras se dejaron fermentar durante 5 días, en los que se midió la cantidad de alcohol producida, las determinaciones de la cantidad de alcohol se realizaron por Cromatografía de Gases. Las mediciones fueron hechas en el Laboratorio Químico de Geotérmica Salvadoreña, S.A. de C.V.

El equipo utilizado fue el Sistema Cromatográfico de **Gases Hewlett Packard 6890** con detector selectivo de masas **Hewlett Packard 5973**.

Se trabajó bajo las siguientes condiciones:

- Horno: temperatura inicial 50°C; temperatura final 250°C
- Gas de arrastre: Helio grado investigación
- Inyector Split

- Columna capilar: Hewlett Packard plot Q (Divinylbenzene / Styrene Polymer) de flujo constante.
- Volumen de inyección: 1.0 microlitros.

IV.1.3 RESULTADOS DE LA ETAPA DE PRODUCCIÓN ALCOHÓLICA.

Las mediciones de la producción alcohólica se realizaron durante 5 días, en los cuales se determinaron los grados Brix y la concentración en cada una de las muestras, los resultados se presentan en el cuadro 4.1.

Cuadro 4.1. Resultados del monitoreo de producción alcohólica en muestras de agua de coco acondicionadas.

DÍA	Muestra	1	2	3	Promedio
1	°Brix	15.50	15.00	15.50	15.33
	% de alcohol	2.52	2.55	2.56	2.54
2	°Brix	11.00	11.00	11.00	11.00
	% de alcohol	7.02	7.12	7.24	7.13
3	°Brix	8.00	8.50	8.25	8.25
	% de alcohol	8.13	8.57	7.99	8.23
4	°Brix	7.00	7.75	7.50	7.42
	% de alcohol	10.17	11.23	11.13	10.84
5	°Brix	6.65	7.70	7.00	6.83
	% de alcohol	9.56	10.11	10.42	10.03

Los cromatogramas de los análisis se encuentran en el anexo D. Donde también se encuentran las condiciones de trabajo para el método de determinación de alcohol por Cromatografía.

En la figura 4.1. se presentan gráficamente los resultados obtenidos durante la fermentación alcohólica.

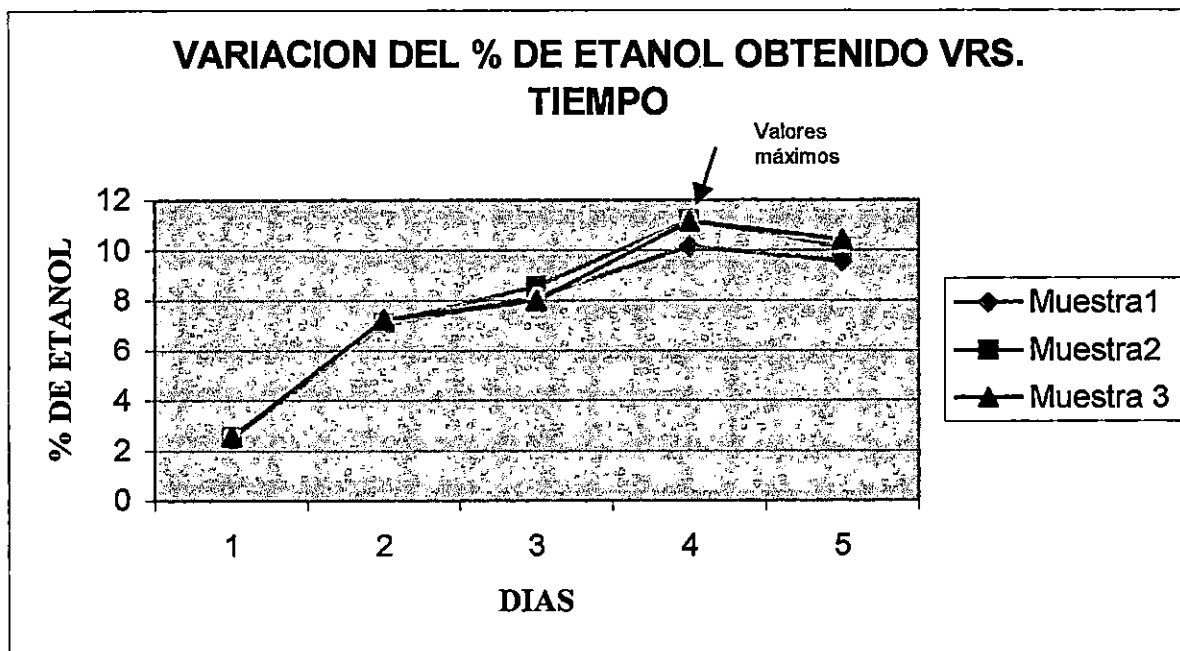


Figura 4.1. Resultados de la producción alcohólica.

En este gráfico se observa claramente que el comportamiento de las diferentes réplicas es similar, lográndose una concentración máxima de alcohol el día número 4, donde se alcanza una producción promedio de 10.84% p/v de alcohol en las soluciones, que podría ser aprovechado para luego diluir y llevar hasta la concentración de alcohol necesario para la siembra de microorganismos acéticos que es de 7%.

Para el presente experimento y con la finalidad de facilitar el método de producción de vinagre se decidió sembrar el *Acetobacter Sp.* en la solución alcohólica en el segundo día de fermentación, ya que ese día se alcanza la concentración alcohólica aproximada a 7% p/v, que es la concentración requerida por los microorganismos para poder desarrollarse y transformar el alcohol a ácido acético.

En el anexo E se presenta la mejor tendencia para los resultados obtenidos en la etapa de producción alcohólica.

IV.2 DETERMINACIÓN DEL MÉTODO A UTILIZAR PARA LA ACETIFICACIÓN

Una vez establecido el día para la siembra de los microorganismos acéticos es necesario establecer el método por el cual se realizará la siguiente etapa de producción en la fabricación de vinagre, que es la etapa de acetificación. Como se ha mencionado anteriormente existen diversas formas para realizar la acetificación de una solución alcohólica, en la presente etapa se probaron básicamente dos métodos, uno que comprende la aplicación de aireación artificial, por medio de pequeños compresores y, por otro lado, dejando que la muestra tenga una aireación natural. Estos métodos se probaron con el objetivo de establecer cual genera un mayor rendimiento en ácido acético en las muestras. Los métodos a utilizar fueron tres y se mencionan a continuación:

- **Método 1:** Fermentación alcohólica del agua de coco, seguida de acetificación, agregando 5 ml de vinagre iniciador y madre de vinagre, sin aplicar aireación artificial.
- **Método 2:** Fermentación alcohólica del agua de coco, seguida de acetificación, agregando 5 ml de vinagre iniciador y madre de vinagre, aplicando aireación artificial.
- **Método 3:** Adición directa de alcohol al agua de coco, hasta llevarlo a 7% v/v de alcohol, y regulando los grados Brix del agua hasta 16°. Seguido de acetificación agregando 5 ml de vinagre iniciador y madre de vinagre, aplicando aireación artificial.

Para realizar las pruebas se procedió de la siguiente forma: para cada método mencionado anteriormente se colocaron dos réplicas y se rotularon según el método y el número de réplica, por ejemplo, muestra 1.1 es la réplica 1 del método 1.

Para los métodos 1 y 2 se acondicionó el agua de coco hasta llevarla a 16°Brix, con dulce de panela, se agregó 1g/l de levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se dejó que produjera alcohol durante 48 horas, y se sembró el *Acetobacter* adicionando 5 ml de vinagre iniciador

y aproximadamente 3 gr. de madre de vinagre; para el método 1 se depositó la solución alcohólica en recipientes de vidrio que fueron cerrados en su parte superior con algodón y gasa; las muestras del método 2 y tres fueron tapadas con tapones de hule y se les hizo llegar aire por medio de pequeños compresores utilizados para peceras, y para extraer el aire se les colocó una manguera que a su vez va conectada a un recipiente con una solución estéril, para evitar la contaminación. En las figuras 4.2 y 4.3 se puede observar la forma en que se colocaron los experimentos durante la producción acética.

Los resultados se presentan en la cuadro 4.2 (la determinación del contenido de ácido acético se encuentra detallado en el anexo I), y en la figura de la 4.4 se observa gráficamente el comportamiento de los resultados de producción de vinagre por los métodos anteriormente descritos.

Cuadro 4.2. Resultados de las pruebas para determinación del método de producción acética en muestras de agua de coco.

DIA	Muestra (% ac. Acético)								
	MÉTODO 1			MÉTODO 2			MÉTODO 3		
	1.1	1.2	PROM.	2.1	2.2	PROM.	3.1	3.2	PROM.
1	0.162	0.174	0.168	0.282	0.282	0.282	0.138	0.138	0.138
2	0.396	0.348	0.372	0.360	0.594	0.477	0.618	0.456	0.537
3	0.456	0.432	0.444	0.372	0.744	0.558	0.720	0.510	0.615
4	0.654	0.582	0.618	0.582	1.260	0.921	0.978	0.720	0.849
5	0.750	0.744	0.747	0.630	1.422	1.026	1.050	0.768	0.909
6	1.014	1.026	1.020	0.690	1.596	1.143	1.086	0.930	1.008
7	1.236	1.326	1.281	0.792	1.656	1.224	1.140	0.978	1.059
8	1.512	1.422	1.467	0.924	1.794	1.359	1.038	1.200	1.119
9	1.470	1.536	1.503	1.002	1.956	1.479	1.014	1.212	1.113
10	1.758	1.908	1.833	1.116	2.100	1.608	0.978	1.410	1.194
11	2.166	2.226	2.196	1.152	2.178	1.665	---	1.524	1.524
12	2.274	2.502	2.388	1.086	2.226	1.656	---	1.536	1.536
13	2.844	2.598	2.721	1.026	2.064	1.545	---	1.386	1.386
14	4.320	3.708	4.014	0.906	1.980	1.443	---	---	----
15	4.020	4.020	4.020	---	---	----	---	---	---
16	3.840	5.844	4.842	---	---	----	---	---	----
17	4.764	---	4.764	---	---	----	---	---	----

alcohol durante 48 horas, y se sembró el *Acetobacter* adicionando 5 ml de vinagre iniciador y aproximadamente 3 gr. de madre de vinagre; para el método 1 se depositó la solución alcohólica en recipientes de vidrio que fueron cerrados en su parte superior con algodón y gasa; las muestras del método 2 y tres fueron tapadas con tapones de hule y se les hizo llegar aire por medio de pequeños compresores utilizados para peceras, y para extraer el aire se les colocó una manguera que a su vez va conectada a un recipiente con una solución estéril, para evitar la contaminación. En las figuras 4.2 y 4.3 se puede observar la forma en que se colocaron los experimentos durante la producción acética.

Los resultados se presentan en la cuadro 4.2 (la determinación del contenido de ácido acético se encuentra detallado en el anexo I), y en la figura de la 4.4 se observa gráficamente el comportamiento de los resultados de producción de vinagre por los métodos anteriormente descritos.

Cuadro 4.2. Resultados de las pruebas para determinación del método de producción acética en muestras de agua de coco.

DIA	Muestra (% ac. Acético)								
	MÉTODO 1			MÉTODO 2			MÉTODO 3		
	1.1	1.2	PROM.	2.1	2.2	PROM.	3.1	3.2	PROM.
1	0.162	0.174	0.168	0.282	0.282	0.282	0.138	0.138	0.138
2	0.396	0.348	0.372	0.360	0.594	0.477	0.618	0.456	0.537
3	0.456	0.432	0.444	0.372	0.744	0.558	0.720	0.510	0.615
4	0.654	0.582	0.618	0.582	1.260	0.921	0.978	0.720	0.849
5	0.750	0.744	0.747	0.630	1.422	1.026	1.050	0.768	0.909
6	1.014	1.026	1.020	0.690	1.596	1.143	1.086	0.930	1.008
7	1.236	1.326	1.281	0.792	1.656	1.224	1.140	0.978	1.059
8	1.512	1.422	1.467	0.924	1.794	1.359	1.038	1.200	1.119
9	1.470	1.536	1.503	1.002	1.956	1.479	1.014	1.212	1.113
10	1.758	1.908	1.833	1.116	2.100	1.608	0.978	1.410	1.194
11	2.166	2.226	2.196	1.152	2.178	1.665	---	1.524	1.524
12	2.274	2.502	2.388	1.086	2.226	1.656	---	1.536	1.536
13	2.844	2.598	2.721	1.026	2.064	1.545	---	1.386	1.386
14	4.320	3.708	4.014	0.906	1.980	1.443	---	---	----
15	4.020	4.020	4.020	---	---	----	---	---	---
16	3.840	5.844	4.842	---	---	----	---	---	----
17	4.764	---	4.764	---	---	----	---	---	----

Los espacios que aparecen en blanco son valores que no fueron monitoreados, debido a que la producción de ácido comenzó a decaer, y se pudo observar la formación de madre de vinagre.

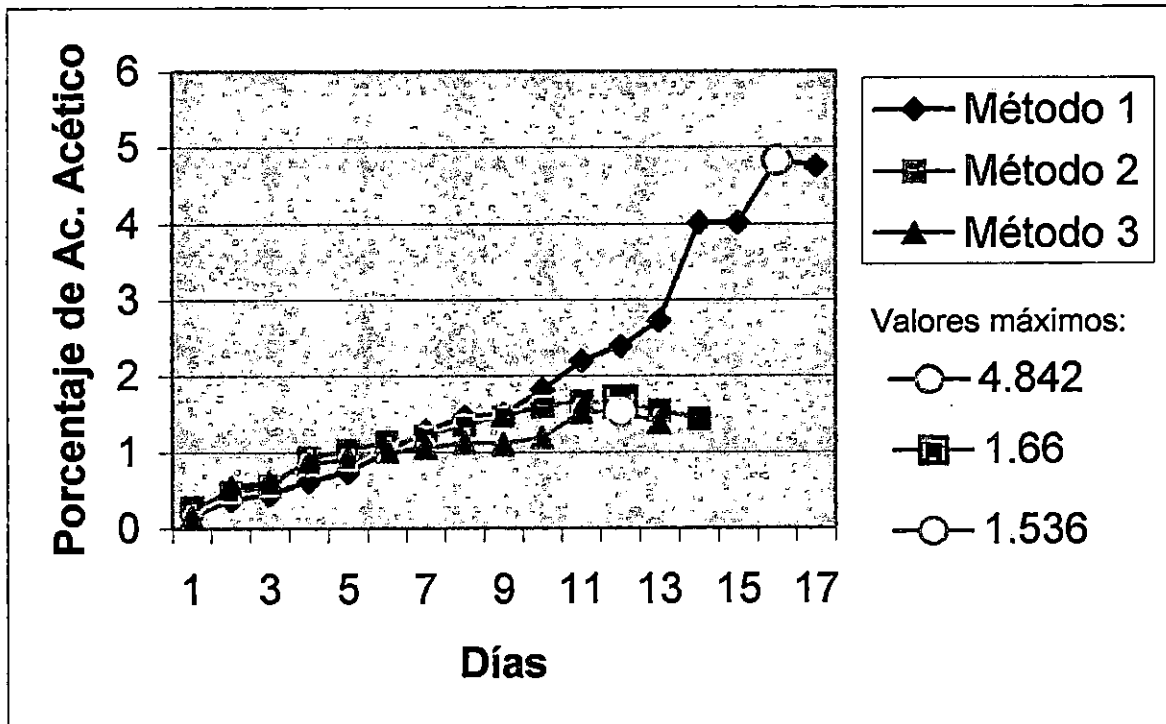


Figura 4.2. Comportamiento de la producción de ácido acético promedio en muestras de agua de coco, por los métodos 1, 2 y 3.

Como se puede observar en el gráfico 4.2 el comportamiento de las muestras es similar ya que hay una tendencia a aumentar la cantidad de ácido producido con el tiempo, llegando a un máximo y luego decayendo. Aunque para cada método se observan diferentes porcentajes máximos alcanzados.

Gráficamente podemos observar que el método 1 es el que alcanza una mayor concentración de ácido acético, pues se obtuvo una concentración máxima de 4.842 % p/v de ácido acético, en contraste con los otros métodos probados cuyos valores máximos de concentración obtenidos son de 1.656 % p/v para el método 2 y 1.536 % para el método 3.

A partir de los datos anteriores se elige el método de acetificación con aireación natural como el método recomendado para producir vinagre, además es un método más conveniente ya que no requiere de algún equipo que proporcione el aire a la solución alcohólica de manera especial y es un método más sencillo.

En el anexo F se presentan los gráficos de regresión de los datos obtenidos en los diferentes experimentos por método, con sus respectivas ecuaciones de tendencia.

En las figuras 4.3 y 4.4 se presentan el montaje realizado para llevar a cabo la experimentación para la elaboración de vinagre a partir de agua de coco.



Figura 4.3. Recipientes donde se produce vinagre aplicando una aireación natural en la etapa de acetificación.

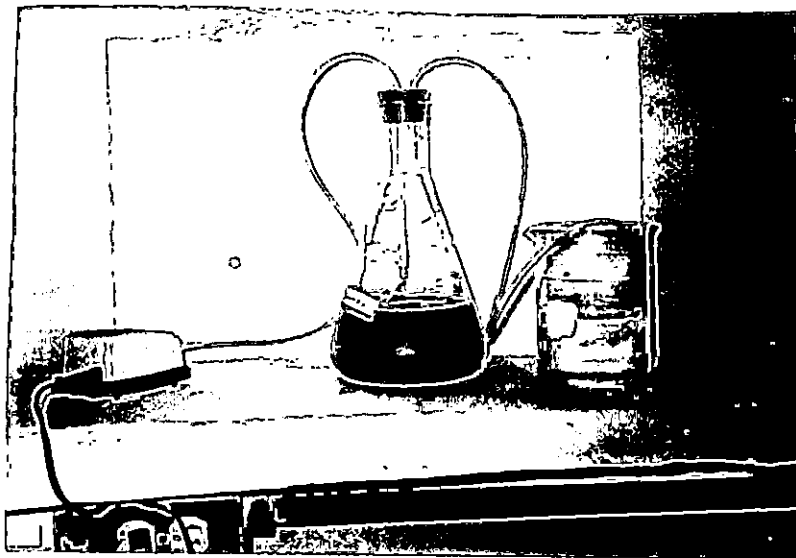


Figura 4.4. Montaje utilizado para aplicar aireación artificial en la etapa de acetificación.

V MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ACÉTICAS

Los métodos de identificación de las bacterias acéticas son muy amplios y ellos incluyen la observación de las características en medio sólido y en medio líquido, observaciones microscópicas, pruebas de movilidad y pruebas bioquímicas.

Algunas características de identificación se mencionaron en las tablas de la 2.1 a la 2.3.

V.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS BACTERIAS EN MEDIO SOLIDO

Una vez el cultivo ha sido inoculado sobre una caja Petri conteniendo sustrato nutritivo con 2% de alcohol etílico (ver anexo H), las colonias aparecen por lo general, después de 48 horas de incubación a una temperatura de 30°C. Con frecuencia son colonias pequeñas y se parecen a una gota de agua, presentan un color amarillento, la forma de las colonias es circular de bordes lisos y elevación convexa.

V.2 CARACTERÍSTICAS EN MEDIO LIQUIDO

Al sustrato nutritivo debe adicionársele 2% de alcohol etílico (ver anexo H) y luego inocular. Se incuba a 30°C por 24-48 horas y se observa la formación de película en la superficie del sustrato, la raptación o no de esta película y el entubamiento del caldo.

V.3 OBSERVACIONES MICROSCOPICAS

Por medio de las observaciones microscópicas se estudia la forma de las bacterias, así como si éstas aparecen aisladas, en parejas o en cadenas. La mejor manera de llevar a cabo estas observaciones microscópicas es haciendo uso de las técnicas de tinción, tales como: tinción simple, tinción de Gram (por medio de la cual puede determinarse que las bacterias acéticas son Gram-negativas) y tinción de cápsula para comprobar su presencia en las bacterias acéticas.

V.4 PRUEBAS DE MOVILIDAD

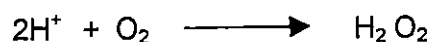
El movimiento de las bacterias acéticas puede perfectamente observarse por el método de la gota pendiente, o realizando siembras en medios de cultivo semisólido para movilidad.

V.5 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

Las pruebas bioquímicas constituyen reacciones que ponen de manifiesto las propiedades fisiológicas características de los microorganismos. Entre las pruebas bioquímicas útiles para identificar las bacterias acéticas están las siguientes: pruebas de catalasa, coloración con yodo, oxidación del alcohol etílico, sobreoxidación del ácido acético y reacción de la celulosa. Las que se describen a continuación.

V.5.1 PRUEBAS DE CATALASA

La catalasa es una enzima respiratoria capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno producido durante el proceso respiratorio, en el cual ocurren reacciones de deshidrogenación o de transferencia de hidrógeno de un compuesto a otro. Cuando el oxígeno molecular actúa como aceptor de éste se forma el peróxido de hidrógeno según la reacción que se describe en la siguiente ecuación:



Este producto es tóxico para las bacterias que lo producen, razón por la cual es desdoblado por la enzima catalasa en agua y oxígeno molecular, según la reacción descrita por la ecuación siguiente:



La enzima catalasa se descubre fácilmente añadiendo unas gotas de H_2O_2 al 3% a una colonia o al crecimiento de un cultivo en tubo inclinado. La aparición de gas indica prueba positiva.

V.5.2 COLORACIÓN CON YODO

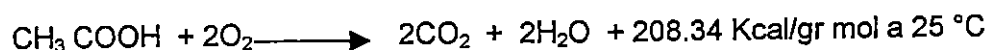
Con este método pueden observarse cápsulas mucosas, que son sustancias amorfas que rodean la célula y están constituidas por polisacáridos, principalmente almidón; éste al reaccionar con el yodo da una coloración azul.

V.5.3 OXIDACIÓN DEL ALCOHOL ETÍLICO

Las bacterias acéticas tienen la capacidad de oxidar el alcohol etílico hasta ácido acético, proceso por medio del cual obtienen la energía y el carbono que necesitan. El crecimiento de colonias sobre medios de cultivo conteniendo alcohol etílico, será una clara evidencia de que la colonia pertenece a bacterias acéticas.

V.5.4 SOBREOXIDACIÓN DEL ÁCIDO ACÉTICO

Algunas bacterias tienen la capacidad de oxidar el ácido acético producido hasta CO₂ y agua, a lo que se llama oxidación completa. La reacción que se lleva a cabo se describe en la siguiente ecuación:



V.5.5 REACCIÓN DE LA CELULOSA

Cuando las bacterias acéticas se cultivan en medio líquido, presentan formación de película que es gruesa y cariácea en la parte superior, mientras que en la parte inferior el aspecto es de masas mucosas claras como el agua.

Las películas gruesas, llamadas "películas xylinum" con yodo y ácido sulfúrico producen la reacción de las células. La celulosa está constituida por cadenas de unidades de D-glucosa unidas por enlaces glicosídicos. Estas uniones glicosídicas de la celulosa se rompen por la acción de los ácidos, con lo que cada una de sus moléculas genera muchas moléculas de d-(+)-glucosa, y cada unidad de glucosa tiene en la celulosa tres grupos -OH libres, son éstas

las posiciones donde ocurre la reacción y aparece el color azul; en otras palabras éstos son los puntos en que el ácido sulfúrico ha penetrado en las células.

V.6 PRUEBAS PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DEL GENERO

En la identificación de la bacteria ácido acética se toma como indicador la producción de ácido acético y/o su degradación. Esto se logra por medio de una serie de pruebas, las cuales, principian con la preparación de medios de cultivo adecuados (tanto sólidos como líquidos) para dicho microorganismo como se detalla en la tabla 1 del anexo E, así como también se encuentra de tallado en este anexo la elaboración de dichos medios.

V.7 AISLAMIENTO DE LA BACTERIA ACETICA

Las bacterias acéticas inoculadas procedían de dos muestras de agua de coco, la cual, se dejó descubierta al ambiente para verificar que los microorganismos acéticos son los encargados de realizar el proceso de descomposición de esta agua en los suelos de los patios de acopio en las islas productoras de copra para la extracción de aceite de coco. Una de las muestras era de dos meses de edad (cuyo color era amarillo muy fuerte y presentaba cierta cantidad de precipitado) y la otra de tres días (que presentaba color blanco turbio), lo anterior se hizo con la finalidad de poder observar en que momento era mayor la cantidad de *Acetobacter* en la muestra.

Los detalles del procedimiento de los diversos experimentos realizados, así como su resultado, se detallan a continuación:

Cuadro 5.1. Observaciones de las colonias obtenidas de muestras de agua de coco después de 24 hr de incubación a 25 ° C.

MUESTRA DE TRES DÍAS		MUESTRA DE DOS MESES	
MEDIO SOLIDO	MEDIO LIQUIDO	MEDIO SOLIDO	MEDIO LIQUIDO
<ul style="list-style-type: none"> • Formación de dos tipos de colonias, grandes y pequeñas. • De color amarillento • Redondas • Convexas • Opacas 	<ul style="list-style-type: none"> • Formación de película de color blanquecino • Enturbiamiento del medio • Precipitación de masa bacteriana 	<ul style="list-style-type: none"> • Formación limitada de un tipo de colonia pequeña. • De color amarillento • Redondas • Convexas • Opacas 	<ul style="list-style-type: none"> • Formación de película de color blanquecino • Enturbiamiento del medio • Precipitación de masa bacteriana

V.7.1 OBSERVACION MICROSCOPICA DE LOS CULTIVOS

Luego se procedió a la observación microscópica de las muestras, para lo que se llevó a cabo la preparación de los frotis para cada una de ellas, obteniéndose como resultado que en la muestra más joven los microorganismos eran levaduras en su mayoría, mientras que la de dos meses presentaba *Acetobacter* y levaduras (en ésta la presencia de los *Acetobacter* es mucho mayor que en la muestra de tres días).

V.7.2 COLORACIÓN POR YODO

Para determinar si las bacterias presentes en las muestras de agua de coco poseían capa mucosa se expuso una pequeña cantidad de la película formada en el medio líquido a una solución de yodo-yoduro potásico, ya que, la sustancia amorfa que rodea las células está constituida por polisacáridos, principalmente de almidón, y éste reacciona con el yodo dando una coloración azul a las células. El resultado de las pruebas fue negativo en ambas muestras.

V.7.3 PRUEBA DE MOVILIDAD

La prueba de movilidad se realizó por el método de la gota pendiente (Díaz, et al 1991) de la siguiente forma: en portaobjetos excavados se introdujo una gota de agua destilada estéril y en ella se colocó una pequeña cantidad de la película formada en el medio líquido, la cual, fue tomada con un asa estéril y luego se frotó vaselina alrededor de la excavación del portaobjetos para poder adherir un cubreobjetos, y por medio de un movimiento rápido se invierte tanto el cubreobjetos como el portaobjetos, y así poder ser observados al microscopio. Los resultados de esta prueba fueron negativos para ambas muestras.

V.7.4 OXIDACIÓN DEL ALCOHOL ETÍLICO

Esta pudo ser determinada por medio de la percepción de olor a ácido acético tanto en los medios sólidos como líquidos, ya que en su composición se encuentra contenido el alcohol etílico, confirmando de esta manera que las bacterias aisladas en estos medios son acéticas, ya que utilizan el alcohol etílico en su metabolismo para la obtención de energía.

Además para confirmar que los microorganismos aislados son *Acetobacter* y no *Gluconobacter* se llevó a cabo la prueba que sugieren Carr y Passmor que consiste en agregar verde de bromocresol (1 ml en 2.2% de solución por litro) a un medio sólido (de composición como la descrita en el anexo) en un medio inclinado, tanto el *Acetobacter* como el *Gluconobacter* producen ácido a partir de etanol y el indicador cambia de azul a verde y luego hasta llegar a amarillo; pero los *Acetobacter* al producir el ácido hacen que el indicador regrese de amarillo a verde, ver cuadro 5.2. (Collins, et al 1992).

Cuadro 5.2. Diferenciación de bacterias ácido acéticas.

Género	Formación de ácido a partir de etanol	Formación de CO ₂ a partir de ácido acético	Formación de CaCO ₃ a partir de lactato
<i>Gluconobacter</i>	+	-	-
<i>Acetobacter</i>	+	+	+

(Collins, et al 1992)

El resultado de esta prueba fue positivo para las bacterias acéticas en ambas muestras.

En el cuadro 5.3 se resumen los resultados obtenidos en las pruebas realizadas en las muestras de agua de coco.

Cuadro 5.3. Resultados de pruebas hechas a bacterias encontradas en muestras de agua de coco.

Prueba	Resultado obtenidos en muestra de agua de coco de tres días	Resultados obtenido en muestra de agua de coco de dos meses
Observación microscópica	Microorganismos Gram positivos y muy pequeñas cantidades de bacilos cortos Gram negativos	Microorganismos Gram positivos y bacilos cortos Gram negativos en cantidades casi proporcionales
Formación de película	Película de moderado espesor, lisa de color blanquecino	Película delgada lisa de color blanquecino
Entubamiento del líquido	Positivo	Positivo
Reptación por las paredes del recipiente	Positivo	Positivo
Coloración por yodo	Negativo	Negativo
Prueba de movilidad	Negativo	Negativo
Prueba de diferenciación de Carr y Passmor	Positivo para acetobacter	Positivo para acetobacter
Oxidación del alcohol etílico	Positivo	Positivo

(Collins , et al 1992)

En las figuras 5.1 y 5.2 se pueden apreciar las fotografías que fueron tomadas a los frotis de las muestras de agua de coco de tres días y la de dos meses respectivamente. En ellas se puede observar que en la muestra de tres días se observan muy, pero muy pocas bacterias acéticas, mientras que en la muestra de dos meses se puede observar un número mucho mayor de dichos microorganismos.

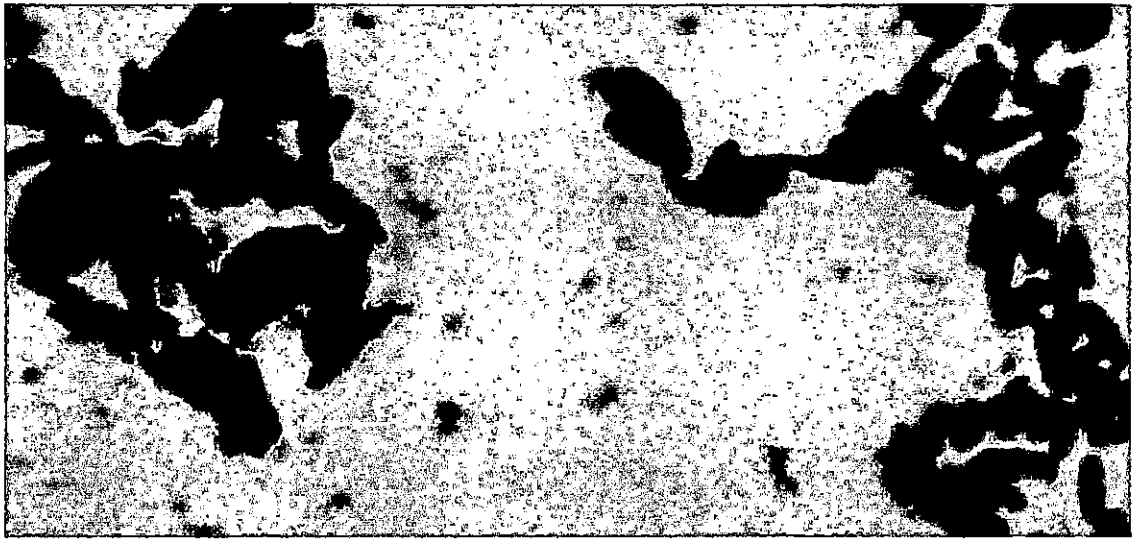


Figura 5.1. Fotografía de tinción Gram realizada a la muestra de agua de coco luego de tres días de haber sido expuesta al ambiente

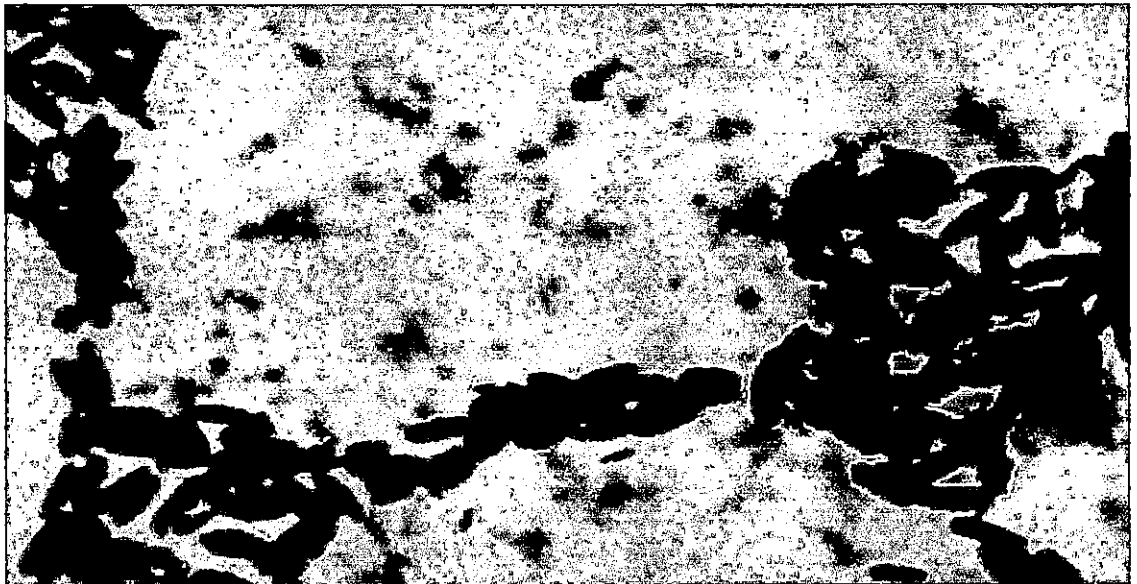


Figura 5.2. Fotografía de tinción Gram realizada a la muestra de agua de coco luego de dos meses de haber sido expuesta al ambiente

Debido a que los resultados obtenidos en las muestras anteriores indicaban que los primeros microorganismos en propagarse en el agua de coco no son las bacterias acéticas,

sino que una diversidad de microorganismos se propagan en el agua de coco con anticipación y entre estos pueden haber una gran variedad de levaduras las cuales se encargan de acondicionar el sustrato para que las bacterias acéticas puedan crecer, ya que es necesario que el sustrato contenga concentraciones bajas de alcohol etílico. Para poder comprobar lo anteriormente planteado se decidió dejar al ambiente muestras de agua de coco y monitorear el tipo de microorganismos que se desarrollaban haciendo cultivos de ésta por cinco días consecutivos y así poder asegurar que el sustrato es acondicionado por otros microorganismos antes de que las bacterias acéticas se reproduzcan en el agua de coco. Los resultados obtenidos de esta prueba se detallan en el cuadro 5.4. al final de este capítulo.

Todas las pruebas anteriormente detalladas fueron realizadas en los laboratorios de bacteriología del Ministerio de Agricultura y Ganadería, bajo la supervisión de la Lic. Doris Cardona.

En las figuras de la 5.3 a la 5.7 se pueden observar las fotografías de las secuencias de los frotis tomadas a partir de la muestra de agua de coco de un día hasta la de cinco días.

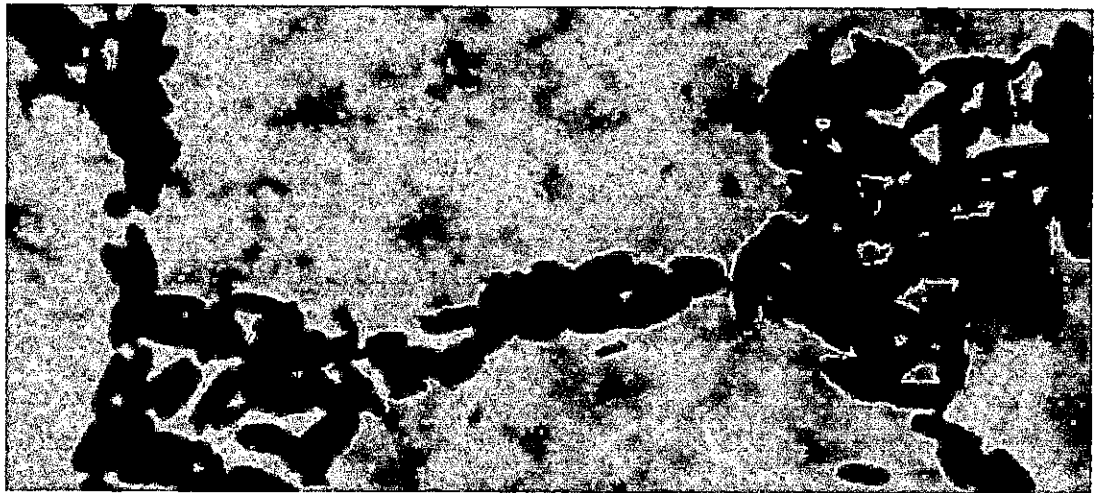


Figura 5.3. Fotografía de tinción Gram realizada a la muestra de agua de coco luego de un día de haber sido expuesta al ambiente.



Figura 5.4. Fotografía de tinción Gram de un cultivo hecho a la muestra de agua de coco luego de dos días de haber sido expuesta al ambiente.



Figura 5.5. Fotografía de tinción Gram de un cultivo hecho a la muestra de agua de coco luego de tres días de haber sido expuesta al ambiente.

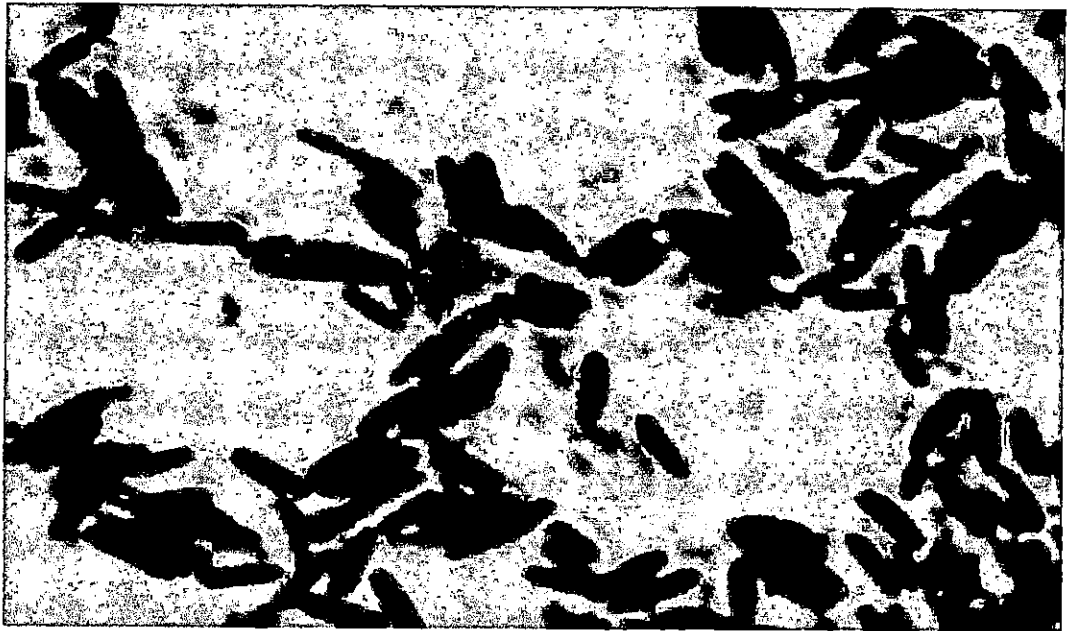


Figura 5.6. Fotografía de tinción Gram de cultivo hecho a la muestra de agua de coco luego de cuatro días de haber sido expuesta al ambiente.

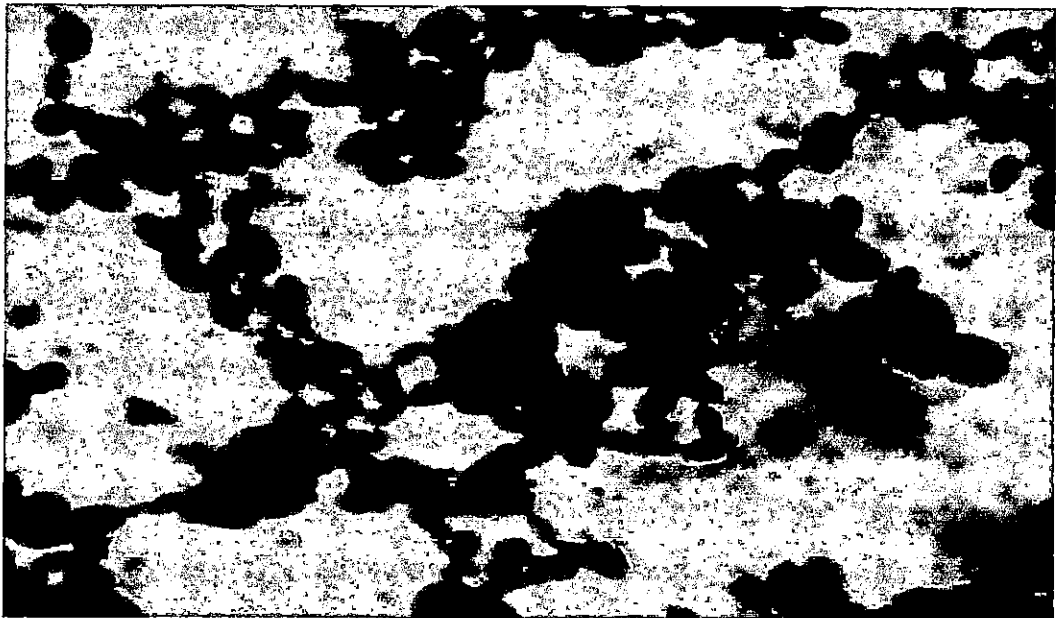


Figura 5.7. Fotografía de tinción Gram de cultivo hecho a la muestra de agua de coco luego de cinco días de haber sido expuesta al ambiente.

En esta secuencia de fotografías podemos notar que la aparición de los *Acetobacter* comienza a partir del quinto día de exposición del agua de coco al ambiente, por lo que

podemos concluir que el agua de coco ha sido modificada por otro tipo de microorganismos (que bien podrían ser hongos o levaduras) para que tenga las condiciones adecuadas para el crecimiento de los microorganismos acéticos.

Cuadro 5.4. Resultados de las observaciones microbiológicas hechas en muestras de agua de coco, monitoreadas durante 5 días.

PRUEBA	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5
Observación microscópica	Microorganismos gram positivos	Microorganismos gram positivos	Microorganismos gram positivos y muy pequeñas cantidades de bacilos cortos gram negativos.	Microorganismos gram positivos y pequeñas cantidades de bacilos cortos gram negativos	Microorganismos gram positivos y pequeñas cantidades de bacilos cortos gram negativos
Formación de película	Película de moderado espesor, lisa y de color blanquecino.	Película de moderado espesor, lisa y de color blanquecino.	Película de moderado espesor, lisa y de color blanquecino.	Película de moderado espesor, lisa y de color blanquecino.	Película de moderado espesor, lisa y de color blanquecino.
Enturbiamiento del líquido.	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Raptación por las paredes del recipiente.	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Coloración por yodo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Prueba de movilidad	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Prueba de diferenciación de CARR y PASSMOR	Positivo para <i>Acetobacter</i>	Positivo para <i>Acetobacter</i>	Positivo para <i>Acetobacter</i>	Positivo para <i>Acetobacter</i>	Positivo para <i>Acetobacter</i>
Oxidación del alcohol etílico	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

VI OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO DE ELABORACIÓN DE VINAGRE

Todo proceso de producción es afectado por una diversidad de variables ya sea de forma directa o indirecta. Por lo que es necesario realizar un estudio minucioso para identificar dichas variables, y de esta manera poder comprobar hasta que punto afectan al proceso, con lo que se podría optimizar el proceso de producción. Esto es logrado por medio de la utilización de diversos métodos estadísticos, y la aplicación de estos métodos dependerán de la naturaleza del proceso de producción a ser evaluado, así como de las variables observadas por el experimentador.

El proceso de optimización (para este caso) se llevó a cabo con la finalidad de evaluar las variables presentes en la etapa de acetificación de la solución alcohólica obtenida con el agua de coco para así poder recomendar o elegir un método que de como resultado una alta producción de ácido acético.

Para iniciar con esta etapa se procedió a evaluar las variables que afectan de forma directa el incremento de la concentración de ácido acético en el vinagre dentro de las cuales se encontraron los siguientes:

1. La temperatura en la que se desarrolla el experimento.
2. La cantidad de vinagre iniciador que se agrega junto con la madre para dar inicio a la etapa de acetificación.
3. El grado de madurez de la madre de vinagre a ser adicionada en la etapa de acetificación.

Luego de haber identificado estas variables se analizaron llegando a las conclusiones siguientes:

- La temperatura no será tomada en cuenta como variable que afecta directamente este experimento ya que El Salvador cuenta con las condiciones de temperatura

óptimas, siendo necesarios rangos de 25°C a 30°C, para que los *Acetobacter* se desarrolle sin ningún inconveniente.

- Se fijaron los rangos dentro de los cuales variaría la cantidad de vinagre iniciador a ser añadida al experimento, así, para el volumen de vinagre iniciador a ser agregado al proceso de acetificación se fijaron dos valores, uno de 3 ml y el otro de 5 ml.
- Ya que la evaluación del grado de madurez de la madre es muy difícil de cuantificar se procedió a hacerlo de una forma indirecta, tomando en cuenta el criterio de que a medida que la madre se va formando en el vinagre y va envejeciendo se vuelve de consistencia más espesa y dura, y la madre recién formada es blanda y transparente. Así se procedió a pesar tres gramos de una madre de consistencia muy firme, a la cual denominamos “madre desarrollada” aunque es sólo una forma de denominarla, pues en ambos casos se utiliza madre que ya está totalmente formada únicamente se refiere al grado de desarrollo de los microorganismos. De la misma forma se pesaron tres gramos de madre de consistencia muy blanda, a la cual denominamos “madre joven”. La diferencia entre una “madre joven” y una “madre desarrollada” es el tipo de microorganismos acéticos que se encuentran adheridas a ellas, pues en una los microorganismos han formado colonias de mayor edad, es decir, que se encuentran totalmente adaptados al medio, y en la otra son colonias recién formadas.

Debido a la naturaleza del experimento, donde las características a probar están sujetas al control del experimentador, es necesario recurrir a un diseño factorial donde se estudie la respuesta al efecto de k factores, cada uno de ellos a dos niveles. El tipo de diseño para el análisis de los datos recopilados en la etapa de optimización del método de producción de vinagre a partir de agua de coco es el denominado **Experimento factorial 2^k** (este método se encuentra detallado en el anexo J, así como los resultados estadísticos obtenidos para este experimento), donde k son los dos factores:

- A. El volumen de vinagre iniciador añadido.
- B. El grado de madurez de la madre de vinagre.

Los niveles o réplicas de cada combinación originalmente se pensaron que fueran tres, aunque debido a que los valores de mayor producción de ácido acético se observaron en los días trece y catorce de medición se utilizarán seis réplicas sumando los resultados de los dos días. Por lo tanto el modelo estadístico aplicados será 2^2 con seis réplicas, la variable respuesta será el grado de acidez de la muestra después de 13 y 14 días de acetificación de la muestra.

Luego de haber planteado el modelo de análisis estadístico, se procede a explicar la forma en que se prepararon las muestras a ser analizadas.

La etapa de fermentación alcohólica en cada uno de los métodos fue la misma, y se realizó de la siguiente manera:

- Se midió el pH del agua de coco, dando como resultado un pH de 5.5
- El agua de coco se acondicionó a 16 °Brix por medio de la adición de dulce de panela.
- En recipientes debidamente esterilizados se colocó 260 mls de agua de coco acondicionada y se le añadió 0.26 gr de levadura
- Dos días después, cuando la etapa de fermentación alcohólica se encuentra en el punto de condiciones óptimas para dar paso a la acetificación se procedió a elaborar cada uno de los métodos como se detalló anteriormente.
- Las mediciones de la concentración del ácido acético dentro del vinagre fueron realizadas a lo largo de 14 días, se encuentran ejemplificadas en el anexo I, de esta manera se pudo evaluar el comportamiento de las variables en estudio, con la finalidad de establecer si existe una diferencia significativa en las respuesta generada por las muestras al variar las condiciones de inoculación de las bacterias acéticas antes mencionadas.

Los resultados de las mediciones de acidez se presentan en la tabla 6.1, además estos datos se encuentran graficados en las figuras de la 6.1 a la 6.4 para tener una apreciación más clara del comportamiento de los resultados de cada réplica obtenidos por cada método a lo largo de los 14 días de medición, así como también fueron graficados los promedios obtenidos en cada método.

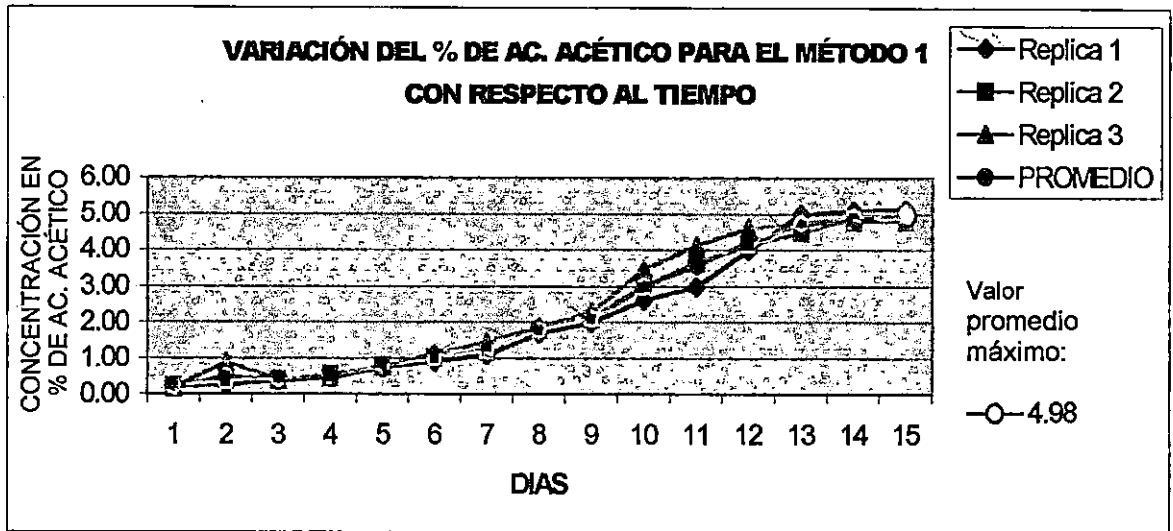


Figura 6.1. Variación de la concentración de ácido acético para el método 1 con respecto al tiempo

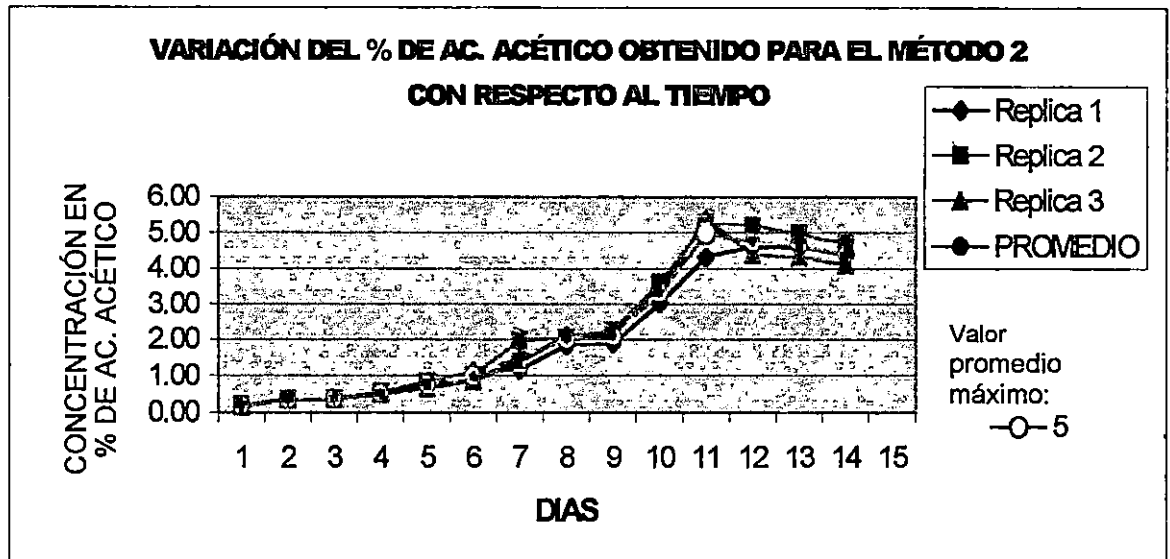


Figura 6.2. Variación de la concentración de ácido acético para el método 2 con respecto al tiempo



Figura 6.3. Variación de la concentración de ácido acético para el método 3 con respecto al tiempo

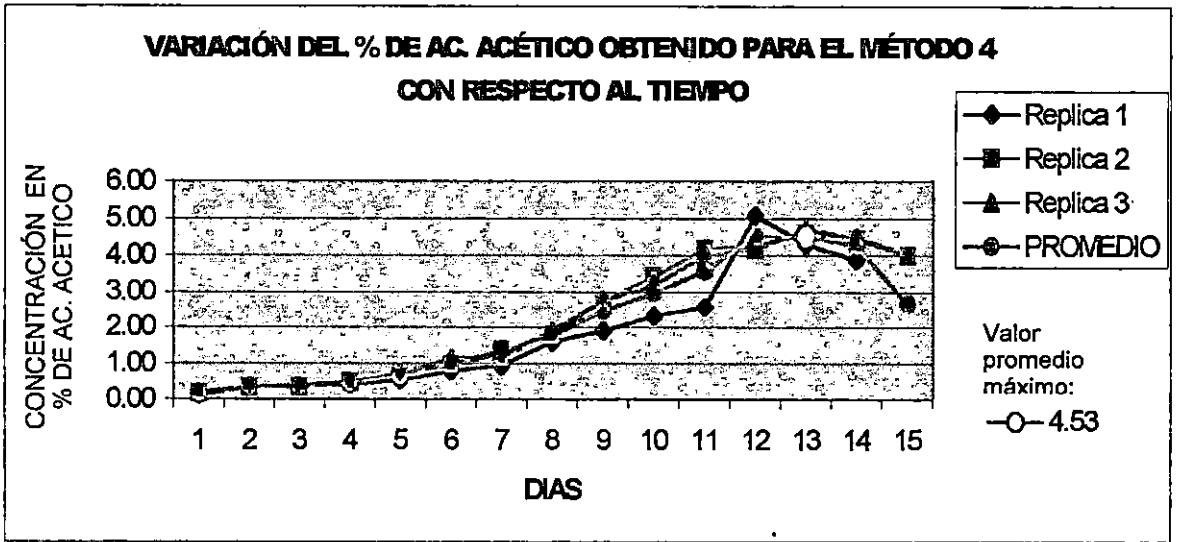


Figura 6.4. Variación de la concentración de ácido acético para el método 4 con respecto al tiempo.

En el anexo G se presentan la mejor tendencia y la ecuación de la misma para los resultados obtenidos de las replicas de cada método.

Cuadro 6.1. Resultados de los análisis de acidez hechos a muestras de agua de coco realizados para comprobar el efecto de variables de iniciación (cantidad de vinagre iniciador - madurez de la madre agregada) en la etapa de acetificación.

D I A	MÉTODO											
	1			2			3			4		
	RÉPLICA (% DE ÁCIDO ACÉTICO)											
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	0.22	0.22	0.19	0.19	0.19	0.17	0.17	0.17	0.17	0.14	0.17	0.19
2	0.26	0.36	0.90	0.36	0.34	0.36	0.36	0.36	0.34	0.34	0.34	0.36
3	0.38	0.41	0.41	0.38	0.36	0.38	0.38	0.38	0.36	0.38	0.38	0.38
4	0.46	0.55	0.46	0.53	0.55	0.50	0.50	0.46	0.46	0.43	0.50	0.48
5	0.74	0.79	0.77	0.79	0.84	0.67	0.58	0.55	0.60	0.55	0.72	0.74
6	0.91	1.01	1.13	1.13	1.01	0.89	0.89	0.74	1.03	0.79	0.98	1.13
7	1.10	1.18	1.46	1.18	1.98	1.36	0.94	1.10	0.98	0.94	1.37	1.20
8	1.69	1.80	1.87	1.85	2.06	2.14	1.10	1.27	1.27	1.61	1.80	1.92
9	1.99	2.10	2.28	1.92	2.26	2.16	1.08	1.55	1.97	1.92	2.77	2.75
10	2.62	2.99	3.48	3.02	3.60	3.38	1.76	2.53	2.36	2.33	3.44	3.20
11	3.00	3.67	4.14	4.32	5.28	5.40	2.52	3.53	3.58	2.58	4.19	4.01
12	4.00	4.14	4.61	4.61	5.23	4.40	3.48	4.56	3.84	5.10	4.27	4.18
13	5.02	4.51	4.70	4.60	4.97	4.33	3.60	4.37	4.73	4.30	4.60	4.70
14	5.10	4.90	4.80	4.39	4.70	4.12	4.81	4.07	4.60	3.88	4.44	4.50
15	5.16	4.98	4.80				5.04		4.40		4.02	4.04

NOTA: los métodos enumerados en la tabla se describirán en la sección vi.1.1.

VI.1 Interpretación de los resultados

En el cuadro 6.1 se encuentran los resultados de las mediciones de ácido acético en las muestra de agua de coco, y en los gráficos 6.1 a 6.4 se observa la variación de los diferentes combinaciones de tratamientos con el tiempo, donde podemos notar que el porcentaje de ácido acético producido aumenta con el tiempo, hasta llegar a ser máximo entre los días 13 y 14, para tres de los cuatro métodos, por lo que se puede decir que tienen un comportamiento similar entre sí. Debido a este fenómeno se procedió a realizar el análisis estadístico para los resultados obtenidos entre los días 13 y 14, tomándose los factores cantidad de vinagre iniciador y tipo de madre de vinagre agregados, para iniciar la etapa de acetificación, como las variables cuya influencia en la acidez del vinagre de agua de coco producido se comprobará.

VI.1.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Como se mencionó al inicio de este capítulo el análisis estadístico aplicado a los resultados es el de diseño factorial 2^k (ver anexo J) , donde se plantean las siguientes hipótesis:

- **Hipótesis nula, H_0 :** No existe efecto significativo de la cantidad de vinagre iniciador y la madurez de la madre de vinagre adicionados en el proceso de acetificación sobre la producción de ácido acético

- **Hipótesis alternativa, H_1 :** existe efecto significativo de la cantidad de vinagre iniciador y la madurez de la madre de vinagre adicionados en el proceso de acetificación sobre la producción de ácido acético

Para la comprobación de la hipótesis nula planteada se realizo un análisis de varianza a un nivel de confiabilidad del 95%.

Los resultados obtenidos al aplicar el diseño factorial 2^k se encuentran tabulados en el Cuadro 6.2.

Cuadro 6.2. Resultados del análisis estadístico aplicado a los datos de concentración de ácido acético obtenidos a partir de la combinación de dos factores de iniciación de la etapa de acetificación.

Fuente de variación (efectos principales)	Sumatoria de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F calculado	Nivel de significancia
A: tipo de madre	0.11760	1	0.11760	1.045	0.3183
B: cant. de vinagre iniciador	0.52215	1	0.52215	4.640	0.0430
Residuos	2.36303	21	0.11252		
Total	3.00278	23			

A cada combinación de tipo de madre y cantidad de vinagre iniciador se le denominó método con la finalidad de simplificar la manera de tratar los resultados, aunque el análisis se hace para comprobar la influencia de los factores antes mencionados, así:

- METODO 1: se le añadirán 5 ml de vinagre iniciador y 3 gramos de madre de vinagre joven para dar inicio con la etapa de acetificación.
- METODO 2: se le añadirán 5 ml de vinagre iniciador y 3 gramos de madre de vinagre desarrollada para dar inicio con la etapa de acetificación.
- METODO 3: se le añadirán 3 ml de vinagre iniciador y 3 gramos de madre de vinagre joven para dar inicio con la etapa de acetificación.
- METODO 4: se le añadirán 3 ml de vinagre iniciador y 3 gramos de madre de vinagre desarrollada para dar inicio con la etapa de acetificación.

El nivel de confiabilidad aplicado al análisis es de 95%. De donde se puede observar que el nivel de significancia obtenido para esta prueba estadística es de 0.3183 para el factor tipo de madre y de 0.0430 para el factor cantidad de vinagre iniciador, resultando mayor el nivel

de significancia escogido, que es de 0.05, para el factor tipo de madre y menor que 0.05 para el factor vinagre iniciador, por lo que se concluye que el factor tipo de madre no afecta de manera significativa la producción de vinagre en las muestras de agua de coco; no siendo así para la cantidad de vinagre iniciador, que influye en la acidez.

El factor cantidad de vinagre iniciador efectivamente influye en la acidez del vinagre producido, aunque habría que tomar en cuenta que se está acidificando la muestra desde el principio, pues se está agregando mayor cantidad de ácido acético, por lo que se concluye que sí ejerce efecto, sin embargo, es necesario hacer experimentos más completos para definir cuales son los rangos de volumen de vinagre iniciador que permiten una producción adecuada de vinagre, pues la cantidad de ácido acético producido es mayor, aunque no en un porcentaje muy amplio en comparación con las otras combinaciones probadas, lo que se puede observar en la figura 6.5, donde aparecen graficados los rangos donde se encuentran los valores de acidez calculados para cada combinación y en la parte señalada con asterisco el valor promedio de cada uno de los rangos resultando que el método 1 (donde se utilizaron 5 ml De vinagre iniciador y 3 gr. de madre joven para iniciar la acetificación) dio un mejor resultado que los otros tres métodos aplicados.

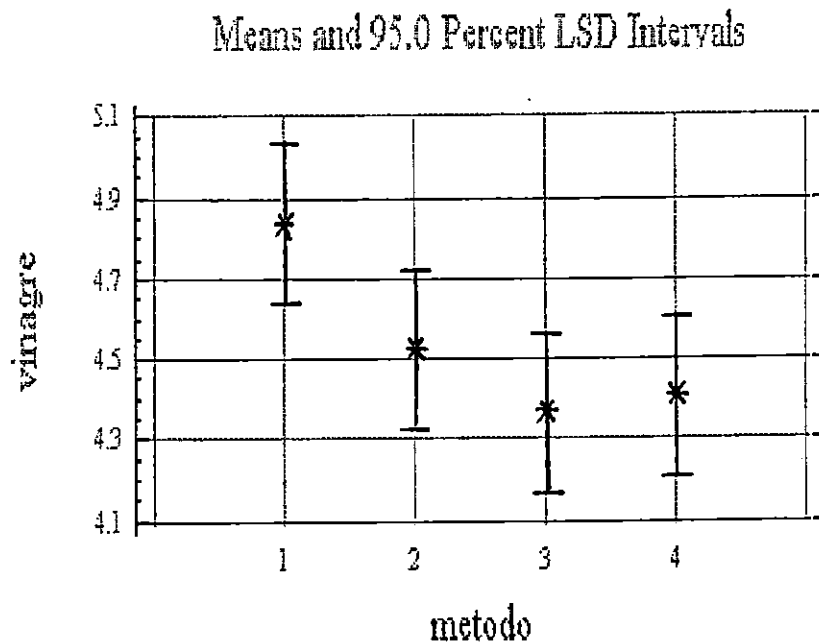


Figura 6.5. Comparación de la variación de la concentración de ácido acético en los días 13 y 14 para los cuatro métodos utilizados.

VII PROPUESTA DE PROCESO DE PRODUCCIÓN DE VINAGRE A NIVEL DE PLANTA PILOTO O ARTESANAL A PARTIR DE AGUA DE COCO RESIDUAL DEL PROCESAMIENTO DE LA COPRA.

A continuación, en la figura 7.1, se explica paso a paso una propuesta para el proceso de producción de vinagre a partir de agua de coco que podría ser utilizada en los lugares donde se obtiene la copra. Y en la figura 7.2 el diseño de planta del mismo proceso.

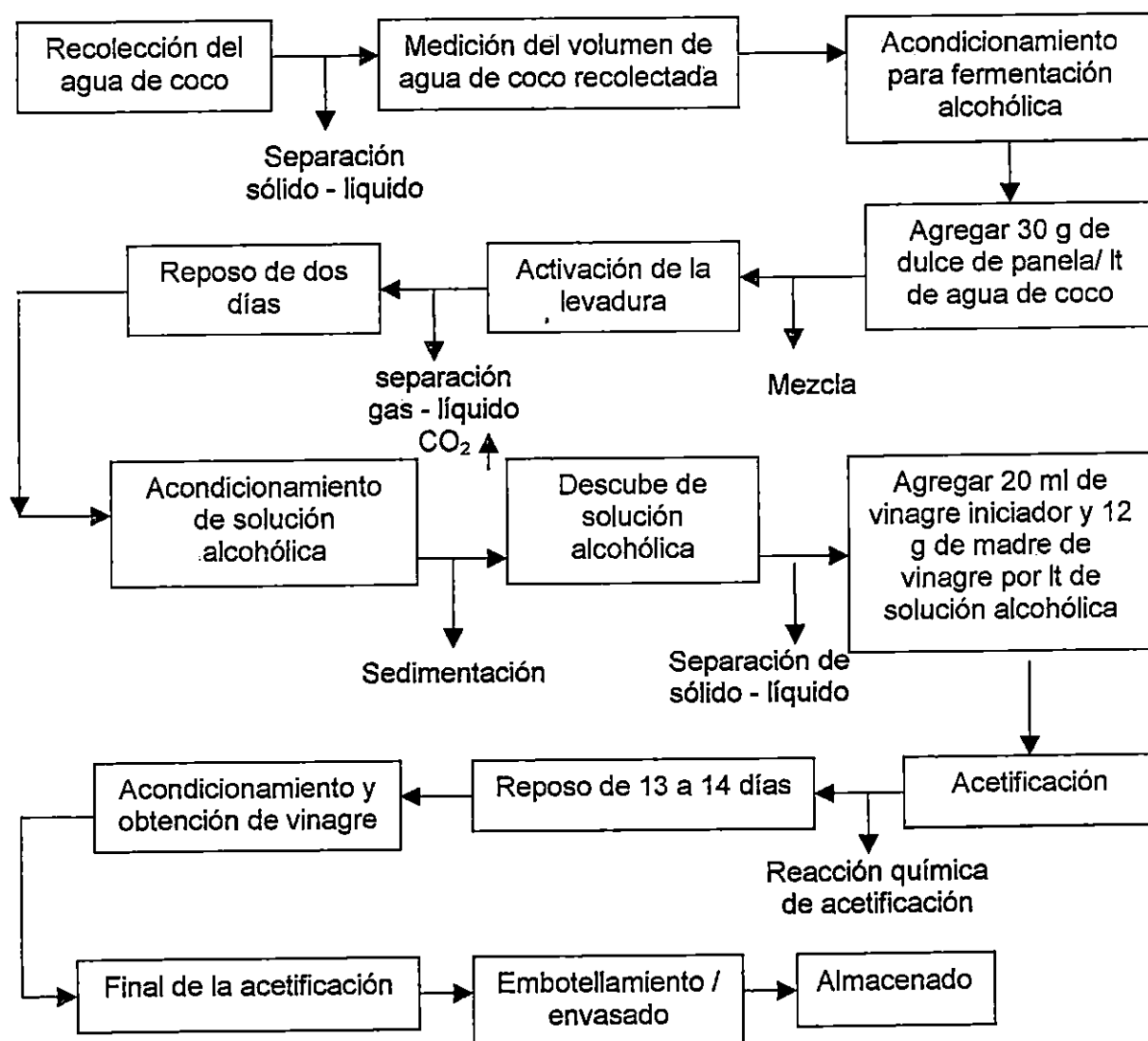
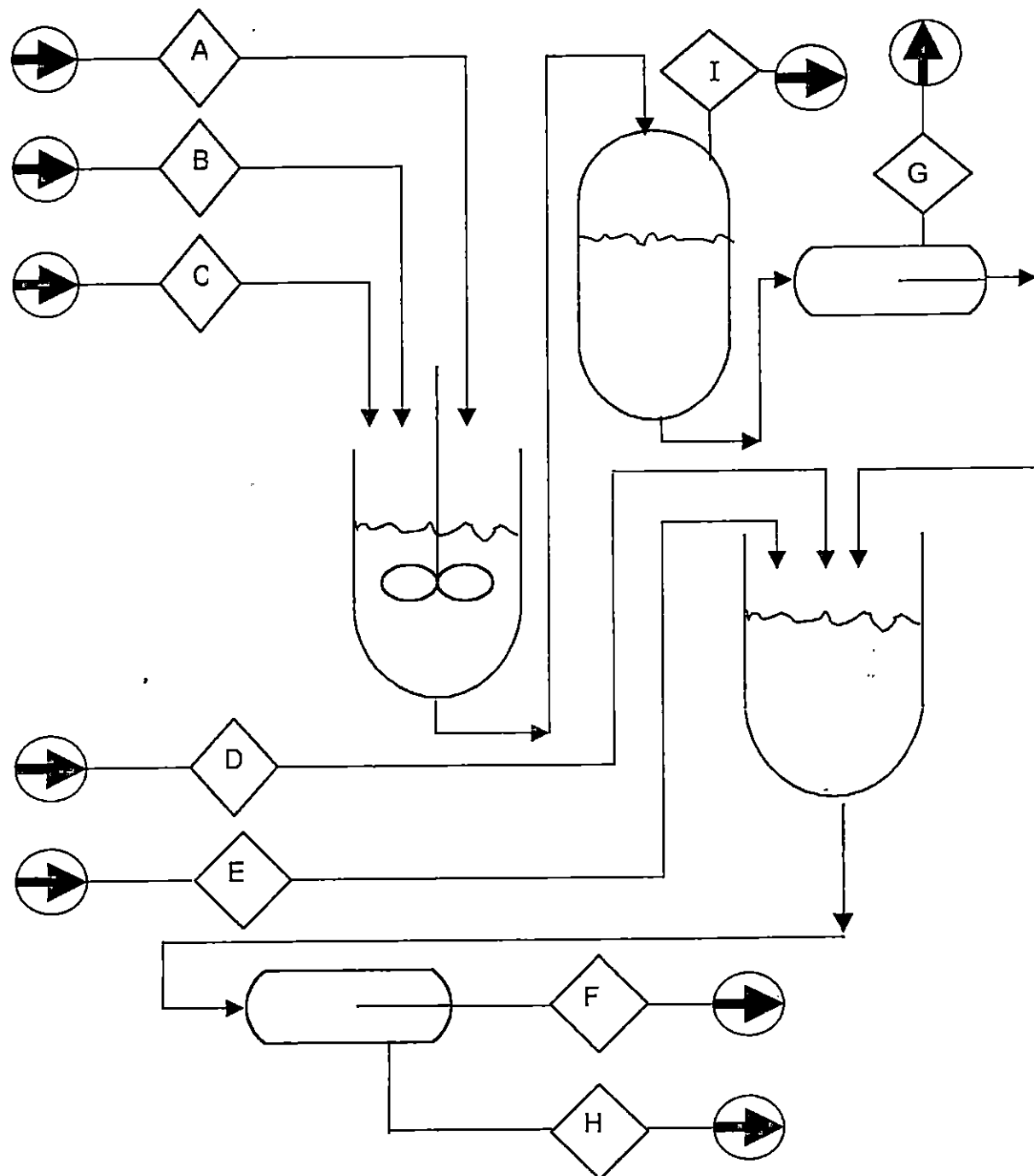


Figura 7.1. Flujograma de producción de vinagre a partir de agua de coco.



A) Agua de coco
 B) Dulce de panela
 C) Levadura

D) Madre de vinagre
 E) Vinagre iniciador
 F) Producto

G) Levadura sedimentada
 H) Sedimentos provenientes
 de la acetificación
 I) CO₂

Figura 7.2. Diseño de planta para la elaboración de vinagre a partir de agua de coco.

VII.1 ETAPAS A SEGUIR EN LA PRODUCCIÓN DE VINAGRE A PARTIR DE AGUA DE COCO RESIDUAL DEL PROCESAMIENTO DE COPRA PARA LA PRODUCCIÓN DE ACEITE.

Para producir vinagre no se necesitan recipientes especiales, sino recipientes y utensilios de uso común en un hogar los materiales y equipos serían:

- Dos barriles o cubetas de plástico con tapadera
- Un pedazo de manguera de unos 5 mm de diámetro
- Un abrevadero para partir los cocos, que podría ser uno o varios lavaderos que cuyo desagüe estaría conectado a un tubo de plástico que conduzca el agua a uno de los barriles de plástico.
- Una balanza
- Botellas para almacenar el vinagre
- Dos vasos o recipiente pequeños de aproximadamente 1 litro de capacidad con una abertura de diámetro de unos 5 cm.
- Un embudo
- Algodón

Los insumos requeridos serían:

- Agua de coco
- Levadura de uso en panadería
- Dulce de panela
- Vinagre iniciador
- Madre de vinagre
- Lejía
- Azúcar

- Bisulfito de sodio

Paso 1: Recolección del agua de coco.

Como primer paso es necesario establecer una recolección adecuada del agua, para lo que se sugiere un cambio radical en la forma de partir los cocos, un abrevadero donde se estarían partiendo los cocos, estos abrevaderos tienen que estar conectados a un tubo de plástico por donde fluye el agua hacia un barril o cubeta conectada al tubo, este barril deberá poseer una maya o colador para separar las partículas sólidas del agua, aplicándose una separación sólido - líquido.

Paso 2: Determinación de la cantidad de agua de coco recolectada.

Por otra parte los recipientes de plástico donde se recolecta el agua de coco deberían estar marcados con señales de volumen, para así poder determinar la cantidad de agua recolectada ya que es necesario conocer el volumen para luego acondicionarla de la forma adecuada.

Paso 3: Acondicionamiento del sustrato para la fermentación alcohólica.

La operación unitaria básica aquí es la de mezclado.

El acondicionamiento consiste en llevar el agua de coco hasta 16° Brix, para lo que se le podría agregar una cantidad aproximada 150 gramos de dulce de panela por litro de agua de coco recolectado (esta es una cantidad promedio obtenida de varios datos experimentales).

Paso 4: Fermentación alcohólica.

Ya acondicionada el agua se procederá a agregar la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a razón de 1 gramo por litro, la levadura utilizada en los experimentos fue la de grado comercial, utilizada comúnmente en la fabricación de pan. Debido a que la levadura se encuentra liofilizada se recomienda activarla de la siguiente forma: en un recipiente pequeño, puede ser un vaso, se pone agua de coco y tres cucharadas pequeñas de azúcar, se agregará levadura a razón de 1 g de levadura por litro de agua captada, la activación de la levadura se notará por la aparición de burbujas en la superficie del recipiente.

La levadura activada se agrega al recipiente que contiene el agua de coco acondicionada, se agita con una paleta, se cierra en envase de forma que en la tapadera solamente quede un pequeño agujero por donde se hace pasar una manguera, que será por donde escapará el CO_2 formado durante la producción alcohólica, este es un proceso natural de separación gas - líquido.

La manguera podrá ser de unos 5 mm de diámetro, y a su vez estará conectada a un vaso u otro recipiente que contenga lejía diluida.

El agua de coco acondicionada se deja por dos días, que son suficientes para obtener la concentración de alcohol necesario para pasar a la etapa de acetificación.

Paso 5: Descubre y preparación para la acetificación.

Al pasar los dos días necesarios para la fermentación alcohólica se procede a separar la solución alcohólica de los residuos de levaduras sedimentados (a esta acción se le denomina descube), lo que se puede hacer por decantación simple de la solución alcohólica, dejando los residuos de levadura en el recipiente y pasando la solución a otro recipiente limpio, o por medio de una manguera, colocando el recipiente que contiene la solución alcohólica en una mesa y el recipiente donde ésta se trasladará en el suelo, teniendo el cuidado de evitar arrastrar los residuos de levadura.

La operación unitaria básica aquí es la de sedimentación y separación sólido - líquido.

La solución alcohólica puede ser dejada en el recipiente donde se decantó o utilizar el mismo recipiente que se utilizó para la fermentación alcohólica, únicamente que esta vez se utilizaría una tapadera que contenga varios agujeros por donde tendría que pasar el aire para que las bacterias acéticas sobrevivan, estos agujeros tienen que estar tapados con algodón o tela de manta para colar, para evitar que se cuelen mosquitos o moscas al recipiente.

Para iniciar la transformación del alcohol en vinagre se agregaran 20 ml de vinagre iniciador al recipiente que contiene la solución alcohólica y 12 g de madre de vinagre. Iniciándose así la etapa de producción de ácido acético.

Paso 6: Acetificación.

La acetificación se lleva a cabo durante 13 o 14 días, la temperatura óptima para dicho proceso es de 23 a 24 °C, por lo que la temperatura ambiente es la mejor.

Después de los 13 o 14 días se comenzará a formar un velo blanco en la superficie del recipiente, en ese momento la cantidad de ácido acético comienza a decaer por lo que es el momento óptimo para consumo del vinagre.

Paso 7: Obtención y acondicionamiento del vinagre.

Pasados los trece o catorce días es necesario detener la acetificación, para lo que se sugiere añadir al vinagre ya filtrado 1.5 gr. de Bisulfito de sodio, por cada 15 litros de vinagre, o 2.5 gramos de sal por cada diez litros de vinagre.

Para poder almacenar el vinagre una vez terminado el proceso de acetificación se pueden utilizar botellas de segunda mano, las que deben remojarse con detergente y posteriormente con lejía diluida en agua, o dos cucharadas pequeñas de soda cáustica por diez litros de agua. Como último enjuague se utiliza una cucharadita de Bisulfito de sodio por diez litros de agua, finalmente las botellas se escurren bien.

Las botellas se llenan con un embudo limpio, se colocan corchos o tapones plásticos, se usarán botellas transparentes. Finalmente se recomienda almacenar el vinagre en un ambiente seco y limpio, protegido del sol.

En el anexo K se presenta una guía de elaboración de vinagre en forma artesanal, la cuál esta diseñada para su distribución entre los pobladores de las zonas aledañas a la fábrica de producción de aceite de coco.

VIII OBSERVACIONES

- El cocotero es un árbol con gran potencial y capaz de desarrollarse en un clima como el de El Salvador, sin embargo ha sido objeto de pocos estudios y por esa misma razón existen pocas alternativas de uso a nivel nacional.
- A falta de tierras cultivables y para vivienda, varias cooperativas que antes se dedicaban al cultivo del cocotero para producción de aceite o copra desecada, han repartido sus terrenos entre sus miembros para que sean cultivados con granos y construidas sus viviendas.
- No se ha realizado ningún estudio anterior que promueva una alternativa de uso que sea accesible para la mayoría de personas en la utilización del agua de coco residual de la producción de aceite de coco, que es un recurso sumamente rico en nutrientes.
- El procedimiento para la producción de vinagre es sumamente sencillo, sólo basta darle las condiciones necesarias (de grados Brix) al sustrato y los microorganismos se desarrollarán de manera favorable.
- Se probaron tres métodos diferentes para establecer el que da mejores resultados en la etapa de acetificación se pudo observar que en la fase experimental solamente uno de los métodos arrojó los resultados deseados, pese a que todos presentaban las condiciones óptimas de concentración alcohólica. Al final se optó por utilizar el método que dio mayor rendimiento en ácido acético.
- Al formarse la madre del vinagre en las muestras se observó que el porcentaje de ácido acético decrecía a medida que ésta se hacía más gruesa.
- En la etapa experimental de este trabajo se utilizó tanto un método de acetificación sumergido (Método 2 y 3) como uno de acetificación superficial conocido comúnmente como Orleans (Método 1).
- Para realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos en la optimización de la etapa de producción de ácido acético se utilizaron todos los datos obtenidos durante 14 días de prueba, los que presentaron gran variabilidad, ya que la cantidad de ácido acético va aumentando con el tiempo y éstos presentaban una gran variabilidad por lo

que se optó por elegir los días 13 y 14 que es cuando se observaba la mayor concentración y menor variabilidad entre los datos y se compararon sus medias estadísticamente.

- Para la identificación de bacterias acéticas se realizaron todas las pruebas necesarias dirigidas a la identificación de las mismas, es decir se utilizaron pruebas especializadas en la identificación del género. Todo con la finalidad de establecer si los microorganismos son del género *Acetobacter* o *Gluconobacter*.
- Los primeros microorganismos en propagarse en el agua de coco no son las bacterias acéticas, sino que una diversidad de microorganismos se propagan con anticipación y entre estos pueden haber una gran variedad de levaduras las que se encargan de acondicionar el sustrato para que las bacterias acéticas puedan crecer.
- Se tomaron cinco muestras de agua de coco, las que fueron dejadas al ambiente y se hicieron cultivos de esta muestra durante cinco días diferentes para poder confirmar que el sustrato es acondicionado por otros microorganismos antes de que las bacterias acéticas se reproduzcan en el agua de coco. Que es la forma en que se produce el ácido acético en los campos donde se parte el fruto para extraer la copra en el proceso de producción de aceite de coco.
- En la etapa de monitoreo de producción alcohólica se pudo observar la presencia de etanol y otros alcoholes en pequeñas proporciones en la muestra que únicamente estaba acondicionada para iniciar la producción alcohólica, y que es parte de la línea base para el monitoreo en la producción de alcohol.
- Para iniciar la etapa de optimización de producción acética se tomaron en cuenta los factores que influyen en el rendimiento y en el tiempo de producción, siendo éstos: la temperatura, la cantidad de vinagre iniciador y el tipo de madre, que entre otros influyen en el rendimiento de la producción de vinagre. Puesto que ya se había escogido el método por el que se obtiene un mayor rendimiento, y ya que la temperatura es un factor favorable en nuestro país, pues El Salvador cuenta con las condiciones de temperatura óptimas (según la teoría son necesarios rangos de 25°C a 30°C) para que éste se desarrolle sin ningún inconveniente, se optó por probar si realmente tienen influencia el tipo de madre (joven o madura) y la cantidad de vinagre iniciador.

IX CONCLUSIONES

- El agua de coco es un medio sumamente rico para el desarrollo de microorganismos, por lo que al quedar retenida en los suelos de los patios de acopio, formando pequeñas acumulaciones de líquido que se encuentran esparcidas a lo largo del lugar, acidifica los suelos impidiendo que luego estos sean aptos para la agricultura.
- El resultado del análisis estadístico de los días donde se observó la mayor concentración de ácido acético en las muestras (días 13 y 14) fue: que en el día 13 se presentaba la mayor concentración de ácido acético cuyo promedio resultó ser de 4.54 gr / l, y el método a ser utilizado es el 1, ya que es el que presenta el mayor promedio entre los otros métodos utilizados, aunque será necesario profundizar en experimentos para poder establecer la cantidad de vinagre iniciador a utilizar en la producción de vinagre para obtener una concentración adecuada de ácido acético.
- El análisis estadístico de denominado Experimento factorial 2² fue aplicado debido a que se están estudiando dos factores que están afectando a dos niveles la producción de ácido acético en la fabricación de vinagre de agua de coco, lo que afecta el resultado aunque.
- Según los datos recopilados por la Dirección General de Estadística y Censo de El Salvador, que se encuentran en el anexo L de este trabajo, la producción de vinagre en El Salvador es un negocio rentable, ya que la producción local no alcanza a cubrir las demandas internas, pues al comparar los datos de exportaciones con los de importaciones de vinagre resultan ser mayores los últimos, los datos de los años 1996, 1997 y 1998 lo confirman, por lo que la fabricación de vinagre a partir de agua de coco, además de ser una alternativa factible para la reducción del desperdicio en las zonas donde se produce aceite ayudaría a suplir la demanda de vinagre en El Salvador.

X RECOMENDACIONES

- El presente trabajo fue realizado a nivel de laboratorio, por lo que se recomienda que en trabajos posteriores se puedan hacer ensayos a nivel de planta piloto para poder monitorear el comportamiento de la producción de ácido acético a partir del agua de coco en volúmenes mayores.
- El presente trabajo puede servir como base para el estudio de obtención de ácido acético puro a partir de agua de coco por medio de pruebas de escalamiento, ya que las concentraciones de ácido acético que se logran obtener por este método son aceptables y con la ventaja de obtenerse a un bajo costo.
- Siendo el agua de coco un medio donde se desarrollan una gran diversidad de bacterias y otros microorganismos, se podría realizar investigaciones destinadas a determinar cuales microorganismos de importancia para el hombre pueden desarrollarse de forma útil en ella.
- Es de gran importancia buscar alternativas de uso para el árbol de cocotero pues, como se muestra en la parte teórica de esta tesis, es un árbol con una gran diversidad de usos que pueden ser de gran beneficio para países en desarrollo como El Salvador.
- Debido a que las pruebas de producción de vinagre en agua de coco se dirigieron a determinar el método por el que se obtuviera un mayor rendimiento, debido a la naturaleza del trabajo, donde se tiene por objetivo plantear una alternativa de uso viable del agua de coco residual, se recomienda probar con otros métodos que involucren el cultivo sumergido para poder determinar el rendimiento.
- Finalmente se recomienda realizar investigaciones con la finalidad de determinar la cantidad de vinagre iniciador utilizado para iniciar la acetificación, pues como se pudo comprobar estadísticamente existe diferencia significativa en los resultados al aplicar una mayor cantidad de vinagre iniciador.

XI REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Aguilar Flores, Raúl Humberto (1999) "Caracterización fisicoquímica del proceso artesanal de producción de dulce y azúcar de panela y diagnostico de sus efectos en el medio ambiente". Trabajo de graduación previo al título de Ingeniero Químico. Universidad de El Salvador, Facultad de Ingeniería y Arquitectura.
2. A. J. Salle; Gili, Gustavo (1965) "Bacteriología". Editorial S.A., Segunda Edición, Barcelona.
3. Brock, Thomas D. (1987) "Microbiología". Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A., Cuarta Edición, México
4. CENTA (1984) "Documentos técnicos sobre aspectos agropecuarios". Manual técnico # 3. El Salvador.
5. Collin and Kyne's (1992) "Microbiological methods" 6° edición, Butterworth Heinemann. USA.
6. Díaz Meléndez, Ana Cecilia (1991) "Producción de ácido acético a partir de alcohol etílico industrial". Trabajo de graduación previo al título de Ingeniero Químico. Universidad de El Salvador, Facultad de Ingeniería y Arquitectura.

7. Dirección General de Estadística y Censo. (1996-1999) **"Cantidad y valor de la importación y la exportación según capítulo, sub-capítulo y partida del sistema arancelario Centroamericano (SAC)"**. El Salvador. Centro América.
8. Figueroa García, José Eduardo (1994) **"Pruebas de escalamiento del proceso de producción de ácido acético a partir de alcohol etílico industrial en un reactor de células de *Acetobacter Sp.* inmovilizadas sobre piedras pómez"**. Trabajo de graduación previo al título de Ingeniero Químico. Universidad de El Salvador, Facultad de Ingeniería y Arquitectura.
9. Gelohard, Luis P. (1970) **"Microbiología"**. Editorial Latinoamericana. México.
10. Grimwood, Brian E. (1970) **"Los productos del cocotero"**. FAO.
11. Jörgense, Alfred. (1979) **"Microbiología de las fermentaciones industriales"**. Editorial Acribia. Zaragoza. España.
12. Kirk, Othmer. (1962) **"Enciclopedia de Tecnología Química"**. UTHEA. México.
13. López Escobar, Víctor Raúl (1978) **"Obtención de vinagre a partir de jugo de caña"**
Trabajo de graduación previo al título de Ingeniero Químico. Universidad Centroamericana José Simeón Cañas. San Salvador. El Salvador.
14. Ministerio de Agricultura, Comercio E Industria (1960) **"Servicio interamericano de cooperación agrícola de Panamá. El coco en Panamá"**. República de Panamá.

15. Orantes González, Jorge Ernesto. (1987) **"Producción de alcohol etílico utilizando mezclas de melaza y vinaza como sustrato."** Trabajo de graduación previo al título de Ingeniero Químico. Universidad de El Salvador, Facultad de Ingeniería y Arquitectura.
16. Pereira Henríquez, Ana Isabel. (1976) **"Producción de vinagre utilizando un microorganismo aislado del medio ambiente."** Trabajo de graduación previo al título de Licenciado en Tecnología de los Alimentos. Universidad de El Salvador, Facultad de Ingeniería y Arquitectura.
17. Saca Kury, María Elena.(1980) **"Ensayo de laboratorio para obtener vinagre a partir de la cascara de piña."** Trabajo de graduación previo al título de Ingeniero Químico. Universidad Centroamericana José Simeón Cañas. San Salvador. El Salvador.
18. Sánchez Marroquín, Alfredo. (1961) **"Principios de microbiología industrial."** Editorial Química. México.
19. Sánchez Potes, Alberto. (1987) **"Cultivos de plantación."** Manuales para educación agropecuaria, área de producción vegetal, fascículo N° 22, Editorial Trillas, México.
20. Valiente, Antonio. (1999) **"Problemas de Balance de Materia y Energía en la Industria Alimentaria"**. Editorial LIMUSA, S.A. de C.V. Segunda Edición. México.

21. Walpole, R.E.; Myers, R.E. (1989) **"Probabilidad y Estadística para Ingenieros"**. 3^o edición. McGRAW-HILL. México.

22. Páginas WEB:

<http://www.fao.org/waicnet/FAOINFO/AGRICULT/esp/revista/9810/spot3>

<http://www.geocities.com/collegetpark/lab/2960/vinagre>

<http://www.laprensa.com.sv>

ANEXOS

ANEXO A

ESTABLECIMIENTO DE PLANTACIONES DE COCOTERO

El establecimiento de una plantación de coco incluye un semillero, donde se germina la semilla, y el vivero, donde se desarrollan las palmitas para su posterior trasplante, lo que se muestra en la figura A.1.

- 1). La semilla se germina en un semillero, parcialmente enterrada en el suelo, preferiblemente sombreada y con una buena humedad. Se usa semilla seleccionada, cosechada de los racimos cuando comiencen a secarse. Nueces con poca cantidad de agua no germinan.
- 2). Después de algunas semanas aparecen los primeros gérmenes por encima del pericarpio. Sin embargo, el tiempo de germinación varía de tres semanas hasta tres meses en el caso de variedades enanas, y hasta seis meses en el caso de variedades alógamas.
- 3). Una vez germinada, se saca la nuez del semillero con un gancho de hierro para ser llevada al vivero.
- 4). En el caso de un vivero con bolsas de polietileno negro, se llenan primero las bolsas con suelo rico en materia orgánica hasta un poco más de la mitad. En su parte inferior, la bolsa está perforada.
- 5). Se coloca la semilla germinada encima de la tierra, en posición horizontal. Se agrega más tierra, apisonándola fuertemente con las manos alrededor de la semilla.
- 6). En el caso de variedades enanas, se colocan las bolsas a 50 x 50 cm en triángulo. Las bolsas con variedades altas deben separarse 60 X 60 cm.
- 7). También se pueden obtener palmitas en viveros en eras, con un ancho de 1.50 m. Las nueces germinadas se siembran en el suelo, una a continuación de la otra, en hileras. Se entierran un tercio de su diámetro, en posición horizontal, ligeramente inclinadas hacia el lado del brote.
- 8). Debe suministrarse a las palmitas un riego adecuado durante todo el tiempo que permanezcan en el vivero.
- 9). Alrededor de la nuez se aplica una mezcla de fertilizantes en el primero, tercero y sexto mes de la permanencia en el vivero. Ver figura A.1 donde se enumeran los pasos para generar semillas para plantación de cocoteros.

Luego de la siembra del cultivo de cobertura, se puede iniciar el trasplante de las palmitas.
(Sánchez Potes, 1987)

La operación de trasplante de las palmitas del vivero al sitio definitivo se realiza como de la siguiente forma (ver figura A.2):

- 1). Las palmitas seleccionadas para su trasplante a sitio definitivo, se arrancan del vivero con el mayor número de raíces y con algo de tierra. Si el vivero se ha hecho en bolsas, simplemente se llevan éstas al campo.
- 2). La siembra en triángulo o al tres bolillo se recomienda más que la siembra en cuadrado, pues permite un mejor aprovechamiento del terreno ya que el área del suelo a utilizar es menor.
- 3). Las variedades altas deben plantarse en triángulo de 9 m por 9 m. A esta distancia caben 143 palmas por hectárea, con calles de 7.80 m de ancho. Las variedades enanas se plantan en triángulo de 7 X 7 m de ancho. De esta manera caben 235 palmas por hectárea, con calles de 6 m de ancho.
- 4). El trazado triangular de la plantación, por ejemplo, a distancia de 7 X 7m de ancho, se realiza en la siguiente forma: se toma una línea base AB sobre la cual se clavan estacas cada 7 m. Con dos cuerdas de 7 m cada una se forma un triángulo, colocando el extremo de cada una de ellas en dos estacas consecutivas de la línea AB. En el vértice del triángulo se clava una estaca C. Para, determinar los siguientes sitios de siembra se procede de igual manera y al final se formará la línea CD, que a su vez servirá de base para trazar una nueva línea EF.
- 5). Trasplante. Una vez delimitados los sitios de siembra, se procede a hacer los agujeros. El tamaño de éstos debe ser de 60 X 60 X 60 cm. Si la palmita está en una bolsa, basta cortar ésta longitudinalmente y retirarla antes de plantarla.
- 6). Si proviene de viveros en eras, deberá manejarse con mayor cuidado.
- 7). La tierra que se saca de la superficie del agujero se coloca a un lado y aquella del fondo, en otro lado.
- 8). Al plantar la palmita proveniente del vivero en eras, la tierra de la superficie se echa en el fondo del agujero. Encima de ella se coloca con mucho cuidado la palma, teniendo la precaución de que la nuez que va adherida a ella quede al ras del suelo. Luego, se agrega la tierra de la superficie del agujero alrededor de la palma, afirmándola para llenar todos los espacios. Véase figura A.2 donde establecen los diferentes pasos para el trasplante y establecimiento de una plantación de cocotero. (Sánchez Potes, 1987)

A.1 RENOVACIÓN DE PLANTACIONES

Después de unos 50 a 60 años, el rendimiento de la plantación disminuye considerablemente y la cosecha se dificulta por la altura de las palmas. Se debe entonces renovar la plantación progresivamente, en un período de 8 a 10 años.

Las palmas viejas se eliminan con un zapapico. Se hacen 3 huecos alrededor del tronco, separados unos 30 cm entre el primer hueco se hace a la altura de la rodilla, el segundo a la altura de la cintura y el tercero a la altura del pecho. Por medio de un embudo se reparten 50 cm cúbicos de un mataarbustos, ácido picolínico. Se tapan los huecos con tapones de madera. En pocas semanas, las palmas se secan.

A medida que se van eliminando las palmas, se inicia la replantación del nuevo cocotal en las interlíneas. Ver en figura A.3 la forma de hacer los agujeros para eliminar las palmas de coco improductivas. (Sánchez Potes, 1987)

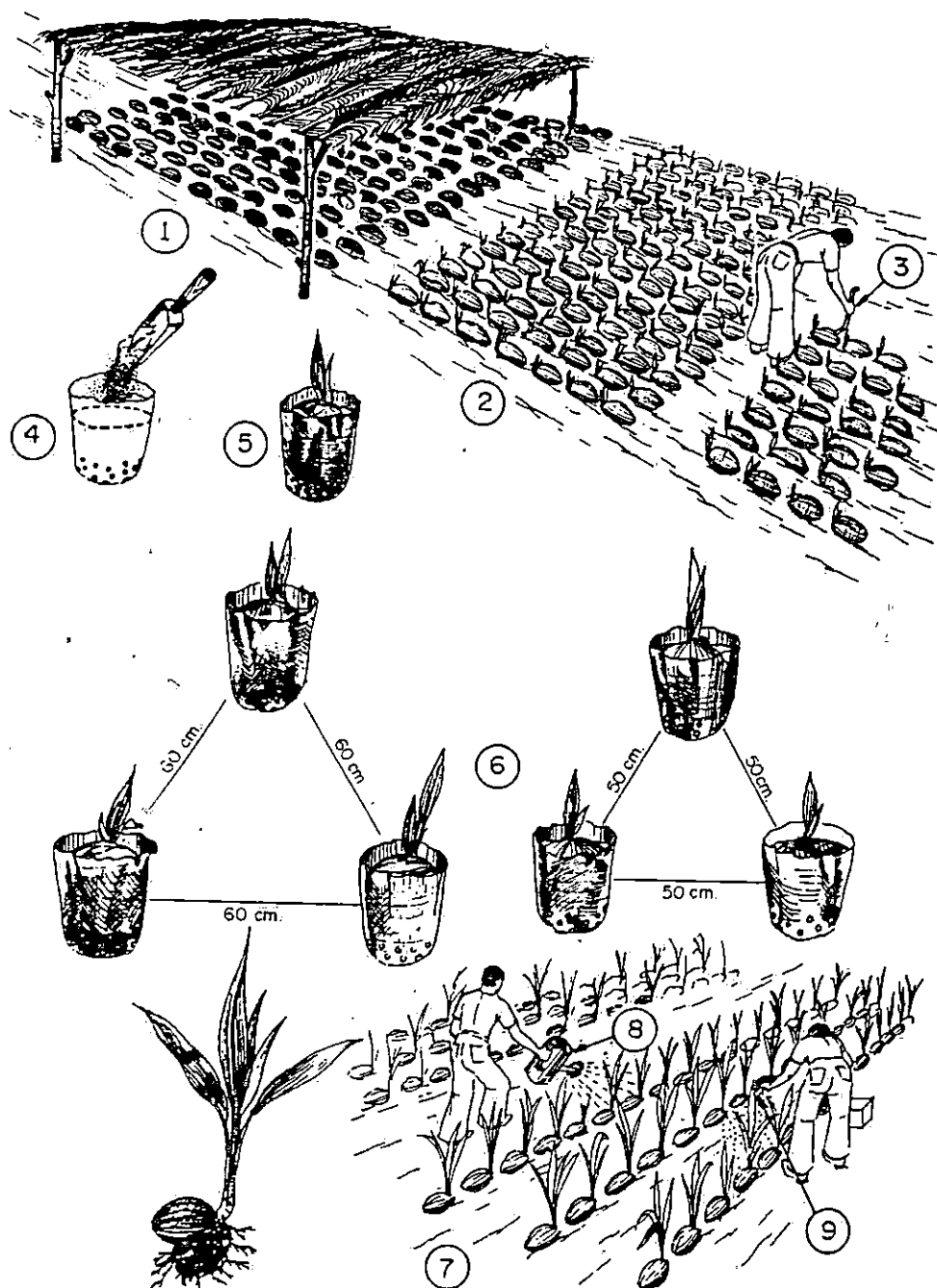


Figura A.1. Creación de un vivero de palmas de coco. (Sánchez Potes, 1987)

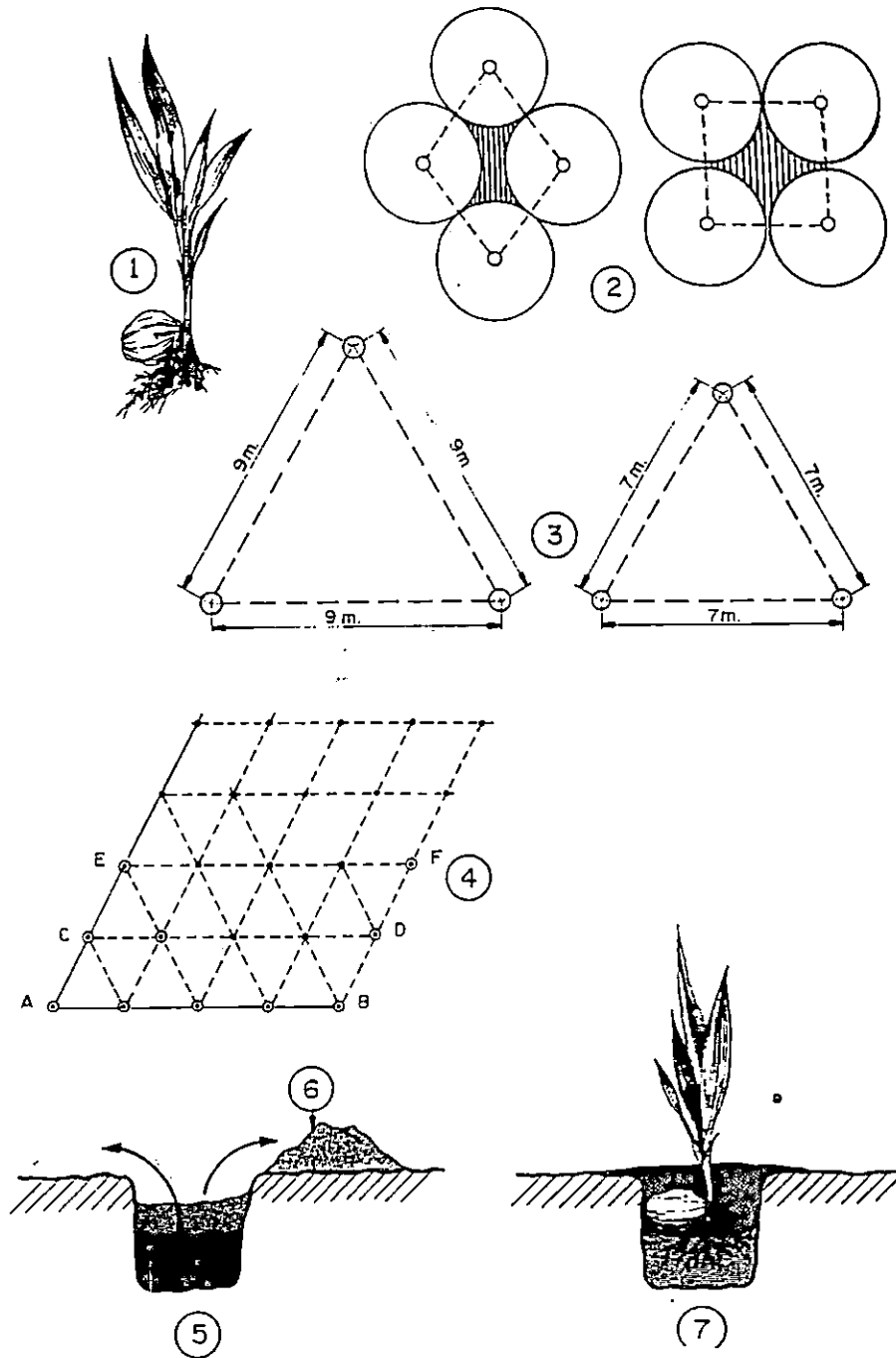


Figura A.2 Establecimiento de una plantación de cocotero. (Sánchez Potes, 1987)



Figura A.3. Perforación de agujeros en palmas de coco a eliminar.
(Sánchez Potes, 1987)

ANEXO B

ANÁLISIS DE CALIDAD PARA VINAGRES

ANÁLISIS DE CALIDAD PARA VINAGRES

Los principales tipos de análisis requeridos en muestras de vinagre y productos artificiales de acuerdo con requerimientos legales se presentan a continuación, siendo aconsejable examinar las muestras en el siguiente orden: acidez total, cenizas, preservativos, arsénicos, cobre, plomo, zinc, valor de oxidación alcalina. En la tabla B1 se presentan perfiles analíticos aceptados por muchos años como típicos para varios tipos de vinagre. (Figueroa, et al. 1994)

- a) Gravedad específica. Un vinagre conteniendo 5% de ácido acético tendrá una gravedad específica de 1.019.
- b) Acidez total. Diluir 10 ml de una muestra de vinagre con agua en un tazón de porcelana, añadir fenolftaleína y titular con Hidróxido de sodio 0.5 M. Agitar constantemente.

$$\text{Acidez total: titulación} \times 0.3 = \% \text{ p/v como ácido acético}$$

La acidez total no debe ser menor de 4%. Productos de buena calidad tienen un mínimo de 5%. La actividad de microorganismos y anguillulas de vinagre causan disminución en la acidez.

- c) Acidez volátil. Destilar 10 ml de la muestra en un aparato de destilación Kjeldhal y titular el destilado con Hidróxido de sodio 0.5 M utilizando fenolftaleína como indicador. A la vez evaporar 10 ml de muestra un mínimo de 5 veces con agua, titular la acidez fijada y calcular la acidez volátil por diferencia.
- d) Sólidos totales. Evaporar 25 ml de muestra en un disco de platino y secar a peso constante en un horno a 100 °C. la acidez volátil que tiende a quedar particularmente en los sólidos totales, puede ser removida por tres evaporaciones con agua.
- e) Cenizas. Encender los sólidos totales a la más baja temperatura posible. Si gran cantidad de cenizas son obtenidas, las sales también pueden ser determinadas.
- f) Nitrógeno. Se determina por el método de Kjeldhal en 25 ml de muestra. La titulación con formol también puede ser aplicada.
- g) Fosfatos. Se determina de las cenizas o preferiblemente después de la oxidación por vía húmeda.

- h) Metales. Se examina la muestra para arsénico, cobre, plomo y zinc.
- i) Acidez mineral. Trazas de sulfato están usualmente presentes en el vinagre, pero si exceden de 0.03 % (como ácido sulfúrico) se debe tener precaución. La presencia de acidez mineral puede ser detectada por la siguiente prueba: mezclar dos ml de muestra con dos ml de alcohol y añadir dos gotas de anaranjado de Metilo un color rojo indica un bajo pH debido a la presencia de acidez mineral. El pH de productos conteniendo 4% de ácido acético raras veces disminuye a 2.9 para vinagre de Malta y 2.5 para productos artificiales.

El ácido sulfúrico presente puede ser estimado por el método de Hehner; el cual está basado en el hecho de que las cenizas de vinagre genuino presenta reacción alcalina. La presencia de acidez mineral es improbable si la ceniza es alcalina al tornasol. (Figuroa, et al. 1994)

Cuadro B1. Perfiles típicos de vinagres y condimentos no fermentados.

	Vinagre de Malta	Condimento no fermentado	Vinagre de Sidra	Vinagre de Vino	Vinagre espirituoso concentrado
Gravedad especifica	1.013-1.022	1.007-1.022	1.013-1.024	1.013-1.021	0.015-1.020
Acidez total como ácido acético (%)	4.3 -5.9	4.1-5.3	3.9-9	4.4-7.4	11.5-12.2
Acidez fija como ácido acético (%)	0.2 - 0.4	Despreciable	0.1-0.2	-----	-----
Acido málico (%)	-----	-----	0.07-0.16	-----	-----
Sólidos totales (%)	1.4-3.5	0.1-0.45	1.9-3.5	1.4-3.2	0.15-0.6
Cenizas totales (%)	0.18-0.45	0.02-0.05	0.2-0.45	0.16-0.69	0.02-0.05
Alcalinidad de cenizas (ml 0.01 N/ml)	-----	-----	2.2-4	-----	-----
Nitrógeno total (%)	0.04-0.14	0.0-0.02	-----	-----	0.003-0.03
Acido fosfórico como P ₂ O ₅ (%)	0.05-0.12	0.0-0.02	0.04-0.3	-----	0.05
SO ₃ (%)	0.05-0.12	0.0-0.01	-----	-----	-----
NaCl (%)	0.15-0.25	0.01-0.12	-----	-----	-----
Azúcares totales (%)	-----	-----	0.15-0.7	0.22-0.56	-----
Alcohol (% v/v)	-----	-----	0.03	-----	0.15
Índice de oxidación	500-1800	0.0-20	Arriba de 3500	600-2000	90-650 (1)
Índice de oxidación alcalina	70-180	0-10	-----	60-180	3-20 (1)
Índice de yodo	380-1500	0-25	-----	380-1000	5-30 (1)
Índice de ésteres	30-140	0-15	-----	50-220	0-20 (1)

(1) calculado para 5% de ácido acético

(Figuroa, et al. 1994)

ANEXO C

VALOR NUTRITIVO DEL DULCE DE PANELA

VALOR NUTRITIVO DEL DULCE DE PANELA

Según estudios en la Estación Agrícola Experimental de Palmira, en Colombia, la panela es un producto integral obtenido por evaporación abierta de los jugos de la caña de azúcar.

Una definición de panela dada por esta dependencia es: una mezcla de sacarosa y glucosa y una buena cantidad de materiales minerales que la caña ha extraído del suelo y que pasan a la panela (Aguilar et al, 1999); cuya composición se presenta en el cuadro C.1

Cuadro C.1. Principales componentes de la panela.

Componente	Porcentaje
Sacarosa	51.82
Glucosa	16.37
Cenizas	0.17
Agua	27.64
Minerales	4.00

(Aguilar et al, 1999)

Las levaduras se alimentan de glucosa, por lo que resulta mas conveniente el utilizar dulce de panela, debido a que en esta la glucosa se encuentra un 16.37% en forma libre; no así al adicionar azúcar, ya que al usarla para corregir el sustrato, la levadura tendría que separar las moléculas de glucosa y fructosa que conforman el azúcar (sacarosa), para poder obtener la glucosa que necesita para alimentarse.

ANEXO D

**ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LA
PRODUCCIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO EN
MUESTRAS DE AGUA DE COCO.**



Nueva San Salvador, 31 de agosto de 2000.

Señores:
Escuela de Ingeniería Química
Universidad de El Salvador.

Atención:
Licda. Ana Isabel Pereira de Ruiz

Por medio de la presente estamos informando los resultados de Análisis Químico efectuados a las muestras procedentes del Trabajo de Investigación realizado en agua de coco por un grupo de estudiantes de la Carrera Ingeniería Química:

Identificación: Día 1

Réplica No.	Resultado	Método	Expresado como
1	2.52	GC	% V/V
2	2.55	GC	% V/V
3	2.56	GC	% V/V

Identificación: Día 2

Réplica No.	Resultado	Método	Expresado como
1	7.02	GC	% V/V
2	7.12	GC	% V/V
3	7.24	GC	% V/V

Identificación: Día 3

Réplica No.	Resultado	Método	Expresado como
1	8.13	GC	% V/V
2	8.57	GC	% V/V
3	7.99	GC	% V/V

Identificación: Día 4

Réplica No.	Resultado	Método	Expresado como
1	10.17	GC	% V/V
2	11.23	GC	% V/V
3	11.13	GC	% V/V

Identificación: Día 5

Réplica No.	Resultado	Método	Expresado como
1	9.56	GC	% V/V
2	10.11	GC	% V/V
3	10.42	GC	% V/V

NOTAS:

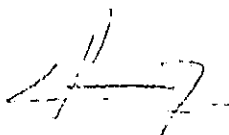
% V/V: porcentaje volumen/volumen

Los resultados reportados corresponden a la muestra indicada en Identificación.

Métodología de Análisis:

GC: Cromatografía de Gases con Detector Selectivo de Masas.

Atentamente,
GEOTERMICA SALVADOREÑA S.A. de C.V.

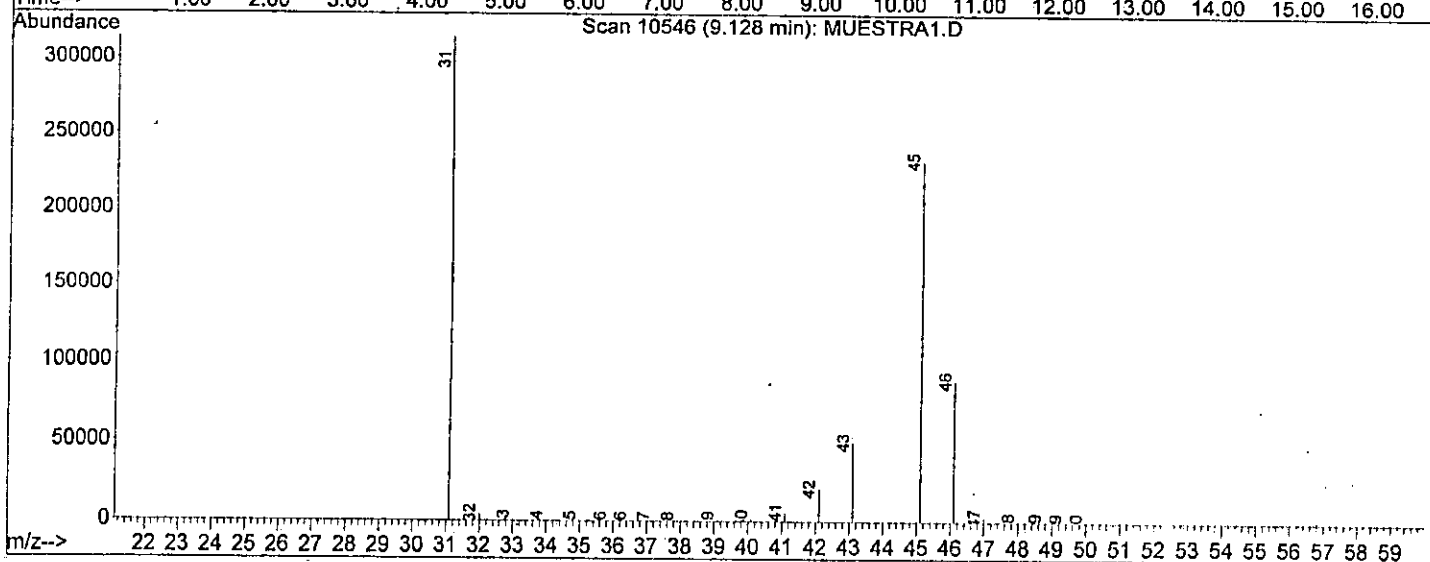
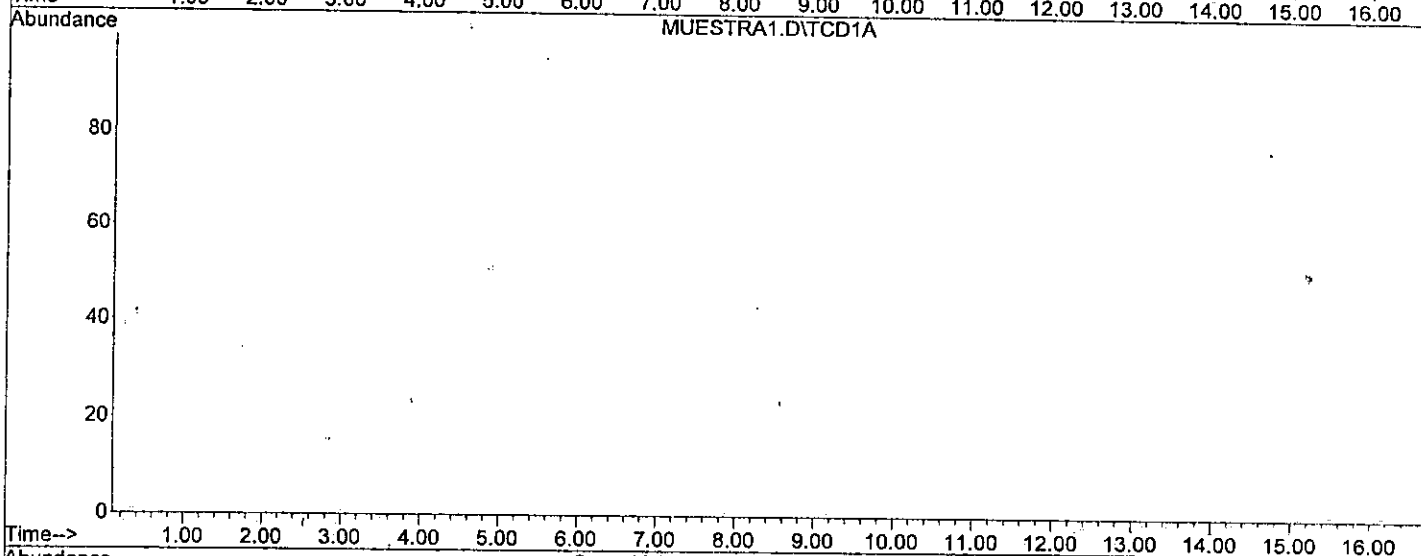
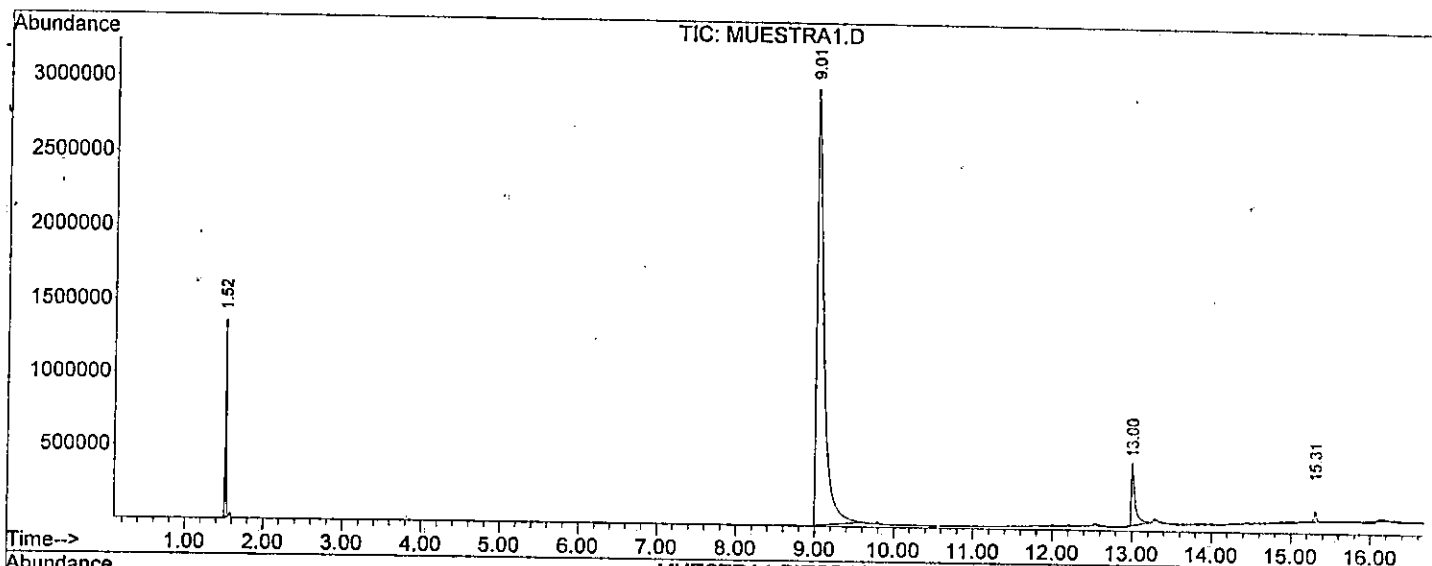


Roberto Enrique Renderos
Coordinador de Laboratorio Químico



File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MUESTRA1.D
Operator : R.RENDEROS
Acquired : 23 Aug 2000 16:57 using AcqMethod ETANOL
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: MUESTRA 1 DIA 1
Misc Info : 23 AGOSTO 2000
Vial Number: 1

120



Data File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MUESTRA1.D
Acq On : 23 Aug 2000 16:57
Sample : MUESTRA 1 DIA 1
Misc : 23 AGOSTO 2000

Vial: 1
Operator: R.RENDEROS
Inst : GC/MS Ins
Multiplr: 1.00
Sample Amount: 0.00
MS Integration Params: autoint1.e
GC Integration Params: autoint2.e

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GEOGAS.M (Chemstation Integrator)
Title : GASES PERMANENTES

Signal : TIC

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	1.520	1621	1666	1718	BV	1347918	12444231	6.94%	6.015%
2	9.011	10359	10410	11098	BB 2	2877437	179230369	100.00%	86.635%
3	13.002	14946	15068	15327	BB	426611	13470009	7.52%	6.511%
4	15.307	17467	17758	17852	BB 4	68480	1735491	0.97%	0.839%

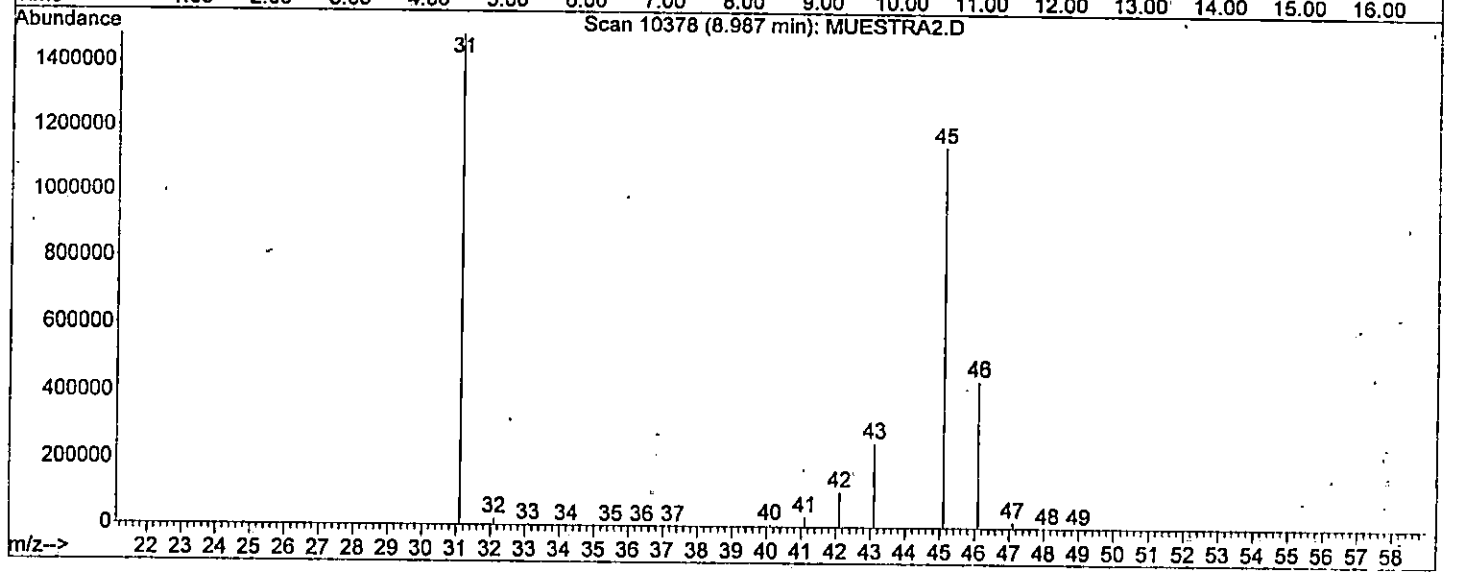
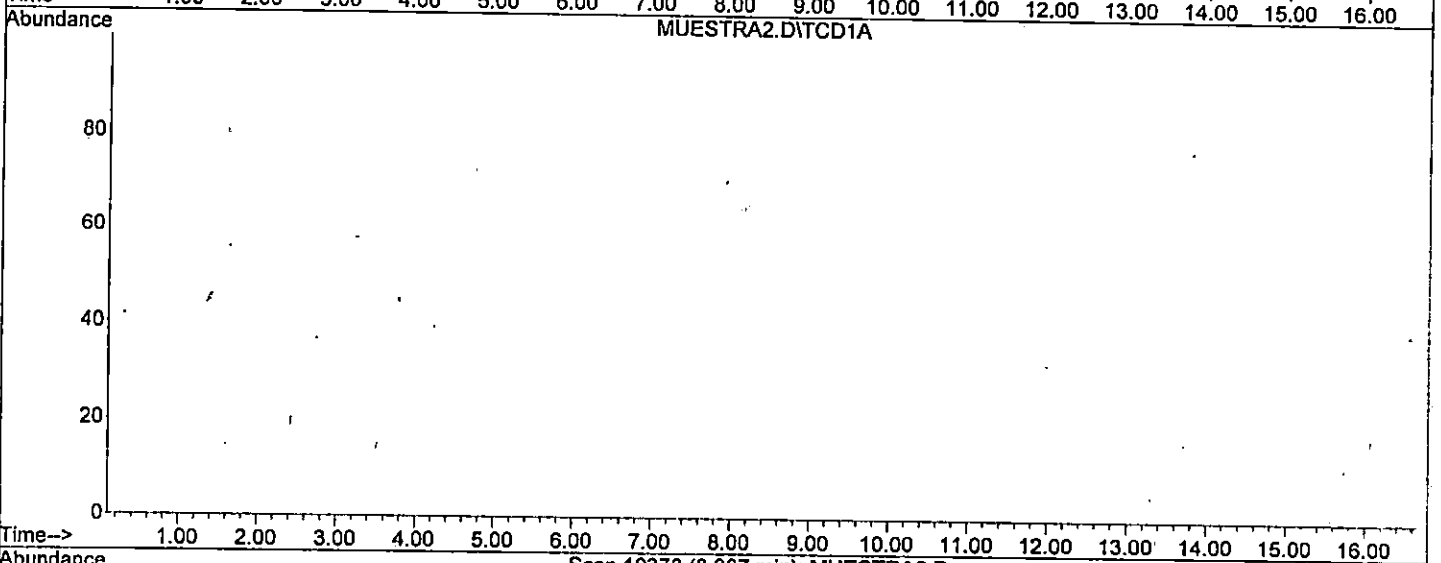
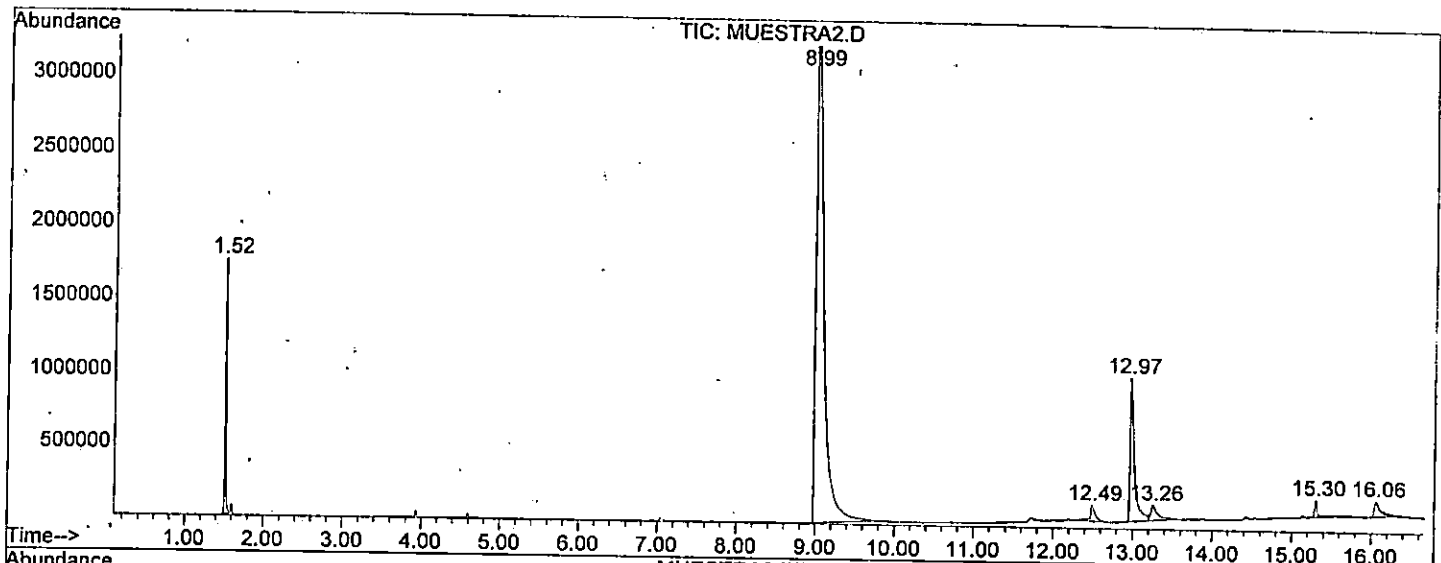
Sum of corrected areas: 206880101

Signal : MUESTRA1.D\TCD1A

peak #	R.T. min	Start min	End min	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
--------	----------	-----------	---------	-------	-------------	------------	--------------	------------

No peaks were detected using the method integration parameters!
MUESTRA1.D GEOGAS.M Wed Aug 23 17:21:20 2000

File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MUESTRA2.D
Operator : R.RENDEROS
Acquired : 23 Aug 2000 17:32 using AcqMethod ETANOL
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: MUESTRA 2 DIA 1
Misc Info : 23 AGOSTO 2000
Vial Number: 1



Data File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MUESTRA2.D
 Acq On : 23 Aug 2000 17:32
 Sample : MUESTRA 2 DIA 1
 Misc : 23 AGOSTO 2000

Vial: 1
 Operator: R.RENDEROS
 Inst : GC/MS Ins
 Multiplr: 1.00
 Sample Amount: 0.00
 GC Integration Params: autoint2.e

MS Integration Params: autoint1.e

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GEOGAS.M (Chemstation Integrator)
 Title : ALCOHOL ETILICO

Signal : TIC

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	1.516	1615	1658	1731	BV	1594672	16461766	6.97%	5.332%
2	8.989	10322	10380	11271	BB 4	3515203	236054216	100.00%	76.465%
3	12.490	14267	14466	14726	BB 3	105094	5000826	2.12%	1.620%
4	12.972	14967	15029	15300	BV 2	938715	36660852	15.53%	11.876%
5	13.257	15300	15362	15706	VB 3	95700	6547508	2.77%	2.121%
6	15.303	17651	17749	17893	BB 3	107324	2547204	1.08%	0.825%
7	16.060	18468	18633	18935	BB 9	95337	5437585	2.30%	1.761%

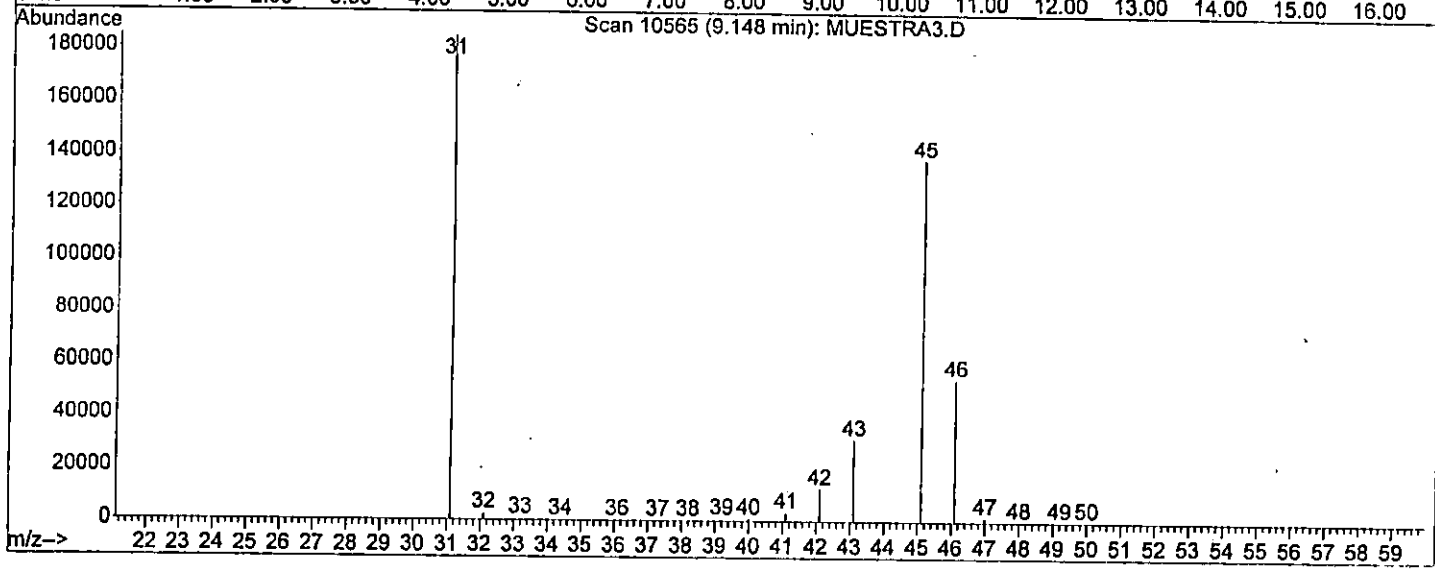
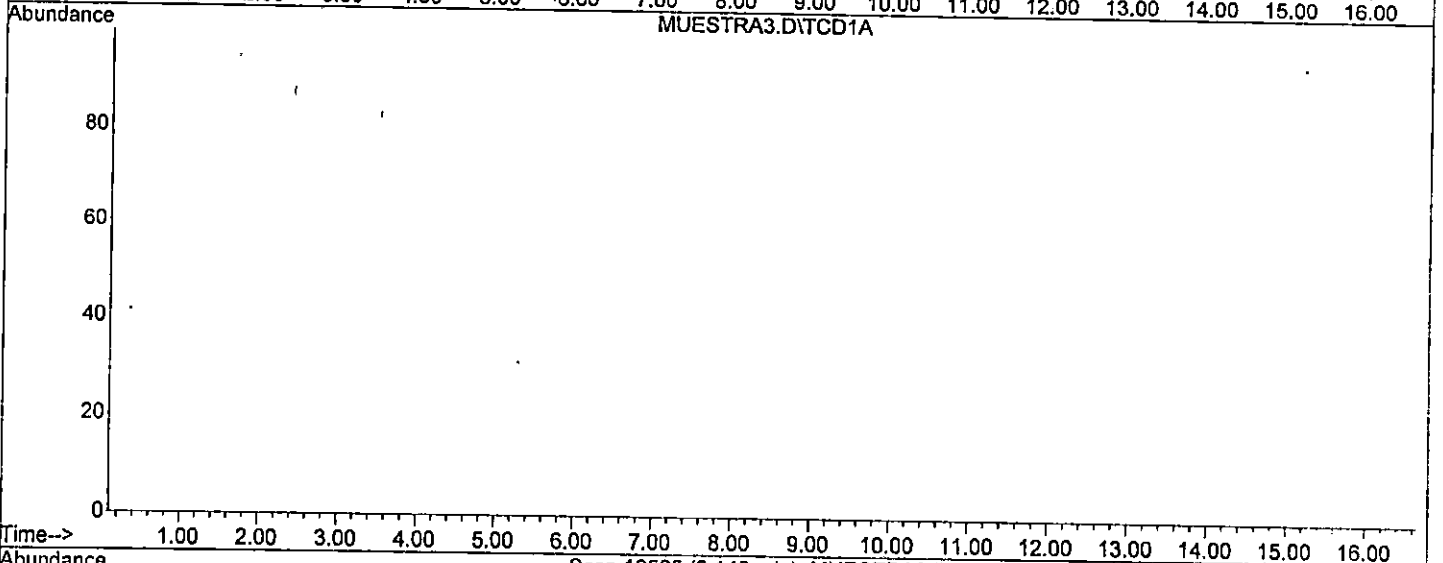
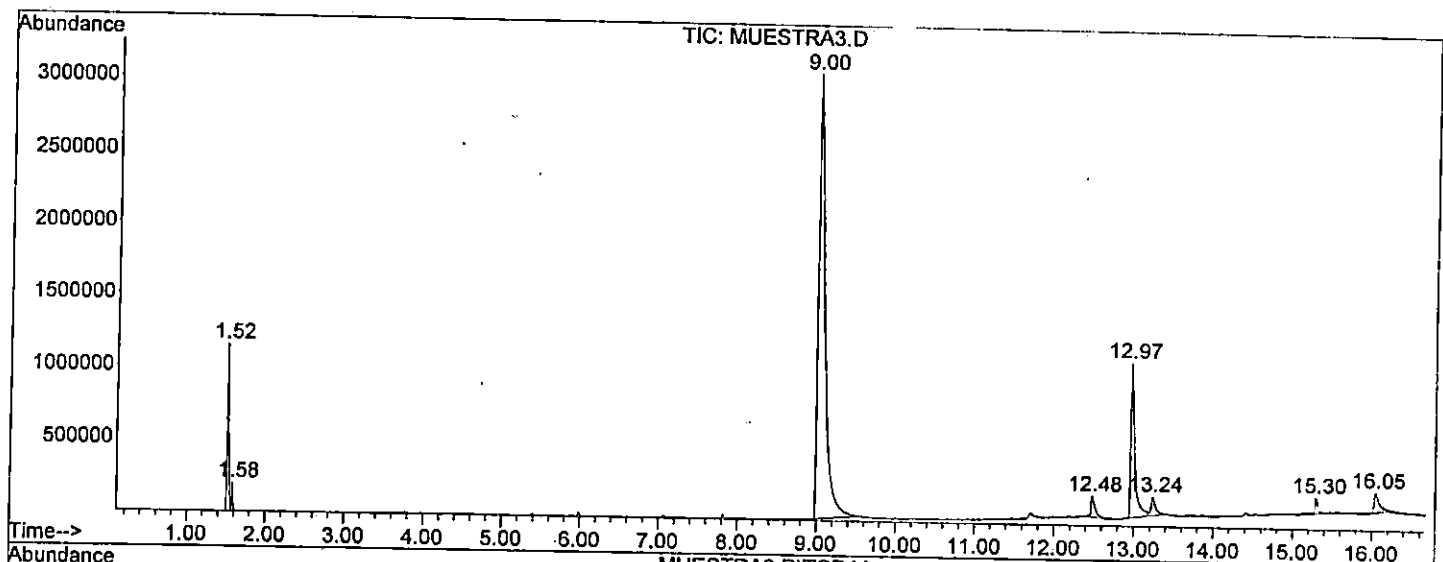
Sum of corrected areas: 308709956

Signal : MUESTRA2.D\TCD1A

peak #	R.T. min	Start min	End min	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
---	---	---	---	---	---	---	---	---

No peaks were detected using the method integration parameters!
 MUESTRA2.D GEOGAS.M Wed Aug 23 17:58:23 2000

File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MUESTRA3.D
Operator : R.RENDEROS
Acquired : 23 Aug 2000 18:04 using AcqMethod ETANOL
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: MUESTRA 3 DIA 1
Misc Info : 23 AGOSTO 2000
Vial Number: 1



Data File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MUESTRA3.D
 Acq On : 23 Aug 2000 18:04
 Sample : MUESTRA 3 DIA 1
 Misc : 23 AGOSTO 2000

Vial: 1
 Operator: R.RENDEROS
 Inst : GC/MS Ins
 Multiplr: 1.00

Sample Amount: 0.00

MS Integration Params: autoint1.e

GC Integration Params: autoint2.e

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GEOGAS.M (Chemstation Integrator)
 Title : GASES PERMANENTES

Signal : TIC

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	1.518	1617	1660	1718	BV	1096791	15543475	8.56%	6.092%
2	1.584	1718	1737	1862	VB	196098	1959033	1.08%	0.768%
3	9.000	10273	10393	11024	BB	3020253	181621217	100.00%	71.186%
4	12.480	14315	14454	14697	BB 2	138253	5358720	2.95%	2.100%
5	12.966	14907	15021	15272	BV 2	1028593	37015976	20.38%	14.508%
6	13.241	15272	15342	15514	VB 2	118698	5002227	2.75%	1.961%
7	15.300	17424	17745	17828	BB 2	107977	2468590	1.36%	0.968%
8	16.046	18470	18616	18848	BB 9	135293	6166492	3.40%	2.417%

Sum of corrected areas: 255135730

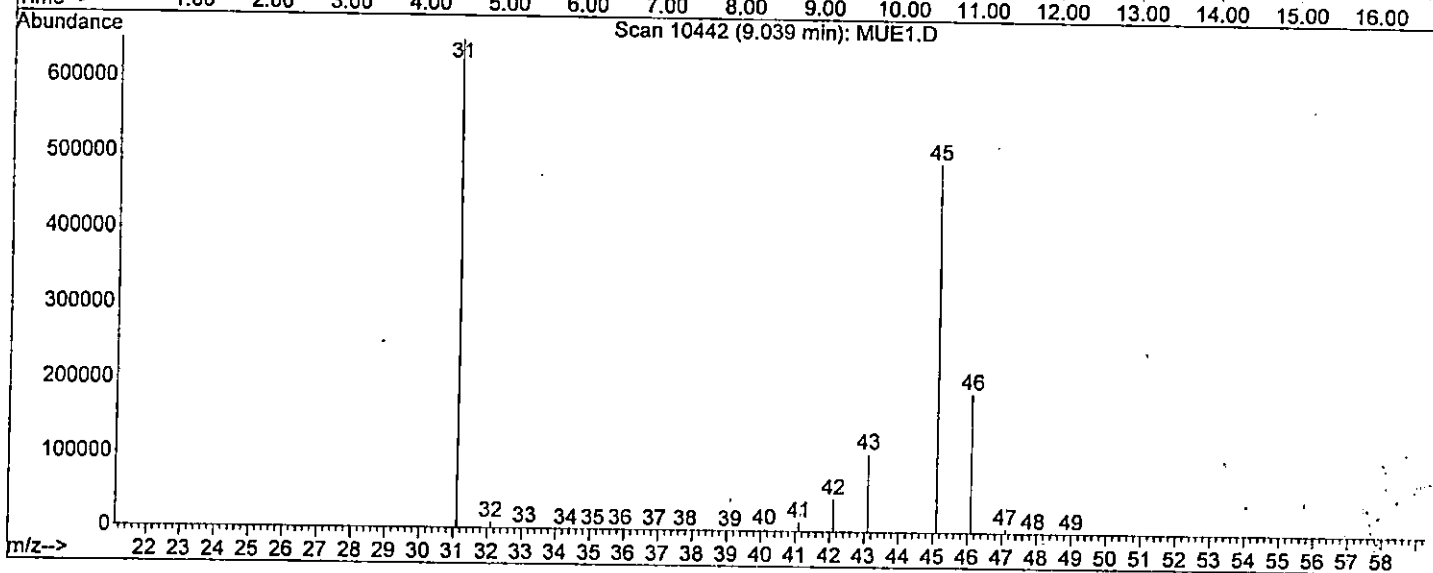
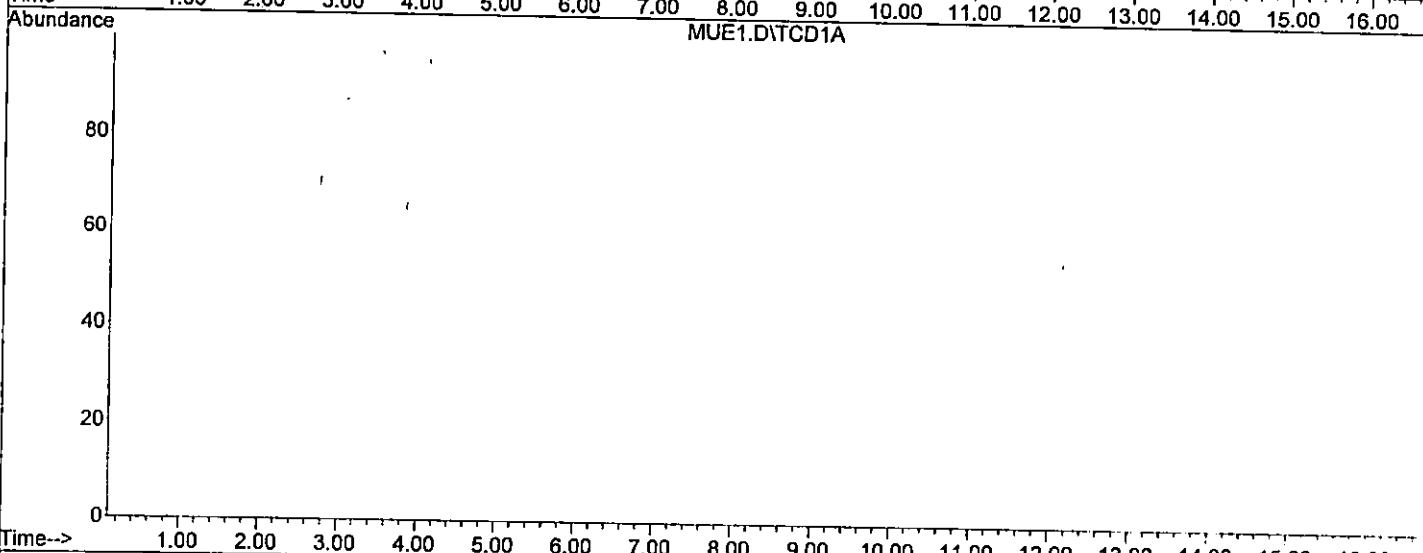
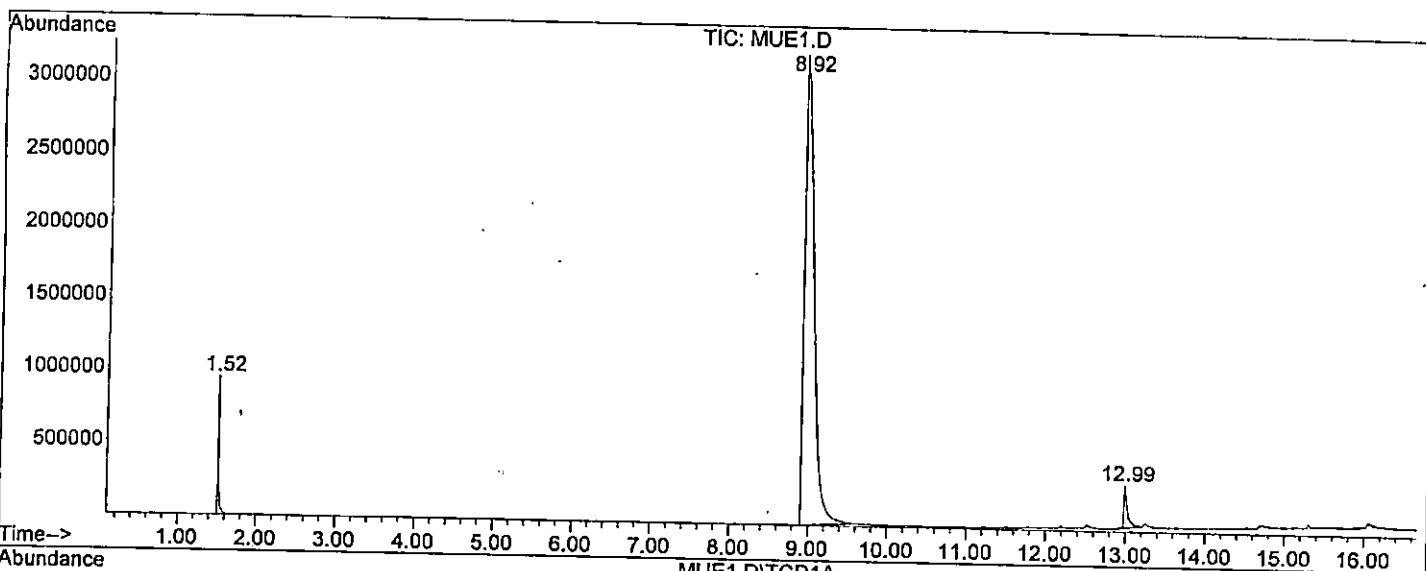
Signal : MUESTRA3.D\TCD1A

peak #	R.T. min	Start min	End min	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
--------	----------	-----------	---------	-------	-------------	------------	--------------	------------

No peaks were detected using the method integration parameters!
 MUESTRA3.D GEOGAS.M Thu Aug 24 13:24:52 2000

File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MUE1.D
Operator : R.RENDEROS
Acquired : 24 Aug 2000 14:44 using AcqMethod ETANOL
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: MUESTRA 1 DIA 2
Misc Info : 24 AGOSTO 2000
Vial Number: 1

125



Area Percent Report

Data File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MUE1.D
 Acq On : 24 Aug 2000 14:44
 Sample : MUESTRA 1 DIA 2
 Misc : 24 AGOSTO 2000

Vial: 1
 Operator: R.RENDEROS
 Inst : GC/MS Ins
 Multiplr: 1.00
 Sample Amount: 0.00
 GC Integration Params: autoint2.e

MS Integration Params: autoint1.e

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GEOGAS.M (Chemstation Integrator)
 Title : ALCOHOL ETILICO

Signal : TIC

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	1.520	1599	1666	1802	BB	855527	9729096	3.60%	3.372%
2	8.920	10260	10303	11123	BB 3	3181599	270118215	100.00%	93.628%
3	12.994	14881	15058	15294	BV	275055	8654712	3.20%	3.000%

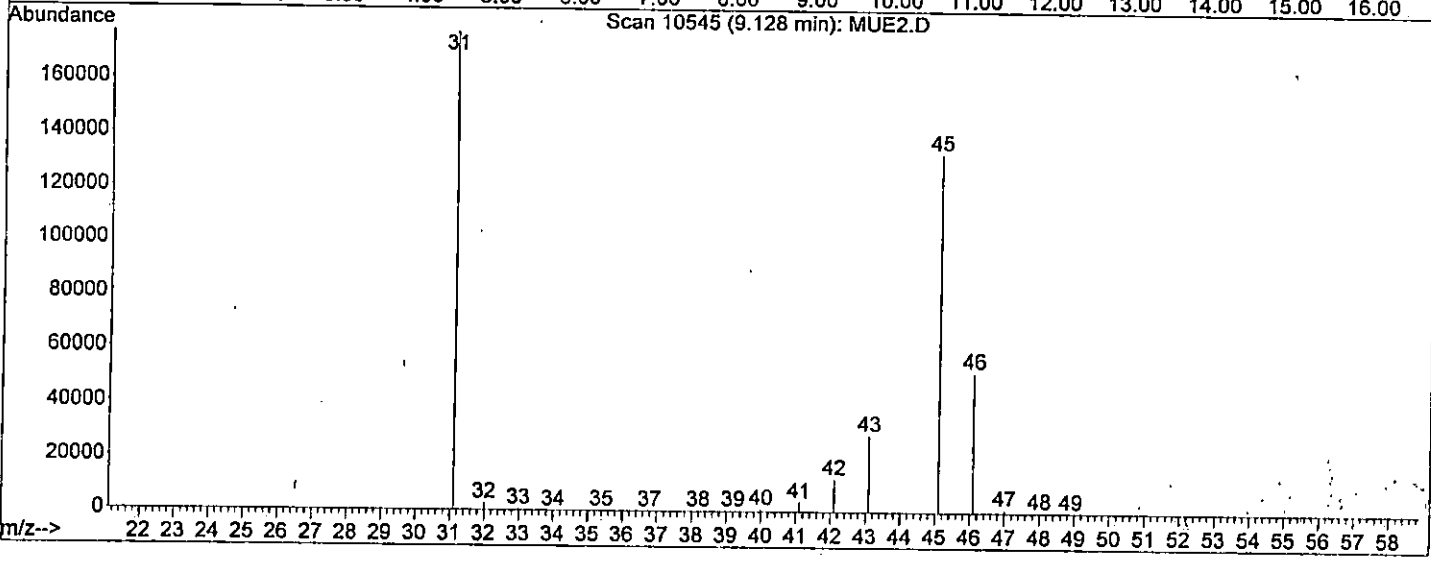
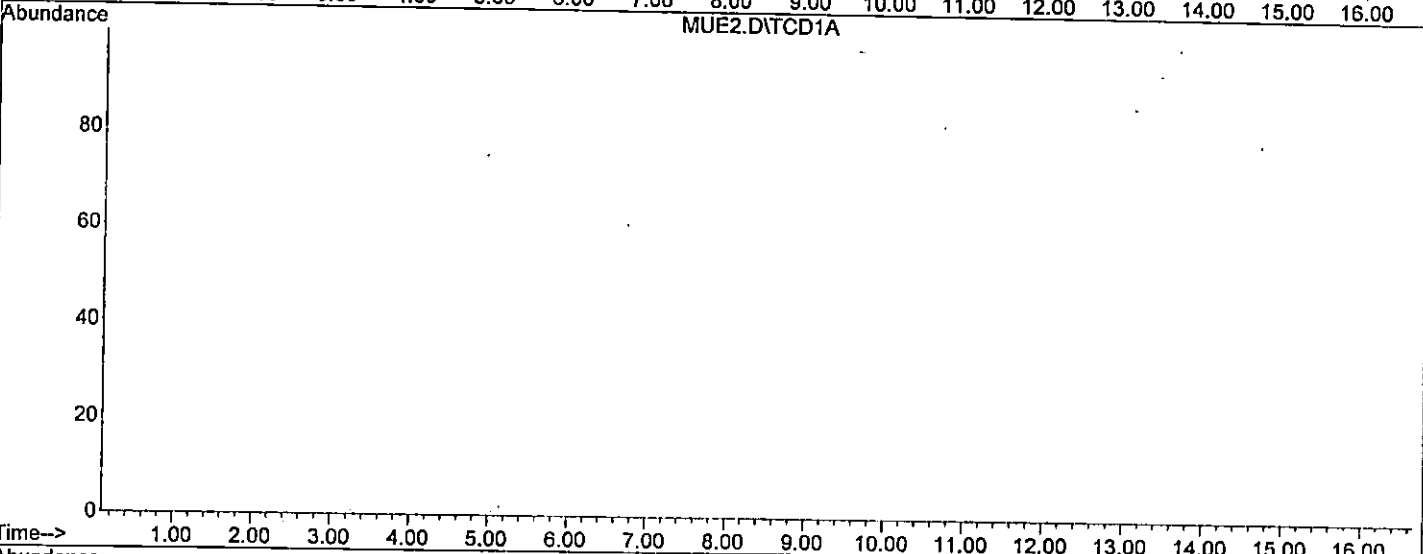
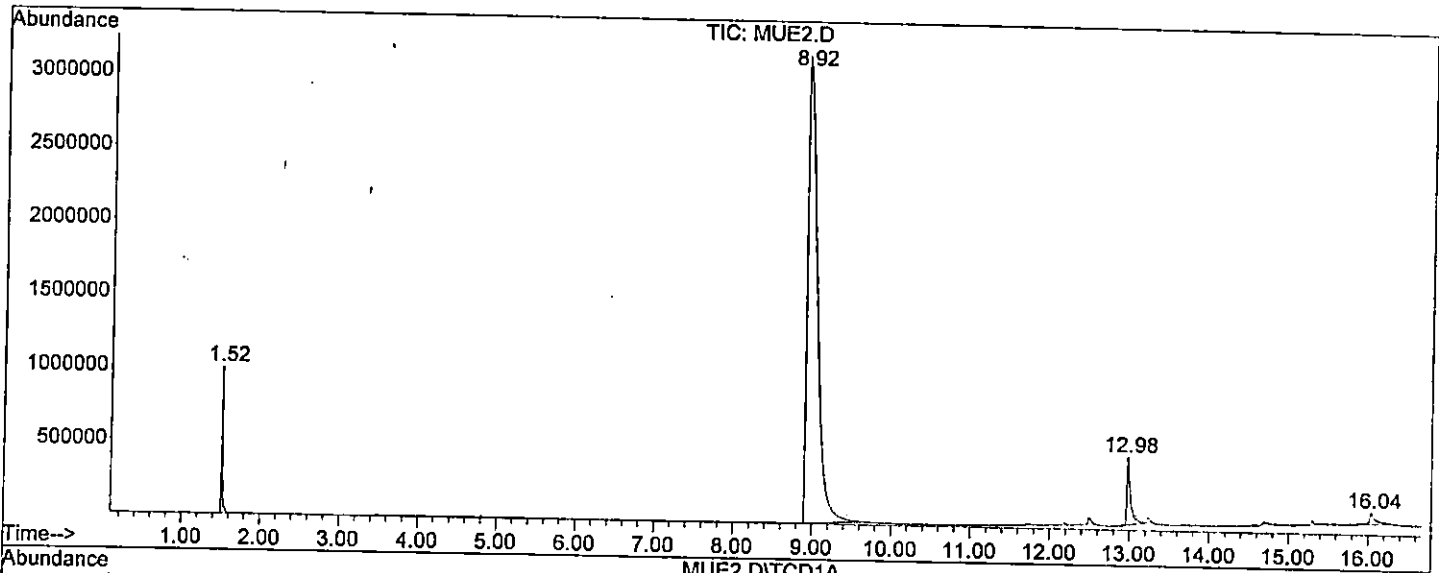
Sum of corrected areas: 288502022

Signal : MUE1.D\TCD1A

peak #	R.T. min	Start min	End min	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
--------	----------	-----------	---------	-------	-------------	------------	--------------	------------

No peaks were detected using the method integration parameters!
 MUE1.D GEOGAS.M Thu Aug 24 15:05:45 2000

File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MUE2.D
Operator : R.RENDEROS
Acquired : 24 Aug 2000 15:09 using AcqMethod ETANOL
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: MUESTRA 2 DIA 2
Misc Info : 24 AGOSTO 2000
Vial Number: 1



Data File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MUE2.D
Acq On : 24 Aug 2000 15:09
Sample : MUESTRA 2 DIA 2
Misc : 24 AGOSTO 2000

Vial: 1
Operator: R.RENDEROS
Inst : GC/MS Ins
Multiplr: 1.00
Sample Amount: 0.00

MS Integration Params: autoint1.e

GC Integration Params: autoint2.e

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GEOGAS.M (Chemstation Integrator)
Title : ALCOHOL ETILICO

Signal : TIC

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	1.519	1623	1664	1794	BB	961260	9694742	3.54%	3.213%
2	8.918	10252	10300	11154	BB 3	3160159	273835538	100.00%	90.750%
3	12.979	14843	15039	15286	BV 2	452728	13984538	5.11%	4.635%
4	16.044	18188	18617	18928	BB 9	72455	4233711	1.55%	1.403%

Sum of corrected areas: 301748528

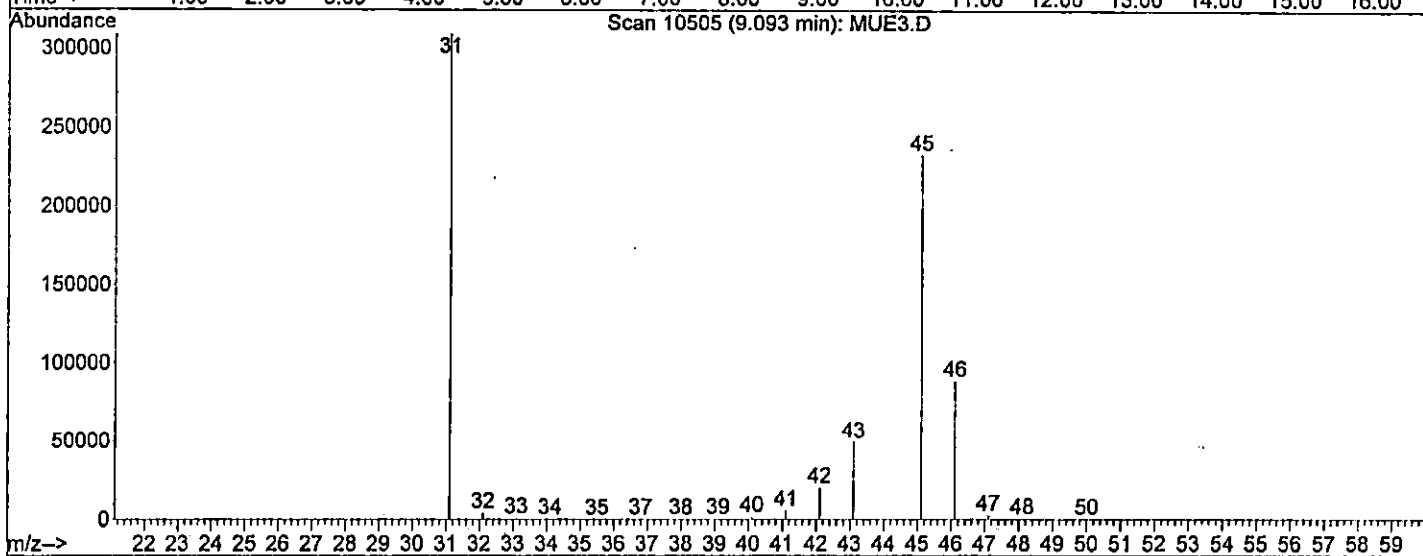
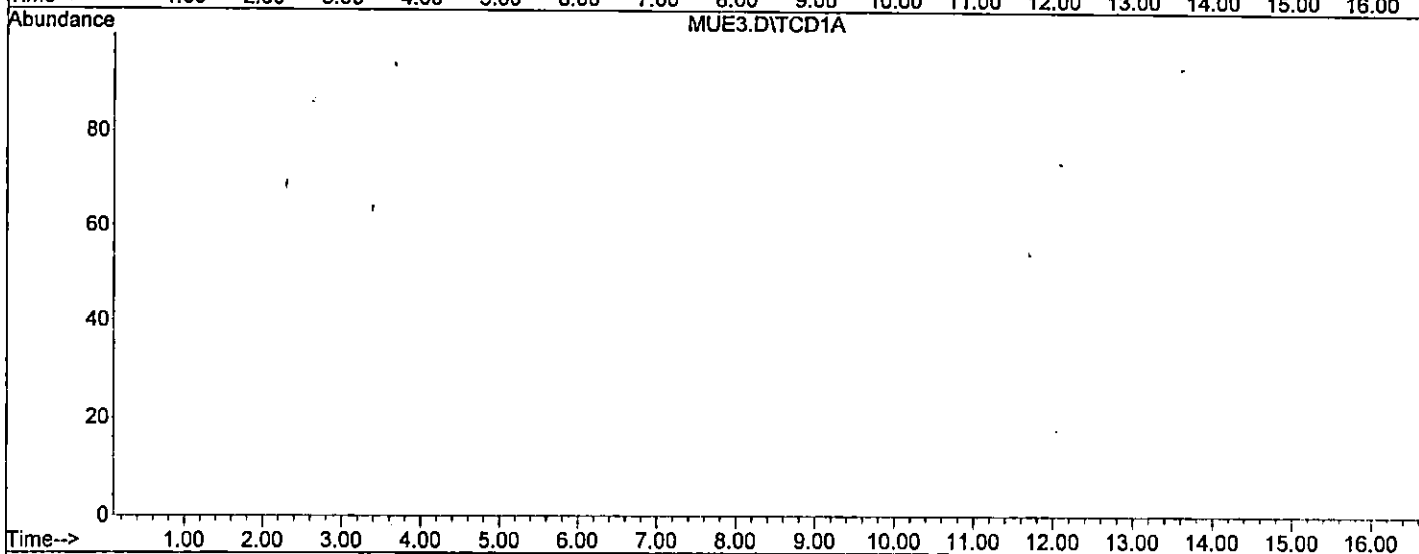
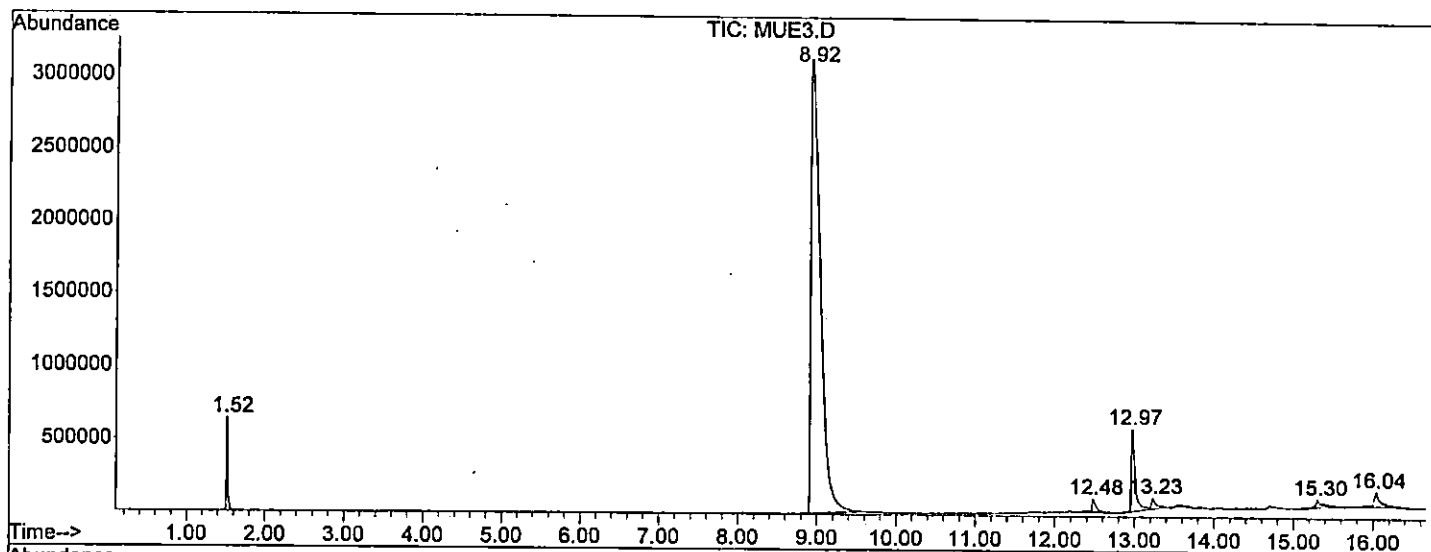
Signal : MUE2.D\TCD1A

peak #	R.T. min	Start min	End min	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
--------	----------	-----------	---------	-------	-------------	------------	--------------	------------

No peaks were detected using the method integration parameters!
MUE2.D GEOGAS.M Thu Aug 24 15:36:50 2000

File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MUE3.D
Operator : R.RENDEROS
Acquired : 24 Aug 2000 15:47 using AcqMethod ETANOL
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: MUESTRA 3 DIA 2
Misc Info : 24 AGOSTO 2000
Vial Number: 1

130



Data File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MUE3.D
 Acq On : 24 Aug 2000 15:47
 Sample : MUESTRA 3 DIA 2
 Misc : 24 AGOSTO 2000

Vial: 1
 Operator: R.RENDEROS
 Inst : GC/MS Ins
 Multiplr: 1.00
 Sample Amount: 0.00
 GC Integration Params: autoint2.e

MS Integration Params: autoint1.e

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GEOGAS.M (Chemstation Integrator)
 Title : ALCOHOL ETILICO

Signal : TIC

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	1.517	1615	1663	1771	BB	621994	6962034	2.69%	2.327%
2	8.922	10244	10306	11092	BB 3	3086136	258657779	100.00%	86.465%
3	12.483	14251	14462	14702	BB 2	85737	3437936	1.33%	1.149%
4	12.970	14874	15030	15271	BV 2	542759	18660725	7.21%	6.238%
5	13.232	15271	15336	15543	VB 2	71354	3243983	1.25%	1.084%
6	15.300	17402	17750	18002	BB 5	50442	2353981	0.91%	0.787%
7	16.037	18282	18610	18935	BB 7	102061	5829516	2.25%	1.949%

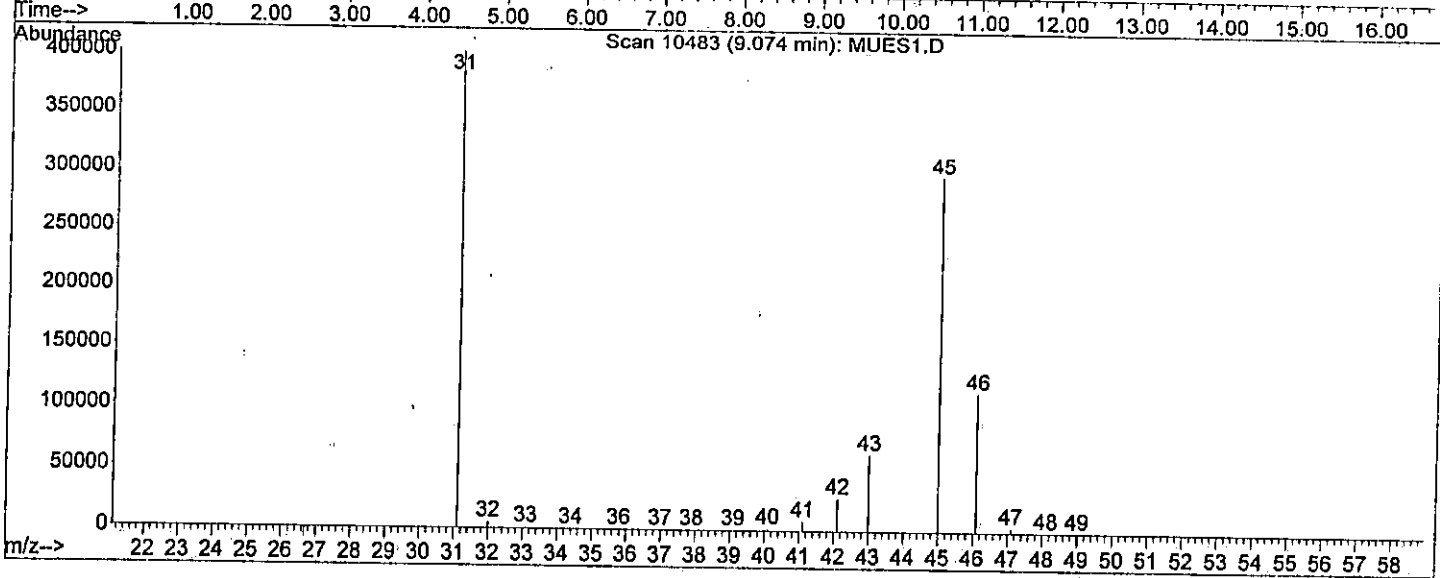
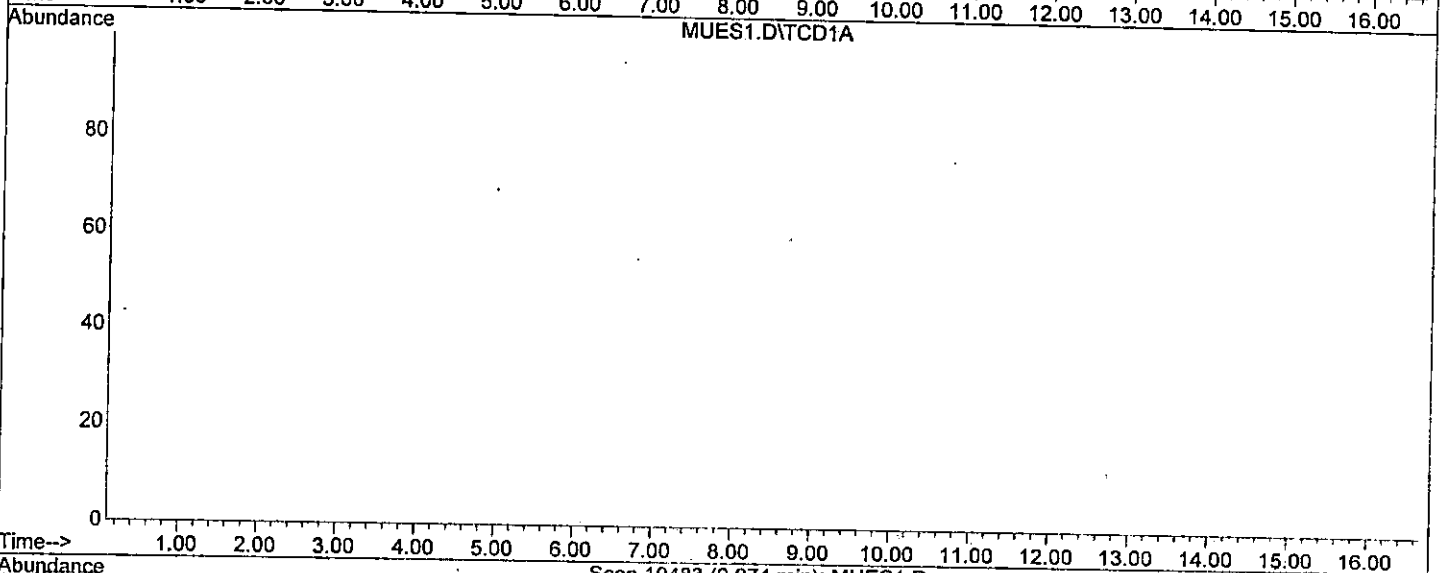
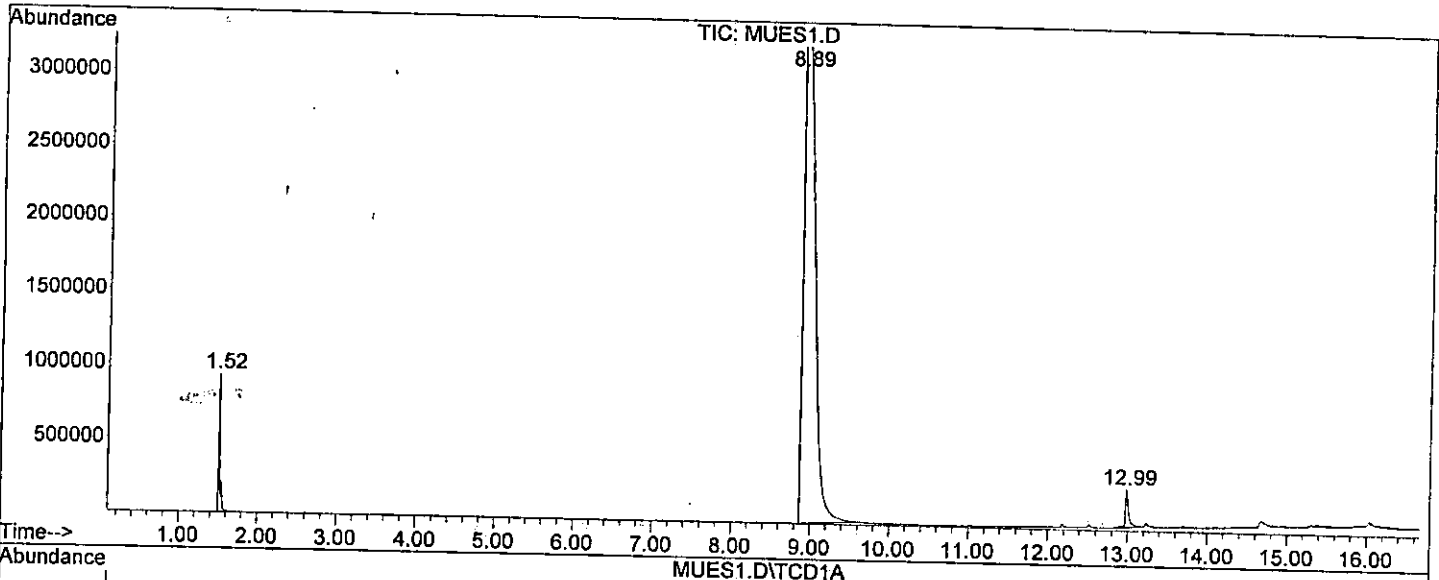
Sum of corrected areas: 299145956

Signal : MUE3.D\TCD1A

peak #	R.T. min	Start min	End min	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
--------	----------	-----------	---------	-------	-------------	------------	--------------	------------

No peaks were detected using the method integration parameters!
 MUE3.D GEOGAS.M Thu Aug 24 16:46:56 2000

File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MUES1.D
Operator : R.RENDEROS
Acquired : 25 Aug 2000 15:59 using AcqMethod ETANOL
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: MUESTRA 1 DIA 3
Misc Info : 25 AGOSTO 2000. MUESTRA DE 3°DIA
Vial Number: 1



Data File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MUES1.D
Acq On : 25 Aug 2000 15:59
Sample : MUESTRA 1 DIA 3
Misc : 25 AGOSTO 2000 MUESTRA DE 3°DIA

Vial: 1
Operator: R.RENDEROS
Inst : GC/MS Ins
Multiplr: 1.00
Sample Amount: 0.00

MS Integration Params: autoint1.e

GC Integration Params: autoint2.e

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GEOGAS.M (Chemstation Integrator)
Title : GASES PERMANENTES

Signal : TIC

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	1.517	1584	1663	1810	BB	878230	11108003	3.13%	2.974%
2	8.893	10205	10271	11116	BB 3	3689711	355265162	100.00%	95.130%
3	12.991	14804	15054	15286	BV 2	237272	7079672	1.99%	1.896%

Sum of corrected areas: 373452837

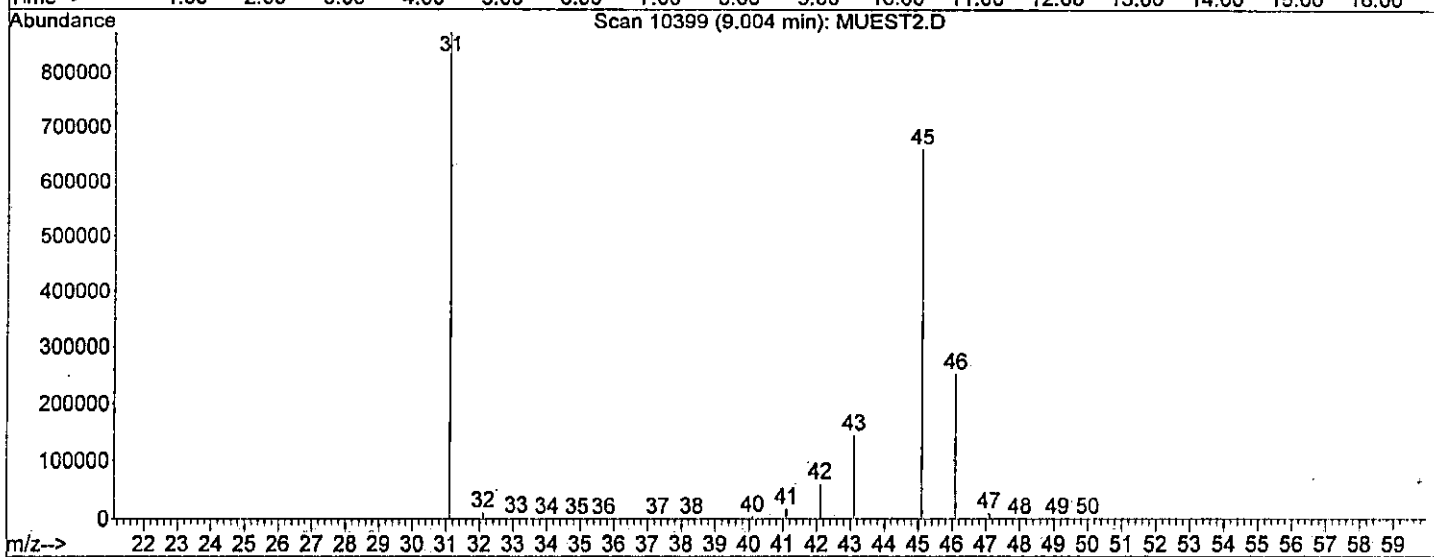
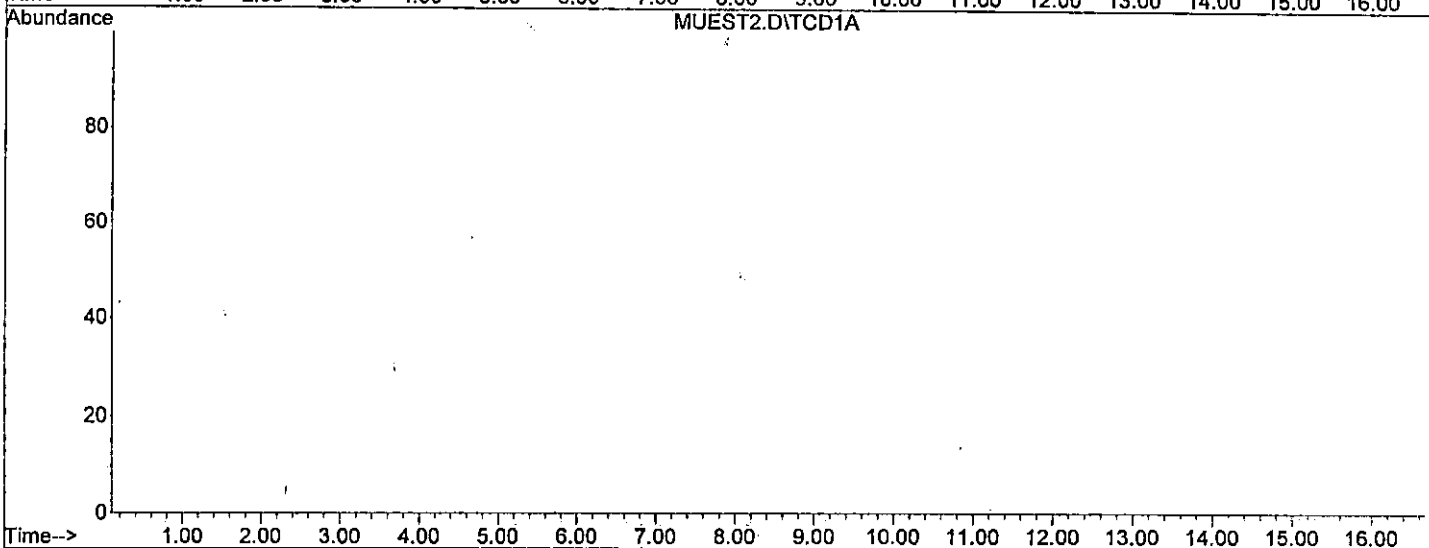
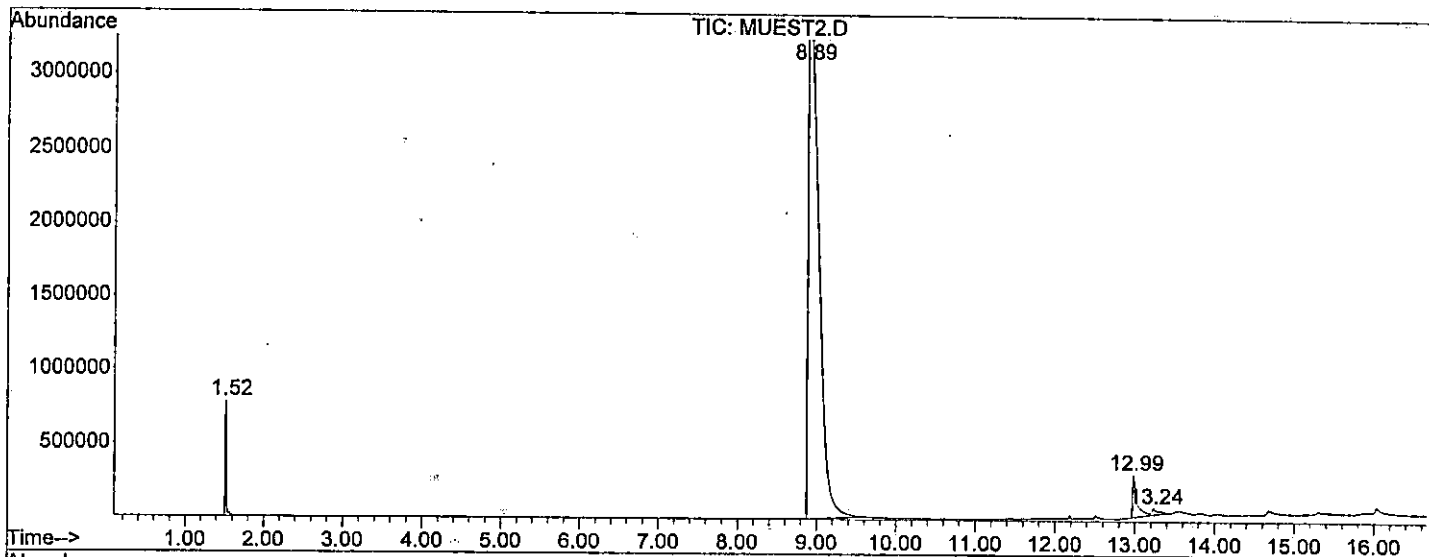
Signal : MUES1.D\TCD1A

peak #	R.T. min	Start min	End min	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
--------	----------	-----------	---------	-------	-------------	------------	--------------	------------

No peaks were detected using the method integration parameters!
MUES1.D GEOGAS.M Fri Aug 25 16:19:49 2000

File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MUEST2.D
Operator : R.RENDEROS
Acquired : 25 Aug 2000 16:23 using AcqMethod ETANOL
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: MUESTRA 2 DIA 3
Misc Info : 25 AGOSTO 2000 MUESTRA DE 3°DIA
Vial Number: 1

134



Data File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MUEST2.D
Acq On : 25 Aug 2000 16:23
Sample : MUESTRA 2 DIA 3
Misc : 25 AGOSTO 2000 MUESTRA DE 3°DIA

Vial: 1
Operator: R.RENDEROS
Inst : GC/MS Ins
Multiplr: 1.00
Sample Amount: 0.00

MS Integration Params: autoint1.e

GC Integration Params: autoint2.e

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GEOGAS.M (Chemstation Integrator)
Title : GASES PERMANENTES

Signal : TIC

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	1.518	1615	1661	1786	BB	760803	7743916	2.34%	2.200%
2	8.894	10229	10270	11116	BB 3	3627701	331330430	100.00%	94.142%
3	12.985	14827	15045	15283	BV 2	278873	10520705	3.18%	2.989%
4	13.235	15283	15337	15535	VB 3	40762	2352654	0.71%	0.668%

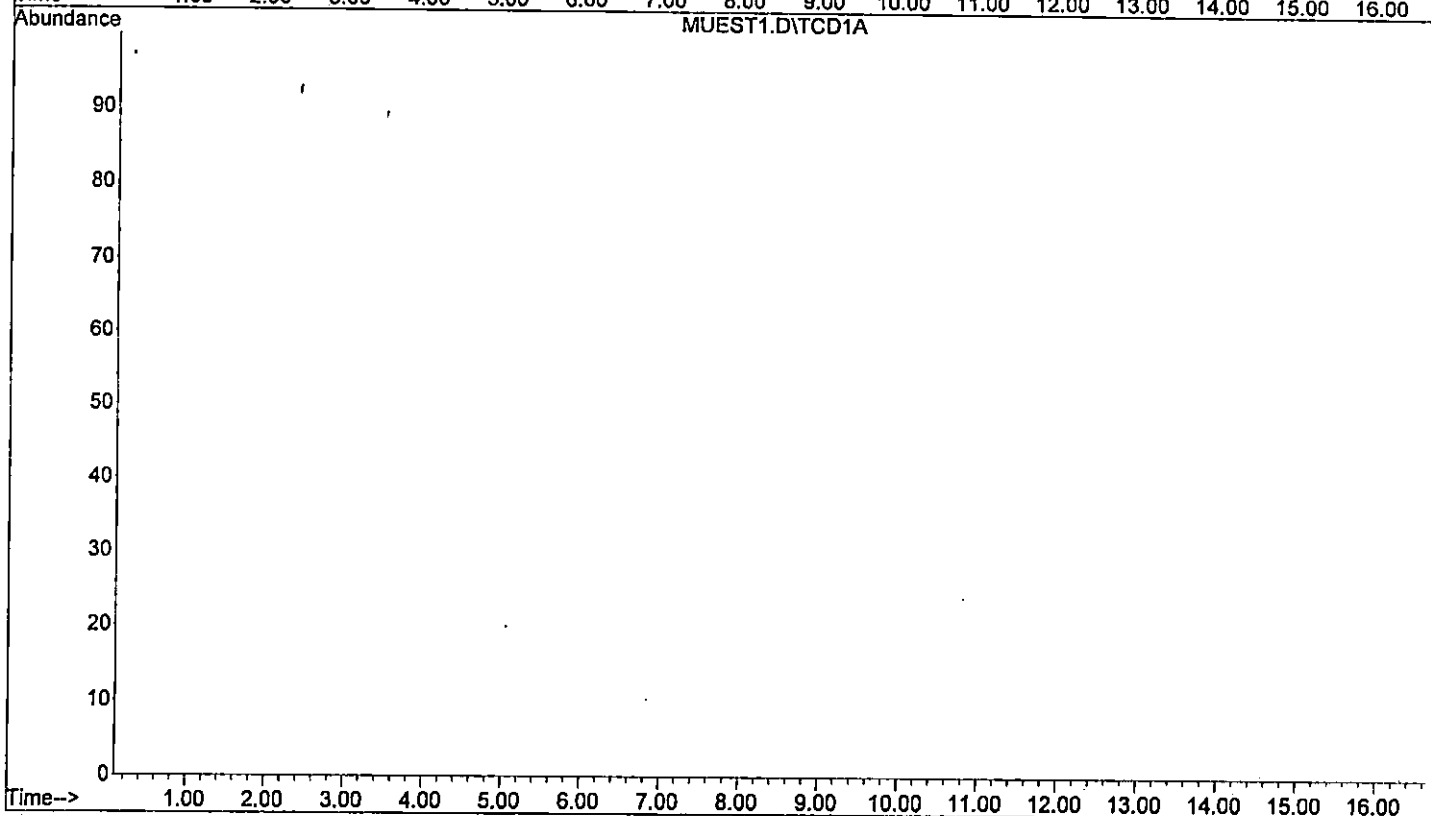
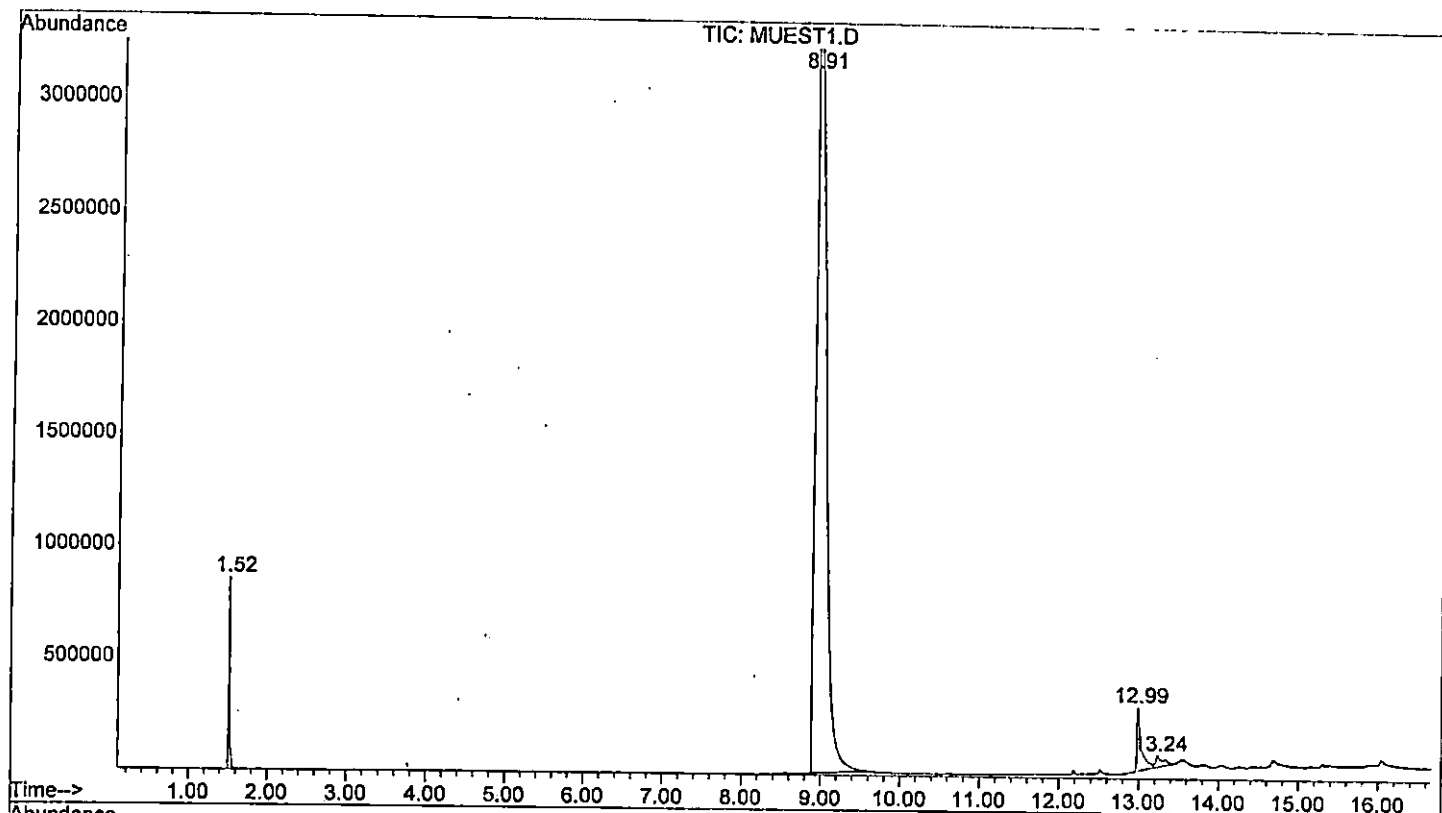
Sum of corrected areas: 351947705

Signal : MUEST2.D\TCD1A

peak #	R.T. min	Start min	End min	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
--------	----------	-----------	---------	-------	-------------	------------	--------------	------------

No peaks were detected using the method integration parameters!
MUEST2.D GEOGAS.M Fri Aug 25 16:45:54 2000

file : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MUEST1.D
Operator : R.RENDEROS
Acquired : 25 Aug 2000 15:36 using AcqMethod ETANOL
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: MUESTRA 1 DIA 3
Misc Info : 25 AGOSTO 2000 MUESTRA DE 2°DIA
Vial Number: 1



Data File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MUEST1.D
 Acq On : 25 Aug 2000 15:36
 Sample : MUESTRA 1 DIA 3
 Misc : 25 AGOSTO 2000 MUESTRA DE 2°DIA

Vial: 1
 Operator: R.RENDEROS
 Inst : GC/MS Ins
 Multiplr: 1.00
 Sample Amount: 0.00

MS Integration Params: autoint1.e

GC Integration Params: autoint2.e

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GEOGAS.M (Chemstation Integrator)
 Title : GASES PERMANENTES

Signal : TIC

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	1.517	1568	1660	1747	BB	777448	8287547	2.70%	2.516%
2	8.915	9801	10294	11092	BB 3	3446034	307125081	100.00%	93.254%
3	12.992	14788	15053	15271	BV 3	255572	10582953	3.45%	3.213%
4	13.239	15271	15341	15558	VB 3	49776	3347815	1.09%	1.017%

Sum of corrected areas: 329343395

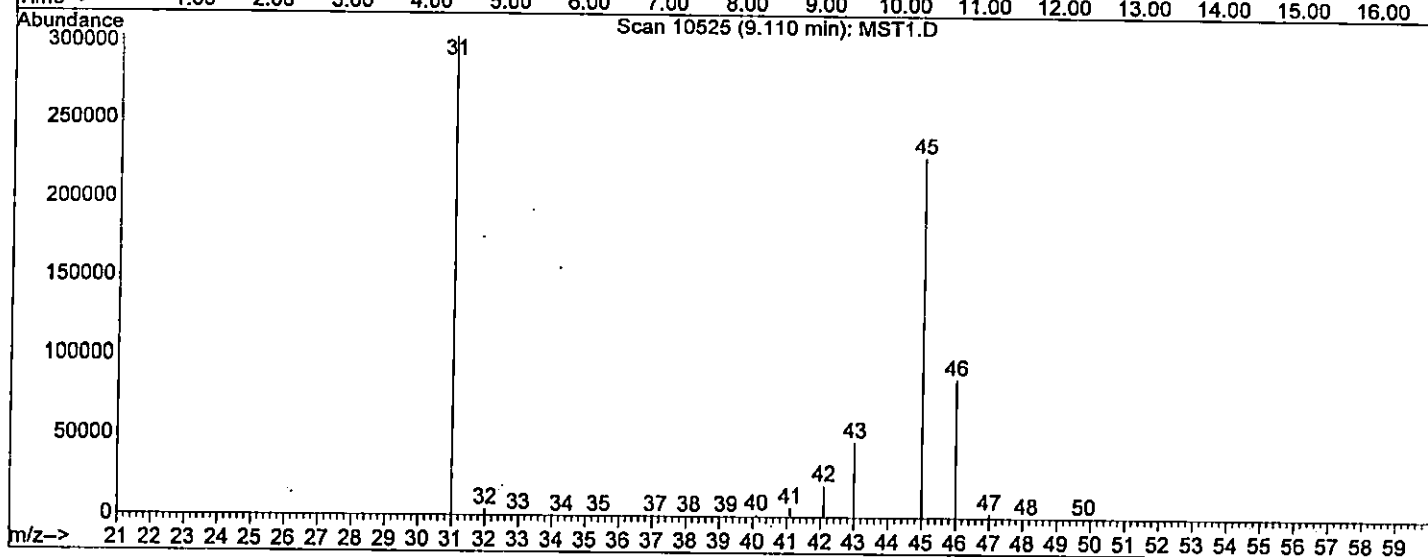
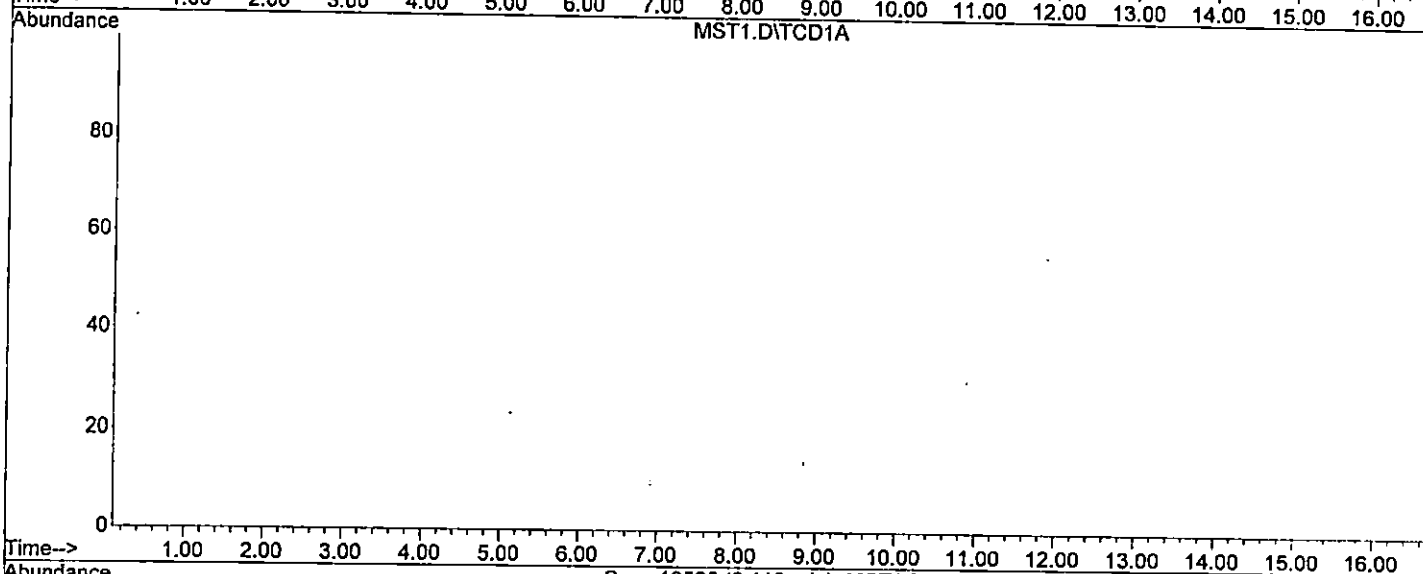
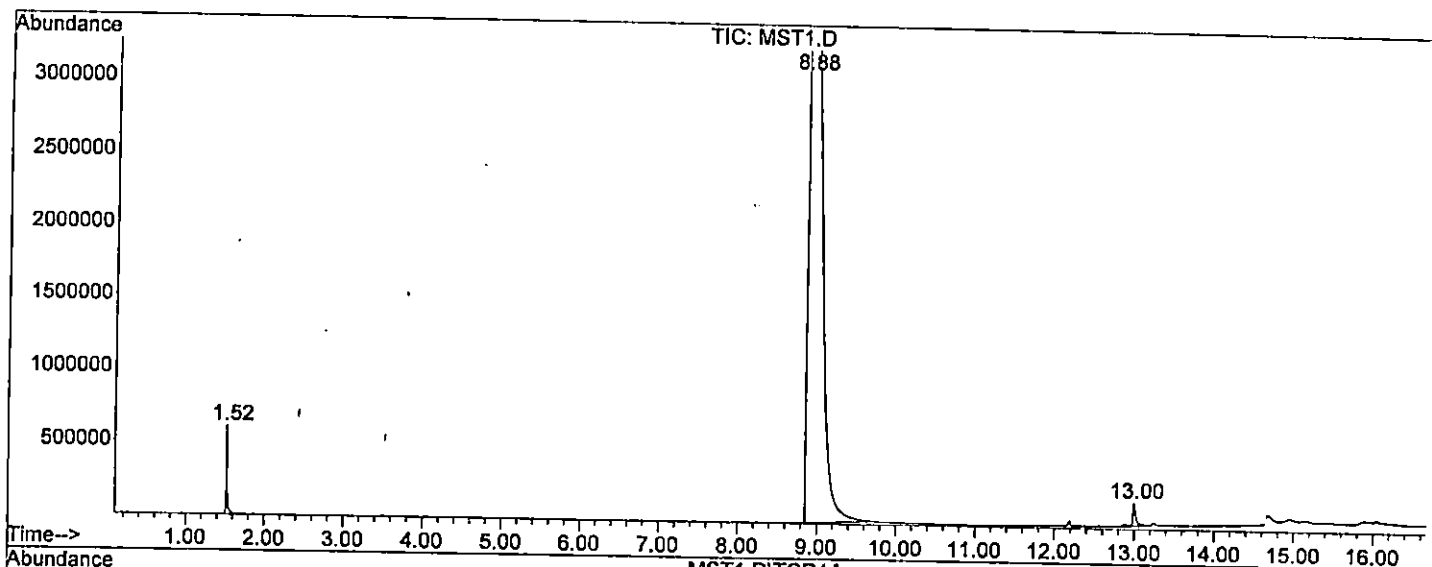
Signal : MUEST1.D\TCD1A

peak #	R.T. min	Start min	End min	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
--------	----------	-----------	---------	-------	-------------	------------	--------------	------------

No peaks were detected using the method integration parameters!
 MUEST1.D GEOGAS.M Fri Aug 25 15:53:40 2000

File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MST1.D
Operator : R.RENDEROS
Acquired : 26 Aug 2000 13:04 using AcqMethod ETANOL
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: MUESTRA1 DIA 4
Misc Info : 26 AGOSTO
Vial Number: 1

138



Data File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MST1.D
Acq On : 26 Aug 2000 13:04
Sample : MUESTRA1 DIA 4
Misc : 26 AGOSTO

Vial: 1
Operator: R.RENDEROS
Inst : GC/MS Ins
Multiplr: 1.00
Sample Amount: 0.00

MS Integration Params: autoint1.e

GC Integration Params: autoint2.e

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GEOGAS.M (Chemstation Integrator)
Title : GASES PERMANENTES

Signal : TIC

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	1.523	1607	1670	1794	BB	579945	5971293	1.18%	1.158%
2	8.881	10158	10258	11217	BB 4	4942901	505183630	100.00%	97.952%
3	13.000	14804	15065	15263	BB 2	136774	4590346	0.91%	0.890%

Sum of corrected areas: 515745270

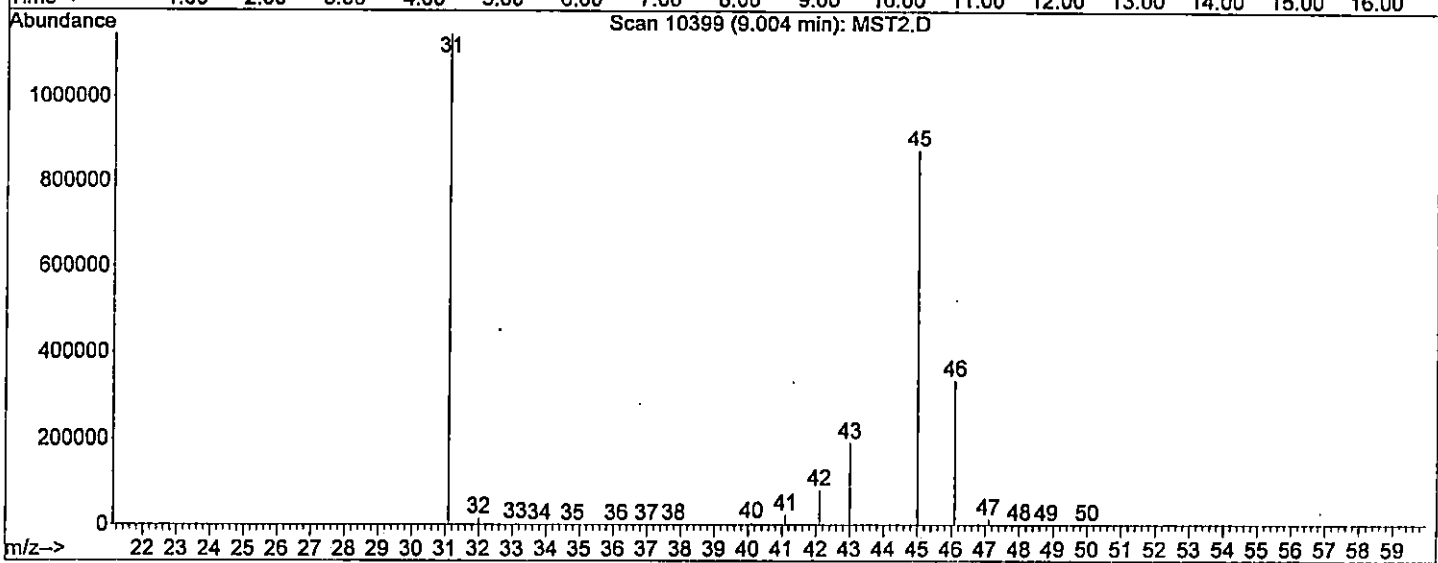
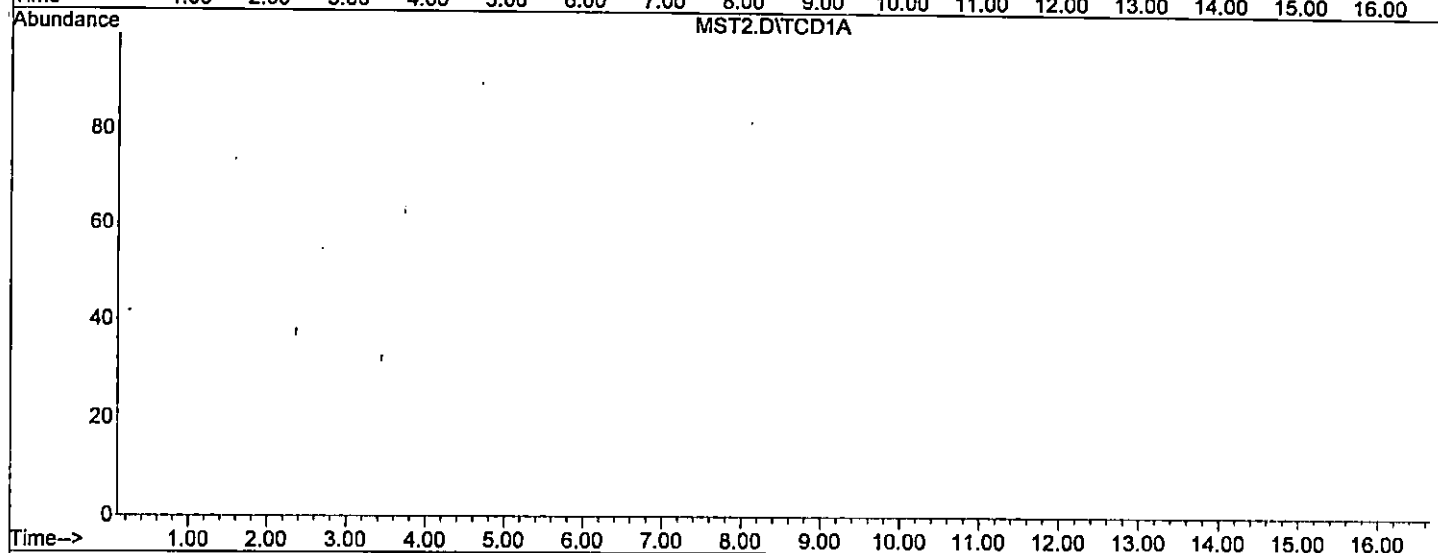
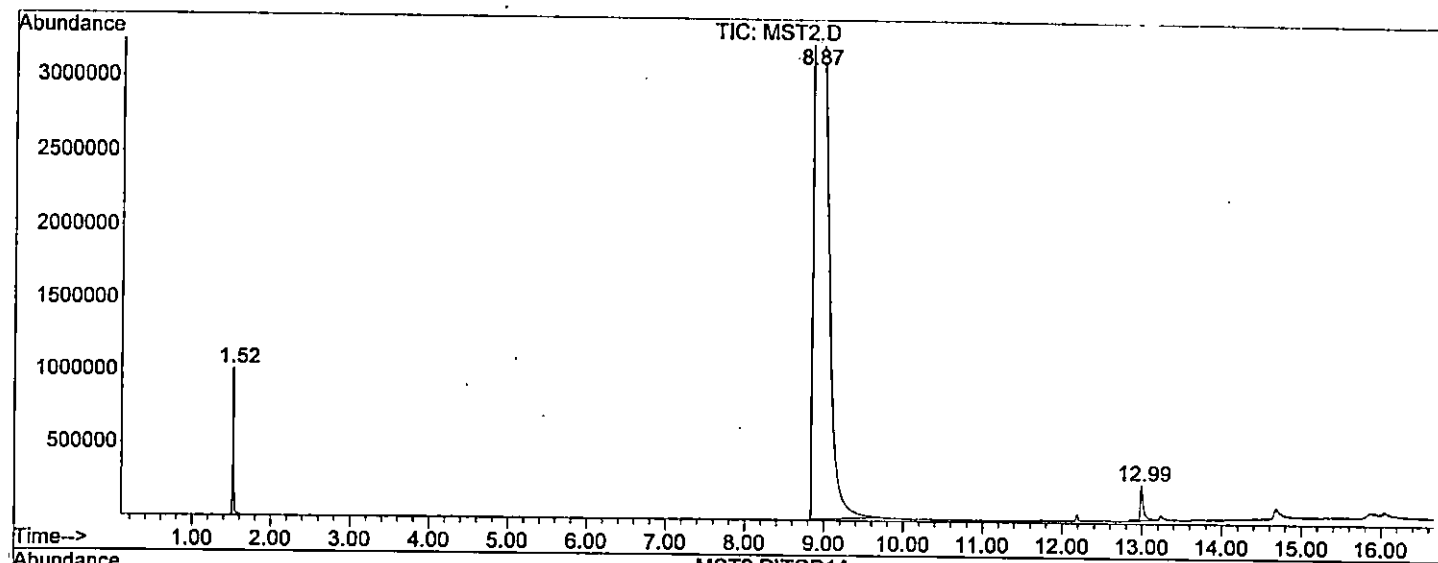
Signal : MST1.D\TCD1A

peak #	R.T. min	Start min	End min	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
--------	----------	-----------	---------	-------	-------------	------------	--------------	------------

No peaks were detected using the method integration parameters!
MST1.D GEOGAS.M Sat Aug 26 13:21:20 2000

file : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MST2.D
Operator : R.RENDEROS
Acquired : 26 Aug 2000 13:28 using AcqMethod ETANOL
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: MUESTRA2 DIA 4
Misc Info : 26 AGOSTO
Vial Number: 1

140



Data File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MST2.D
Acq On : 26 Aug 2000 13:28
Sample : MUESTRA2 DIA 4
Misc : 26 AGOSTO

Vial: 1
Operator: R.RENDEROS
Inst : GC/MS Ins
Multiplr: 1.00
Sample Amount: 0.00

MS Integration Params: autoint1.e

GC Integration Params: autoint2.e

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GEOGAS.M (Chemstation Integrator)
Title : GASES PERMANENTES

Signal : TIC

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	1.524	1599	1669	1802	BB	960944	9678150	1.74%	1.687%
2	8.867	10034	10239	11209	BB 3	5094754	557222362	100.00%	97.130%
3	12.994	14804	15056	15286	BV 2	226590	6785197	1.22%	1.183%

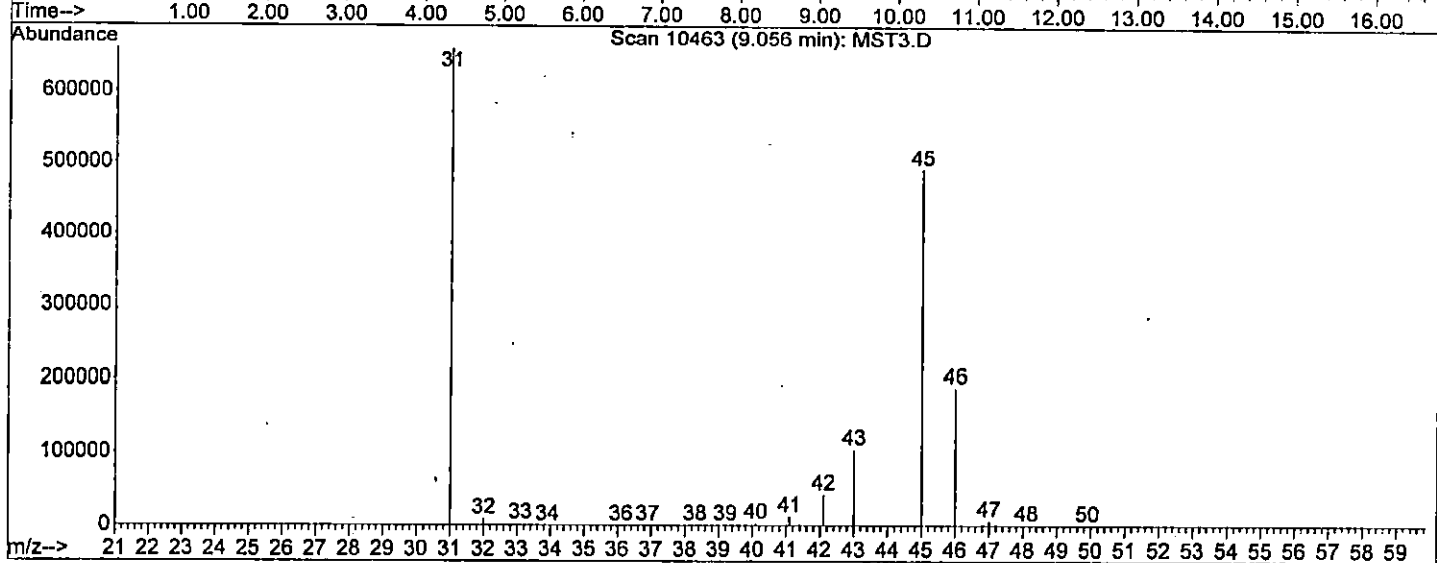
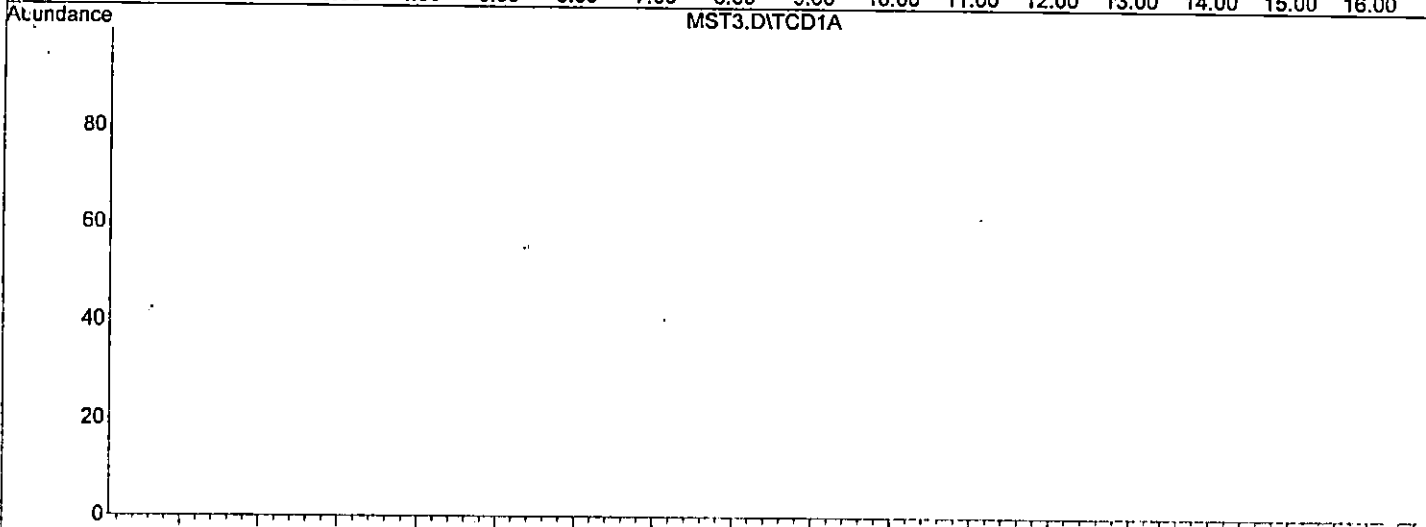
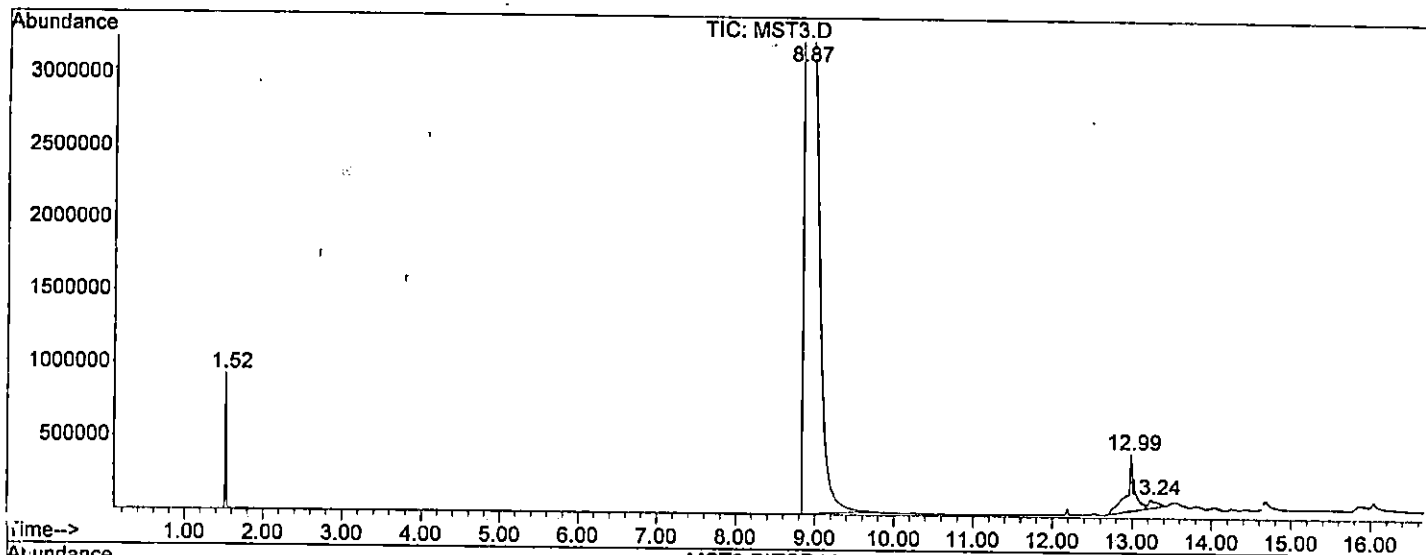
Sum of corrected areas: 573685708

Signal : MST2.D\TCD1A

peak #	R.T. min	Start min	End min	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
--------	----------	-----------	---------	-------	-------------	------------	--------------	------------

No peaks were detected using the method integration parameters!
MST2.D GEOGAS.M Sat Aug 26 13:49:03 2000

File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MST3.D
Operator : R.RENDEROS
Acquired : 26 Aug 2000 13:53 using AcqMethod ETANOL
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: MUESTRA 3 DIA 4
Misc Info : 26 AGOSTO 2000
Vial Number: 1



Area Percent Report

Data File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MST3.D
 Acq On : 26 Aug 2000 13:53
 Sample : MUESTRA 3 DIA 4
 Misc : 26 AGOSTO 2000

Vial: 1
 Operator: R.RENDEROS
 Inst : GC/MS Ins
 Multiplr: 1.00
 Sample Amount: 0.00
 GC Integration Params: autoint2.e

MS Integration Params: autoint1.e

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GEOGAS.M (Chemstation Integrator)
 Title : GASES PERMANENTES

Signal : TIC

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	1.523	1607	1671	1771	BB	888392	8503714	1.54%	1.441%
2	8.866	10174	10241	11217	BB 4	5091716	552032812	100.00%	93.517%
3	12.990	14648	15054	15271	BV 2	360612	25485693	4.62%	4.317%
4	13.237	15271	15343	15574	VB 3	58327	4279193	0.78%	0.725%

Sum of corrected areas: 590301413

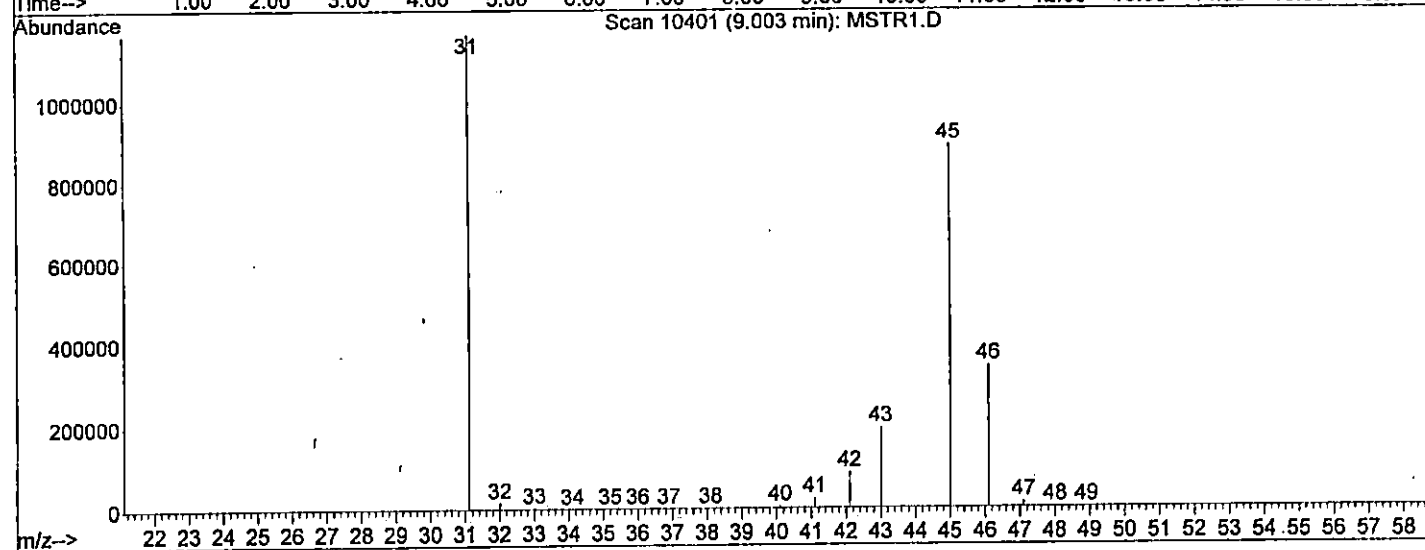
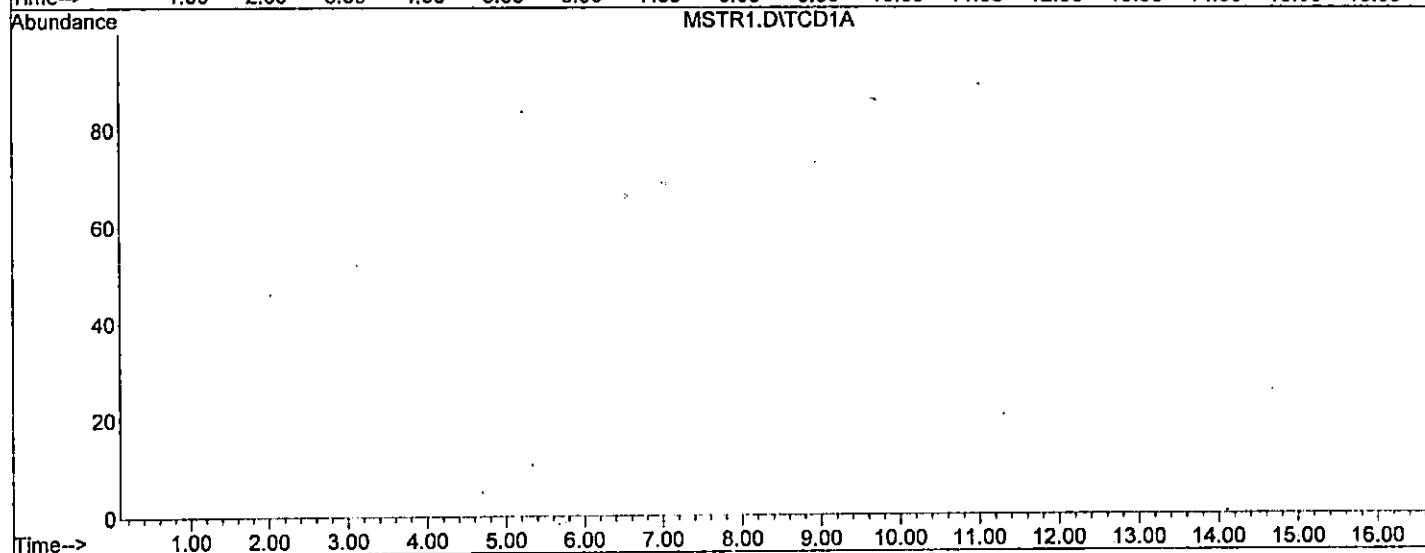
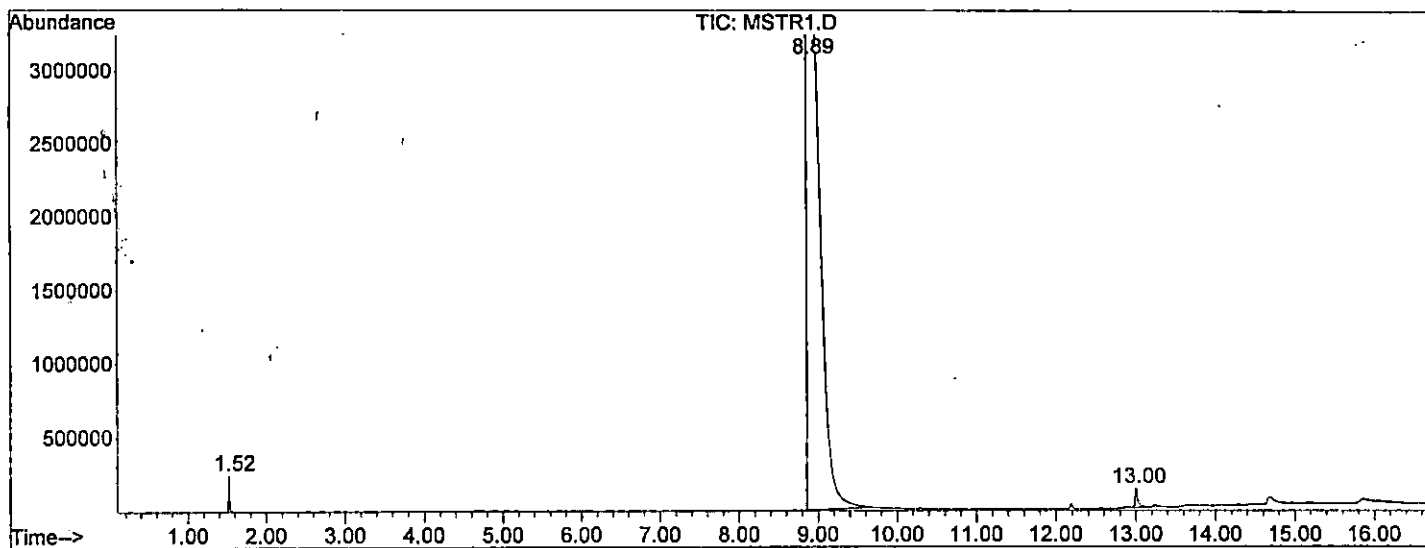
Signal : MST3.D\TCD1A

peak #	R.T. min	Start min	End min	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
--------	----------	-----------	---------	-------	-------------	------------	--------------	------------

No peaks were detected using the method integration parameters!
 MST3.D GEOGAS.M Sat Aug 26 14:28:08 2000

File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MSTR1.D
Operator : R.RENDEROS
Acquired : 27 Aug 2000 11:41 using AcqMethod ETANOL
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: MSTR1.D MUESTRA 1 DIA 5
Misc Info : 27 AGOSTO 2000
Vial Number: 1

144



Data File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MSTR1.D
Acq On : 27 Aug 2000 11:41
Sample : MSTR1.D MUESTRA 1 DIA 5
Misc : 27 AGOSTO 2000

Vial: 1
Operator: R.RENDEROS
Inst : GC/MS Ins
Multiplr: 1.00
Sample Amount: 0.00

MS Integration Params: autoint1.e

GC Integration Params: autoint2.e

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GEOGAS.M (Chemstation Integrator)
Title : GASES PERMANENTES

Signal : TIC

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	1.524	1592	1672	1786	BB	230409	2305439	0.47%	0.464%
2	8.887	10088	10265	11209	BB 2	4792990	490903478	100.00%	98.824%
3	13.005	14726	15071	15278	BB 3	126878	3537440	0.72%	0.712%

Sum of corrected areas: 496746357

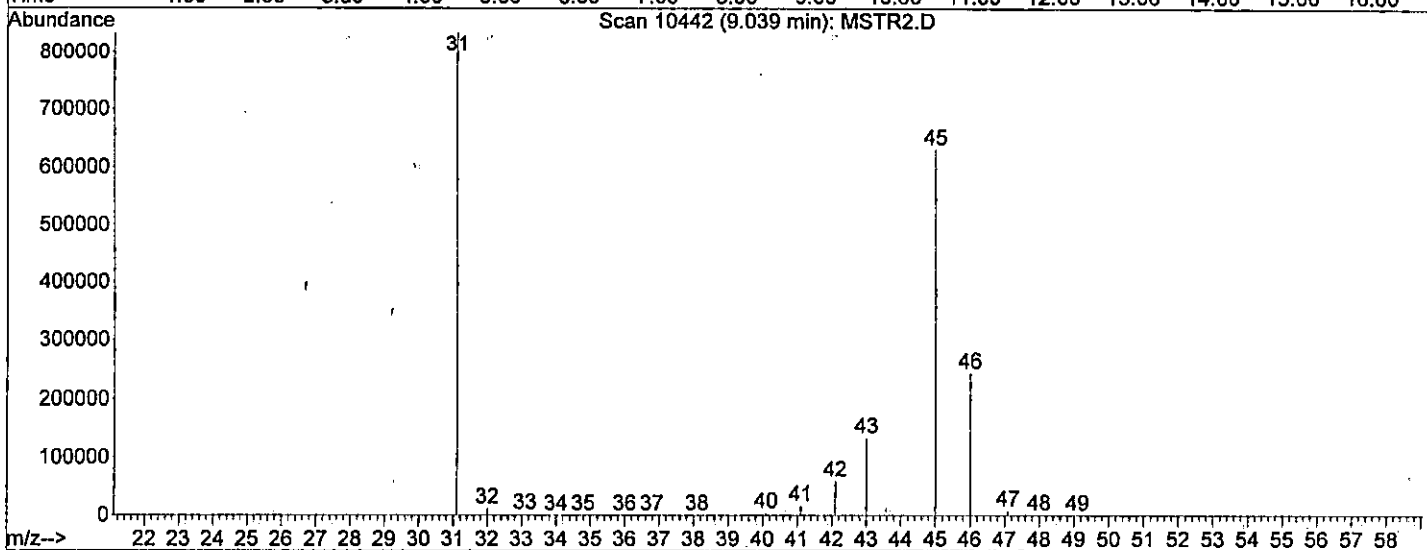
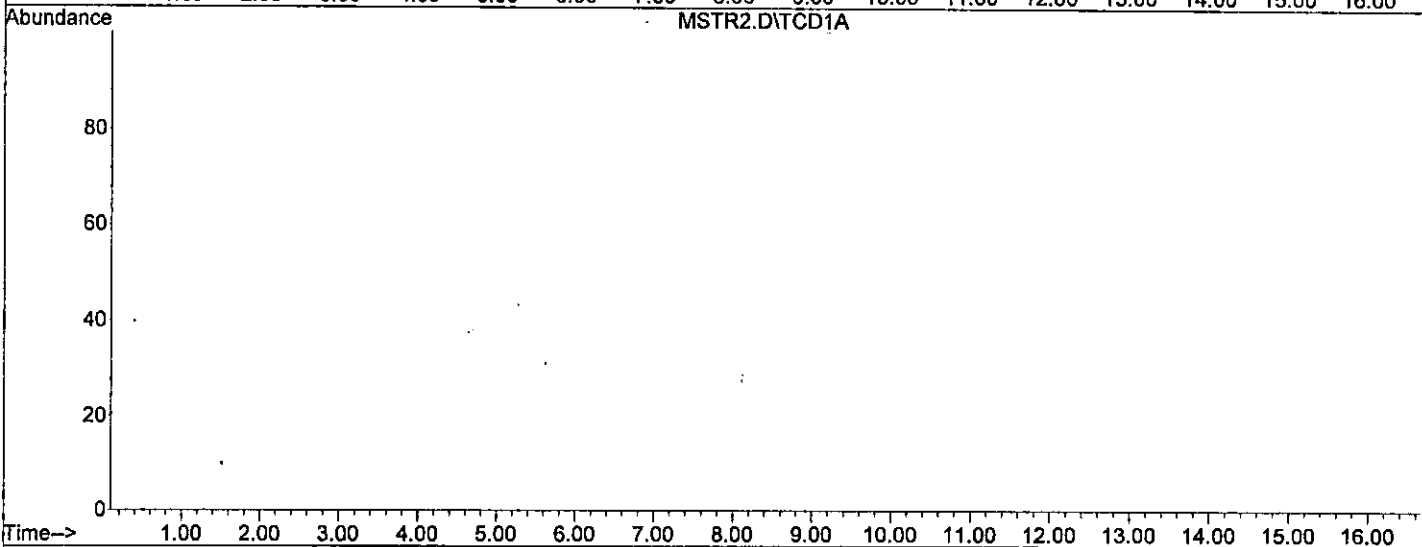
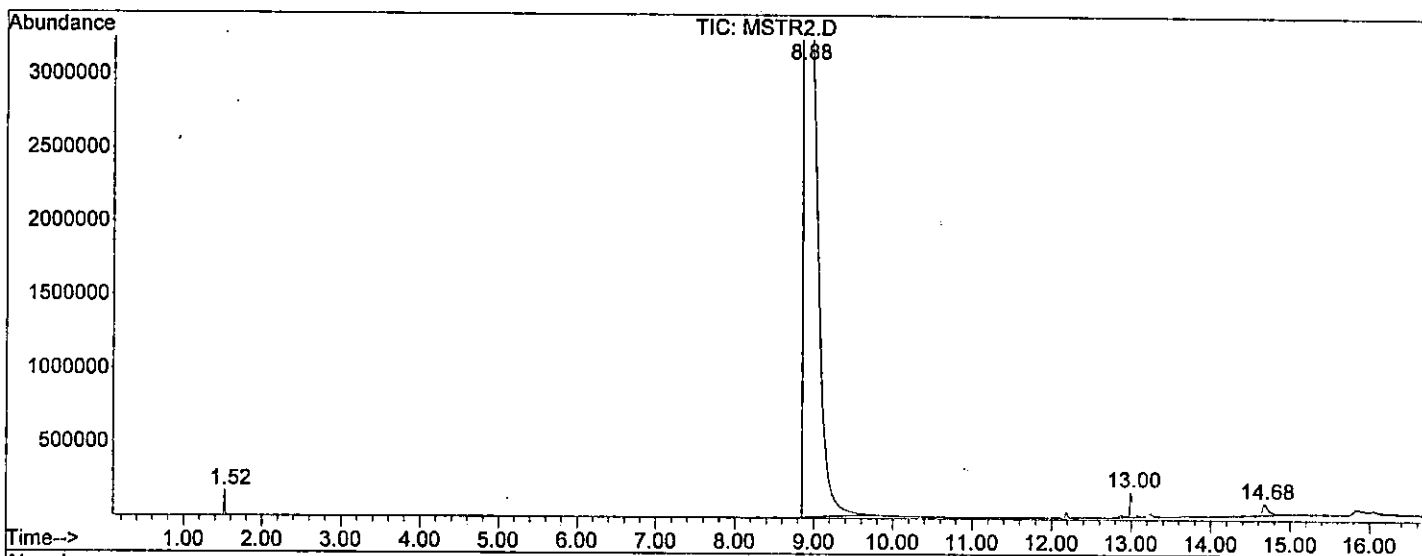
Signal : MSTR1.D\TCD1A

peak #	R.T. min	Start min	End min	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
--------	----------	-----------	---------	-------	-------------	------------	--------------	------------

No peaks were detected using the method integration parameters!
MSTR1.D GEOGAS.M Sun Aug 27 12:28:10 2000

Operator : R.RENDEROS
Acquired : 27 Aug 2000 12:06 using AcqMethod ETANOL
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: MSTR2.D MUESTRA 2 DIA 5
Misc Info : 27 AGOSTO 2000
Vial Number: 1

146



Data File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MSTR2.D
Acq On : 27 Aug 2000 12:06
Sample : MSTR2.D MUESTRA 2 DIA 5
Misc : 27 AGOSTO 2000

Vial: 1
Operator: R.RENDEROS
Inst : GC/MS Ins
Multiplr: 1.00
Sample Amount: 0.00

MS Integration Params: autoint1.e

GC Integration Params: autoint2.e

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GEOGAS.M (Chemstation Integrator)
Title : GASES PERMANENTES

Signal : TIC

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	1.524	1615	1671	1802	BB	164386	1671674	0.32%	0.316%
2	8.879	10073	10255	11248	BB	4955942	518944287	100.00%	97.981%
3	12.999	14796	15063	15278	BV 2	161067	5011730	0.97%	0.946%
4	14.679	16889	17024	17294	BB 5	72952	4007375	0.77%	0.757%

Sum of corrected areas: 529635066

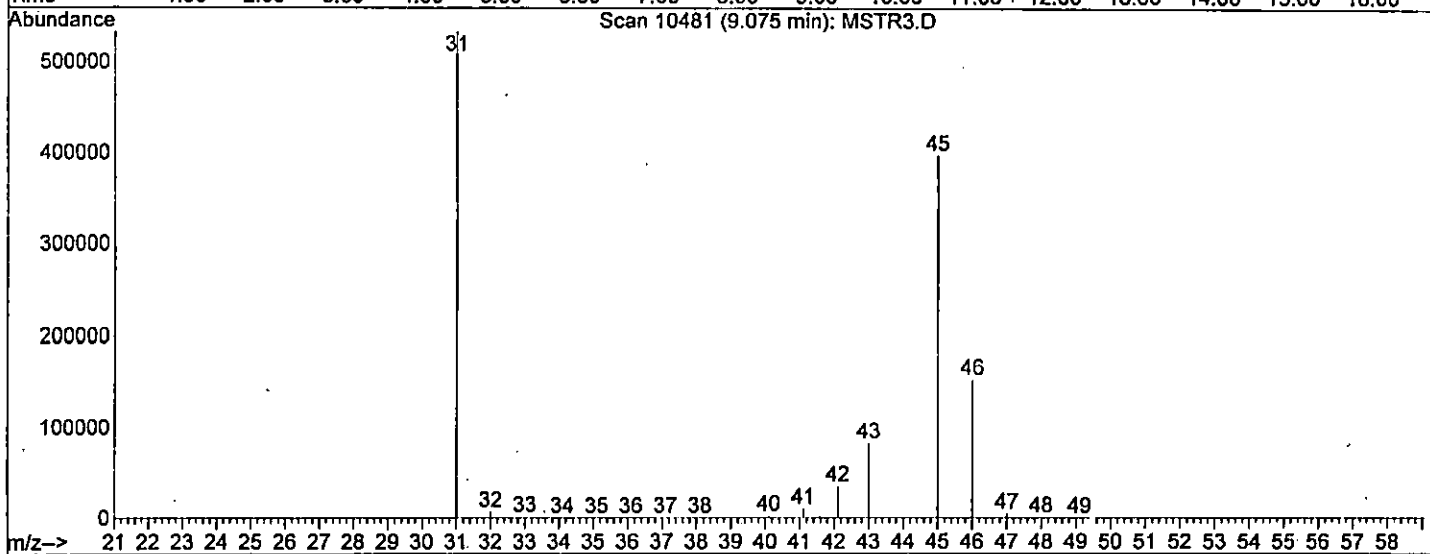
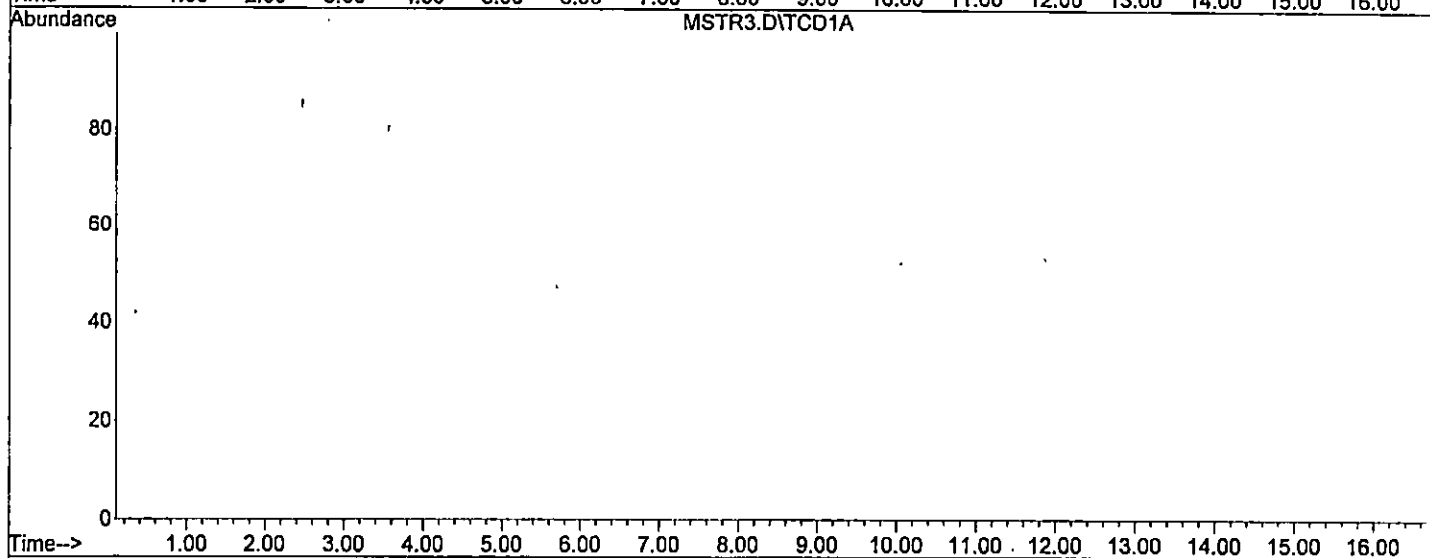
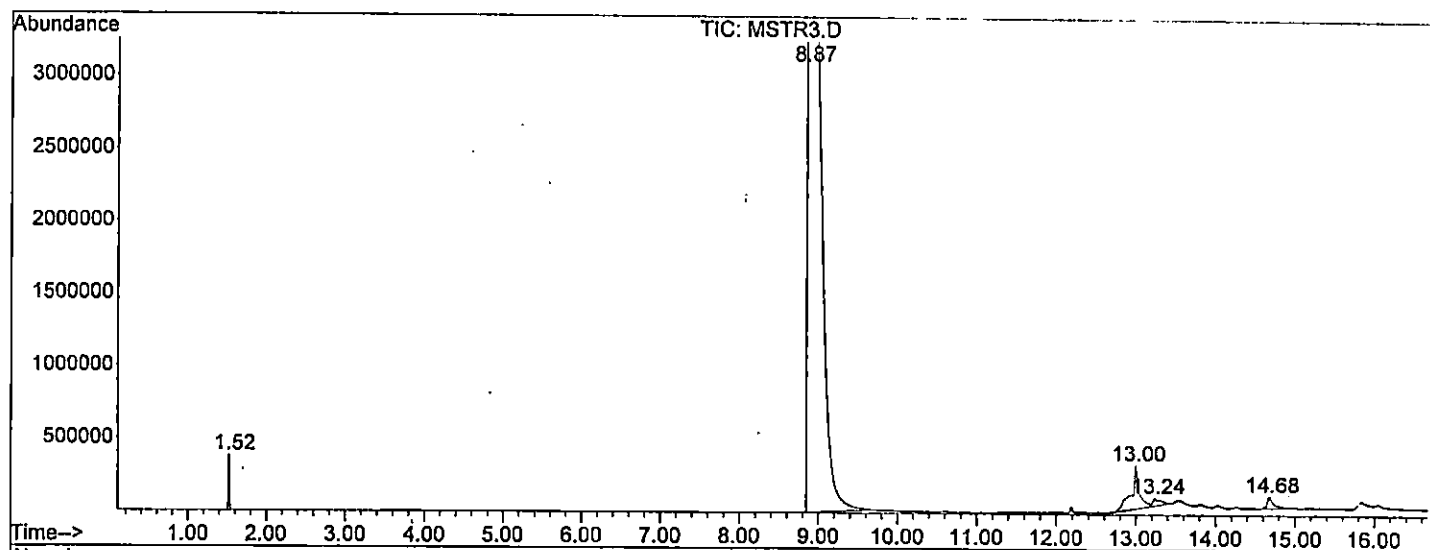
Signal : MSTR2.D\TCD1A

peak #	R.T. min	Start min	End min	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
--------	----------	-----------	---------	-------	-------------	------------	--------------	------------

No peaks were detected using the method integration parameters!
MSTR2.D GEOGAS.M Sun Aug 27 12:28:48 2000

File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MSTR3.D
Operator : R.RENDEROS
Acquired : 27 Aug 2000 12:31 using AcqMethod ETANOL
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: MSTR3.D MUESTRA 3 DIA 5
Misc Info : 27 AGOSTO 2000
Vial Number: 1

148



Data File : C:\HPCHEM\1\ETANOL\MSTR3.D
Acq On : 27 Aug 2000 12:31
Sample : MSTR3.D MUESTRA 3 DIA 5
Misc : 27 AGOSTO 2000

Vial: 1
Operator: R.RENDEROS
Inst : GC/MS Ins
Multiplr: 1.00
Sample Amount: 0.00

MS Integration Params: autoint1.e

GC Integration Params: autoint2.e

Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\GEOGAS.M (Chemstation Integrator)
Title : GASES PERMANENTES

Signal : TIC

peak #	R.T. min	first scan	max scan	last scan	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
1	1.522	1607	1666	1763	BB	336108	3322527	0.62%	0.586%
2	8.874	10182	10246	11209	BB 2	4993873	534998861	100.00%	94.368%
3	12.998	14656	15060	15276	BV 3	276218	20395539	3.81%	3.598%
4	13.241	15276	15343	15551	VB 3	49817	3466940	0.65%	0.612%
5	14.678	16656	17020	17309	BB 7	74388	4742044	0.89%	0.836%

Sum of corrected areas: 566925912

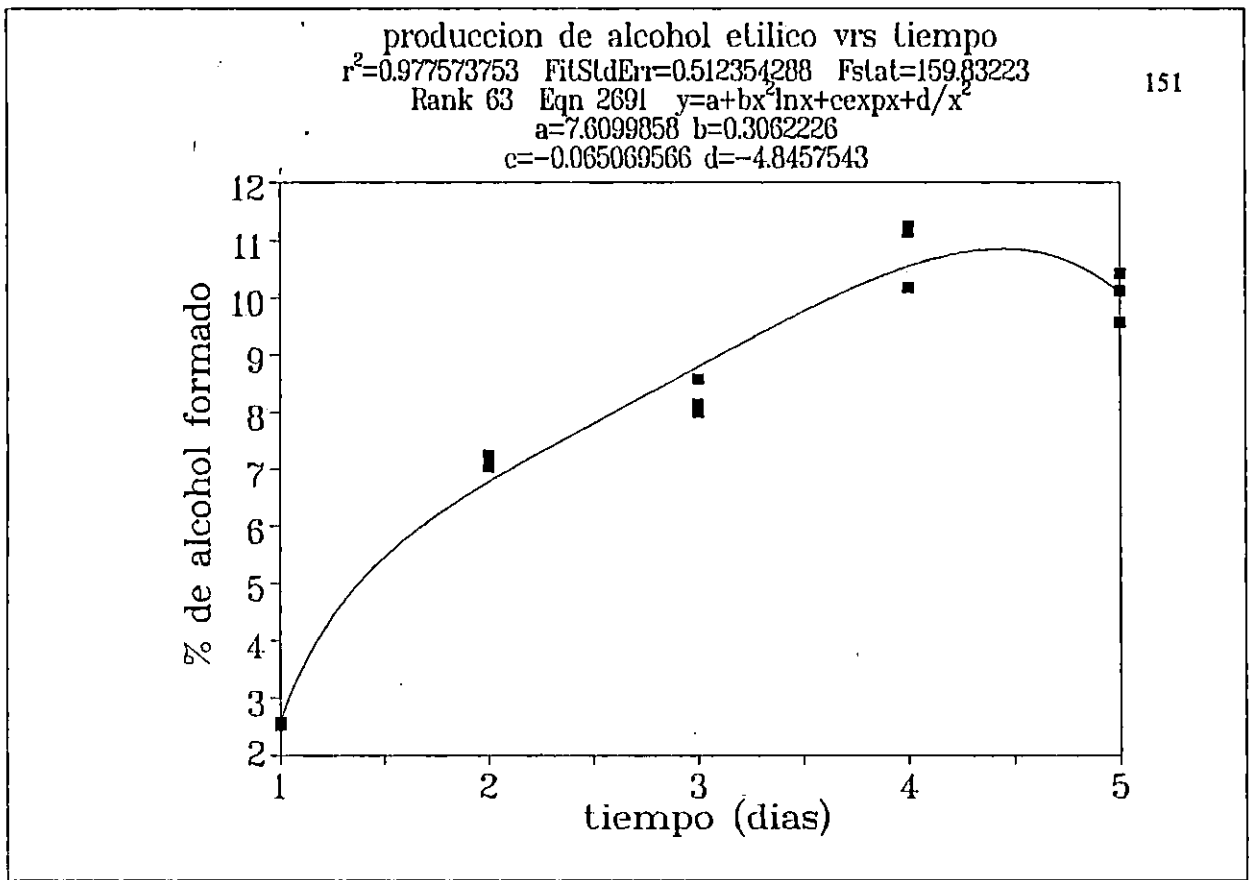
Signal : MSTR3.D\TCD1A

peak #	R.T. min	Start min	End min	PK TY	peak height	corr. area	corr. % max.	% of total
--------	----------	-----------	---------	-------	-------------	------------	--------------	------------

No peaks were detected using the method integration parameters!
MSTR3.D GEOGAS.M Sun Aug 27 12:49:49 2000

ANEXO E

**GRÁFICO DE REGRESIÓN PARA LOS DATOS
OBTENIDOS EN LA ETAPA DE PRODUCCIÓN
ALCOHÓLICA**



produccion de alcohol etilico vrs tiempo

Nov 6, 2000 2:38 PM

15 Active X-Y Points

X: tiempo (dias)

Mean: 3

SD: 1.4638501094

Y: % de alcohol formado

Mean: 7.7546666667

SD: 3.0326647091

File Source: ALCOHOL.PRN

Rank 63 Eqn 2691 $y=a+bx^2\ln x+c\exp x+d/x^2$

r2 Coef Det
0.9775737528

DF Adj r2
0.968603254

Fit Std Err
0.5123542876

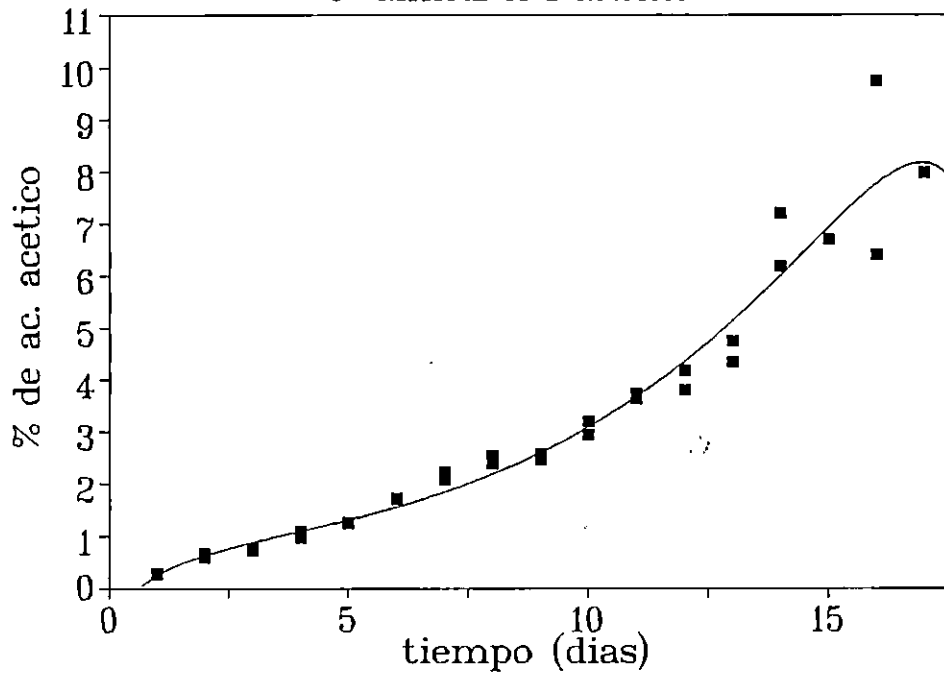
F-value
159.83222988

Parm	Value	Std Error	t-value	95% Confidence Limits	
a	7.609985751	0.436947161	17.41626091	6.646275172	8.57369633
b	0.306222596	0.060221306	5.084954448	0.173401251	0.43904394
c	-0.06506957	0.014869371	-4.37608061	-0.09786477	-0.03227436
d	-4.84575425	0.604843241	-8.01158701	-6.17976871	-3.5117398

ANEXO F

**GRÁFICOS DE REGRESIÓN PARA
LOS DATOS OBTENIDOS EN LA ETAPA
EXPERIMENTAL DE ACETIFICACIÓN.**

% ac. acetico vrs tiempo para el metodo 1
 $r^2=0.954759861$ FitStdErr=0.557157197 Fstat=204.007892
 Rank 5 Eqn 2880 $y=a+bx^3+cexpx+dlnx$
 $a=0.25408237$ $b=0.0016152269$
 $c=-6.318102E-08$ $d=0.52949992$

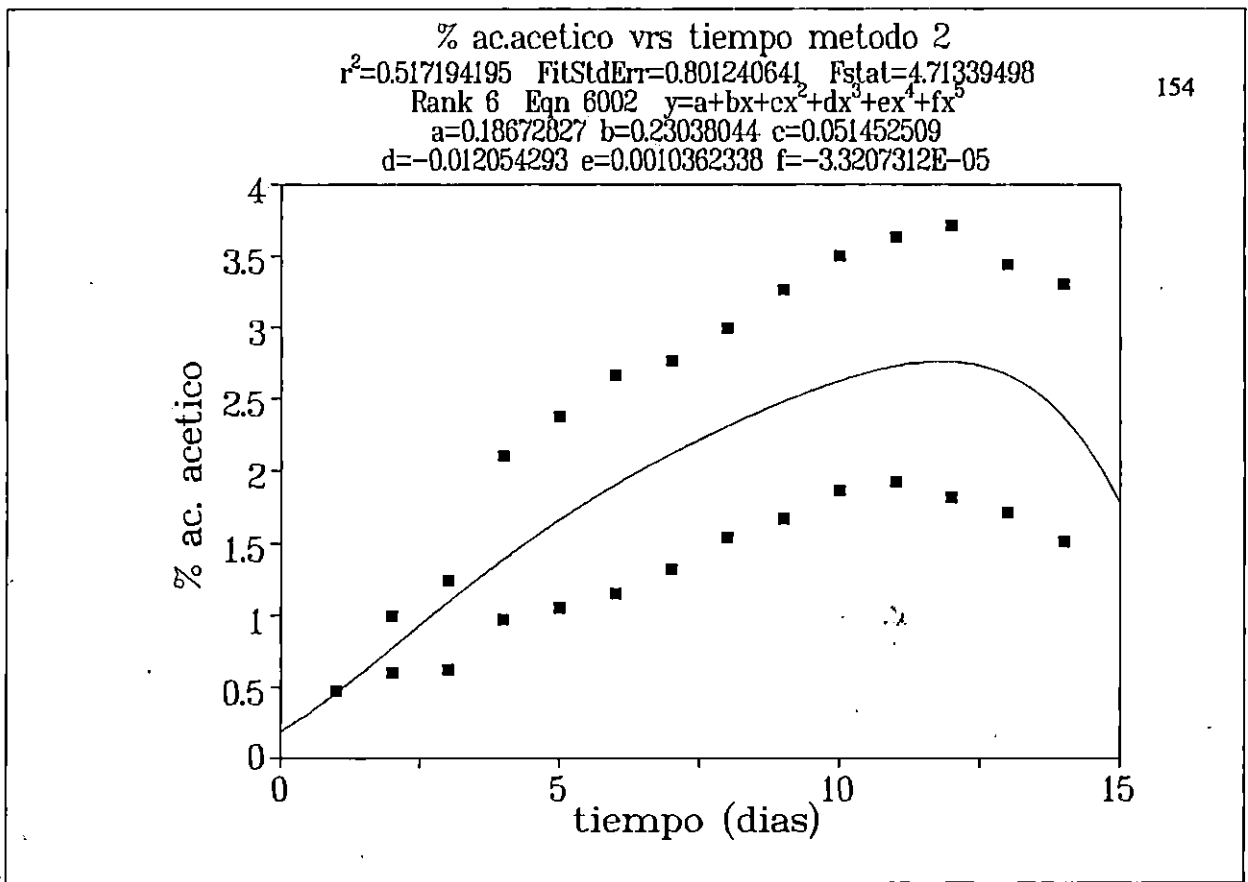


% ac. acetico vrs tiempo para el metodo 1 Nov 4, 2000 8:41 PM
 33 Active X-Y Points
 X: tiempo (dias) Mean: 8.7575757576 SD: 4.841424784
 Y: % de ac. acetico Mean: 3.2348484848 SD: 2.4936746495
 File Source: METODO1.PRN

Rank 5 Eqn 2880 $y=a+bx^3+cexpx+dlnx$

r2	Coef Det	DF Adj	r2	Fit Std Err	F-value
0.9547598612	0.9482969843	0.5571571969	204.00789156		

Parm	Value	Std Error	t-value	95% Confidence Limits	
a	0.254082367	0.30974531	0.820294478	-0.37941142	0.887576151
b	0.001615227	0.000156803	10.30099134	0.001294532	0.001935922
c	-6.3181e-08	3.45901e-08	-1.82656346	-1.3392e-07	7.56296e-09
d	0.529499921	0.208718419	2.53691037	0.102627208	0.956372634



% ac. acetico vrs tiempo metodo 2

Nov 5, 2000 5:17 PM

28 Active X-Y Points

X: tiempo (dias)

Mean: 7.5

SD: 4.1051007115

Y: % ac. acetico

Mean: 1.9507142857

SD: 1.0408932367

File Source: METODO2.PRN

Rank 6 Eqn 6002 $y=a+bx+cx^2+dx^3+ex^4+fx^5$

r2 Coef Det

DF Adj r2

Fit Std Err

F-value

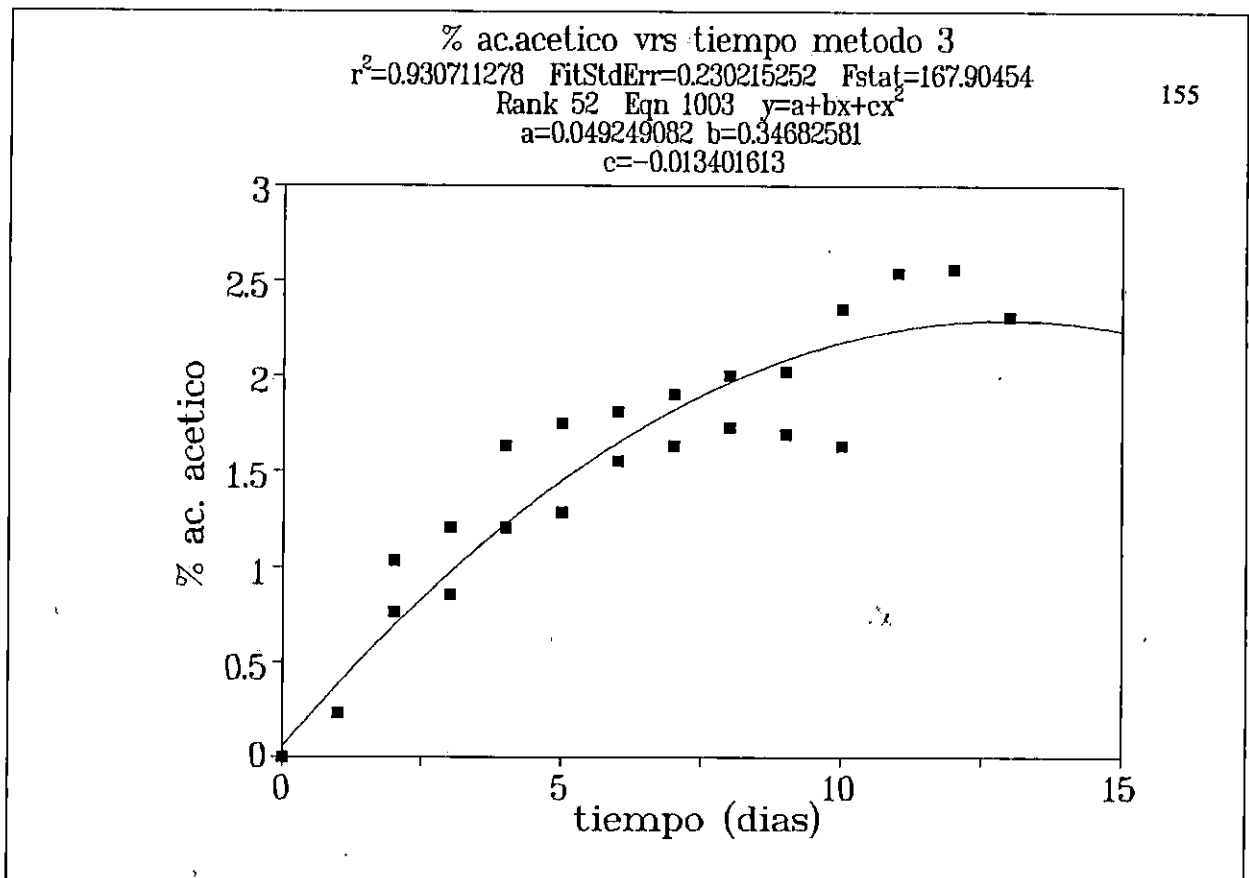
0.5171941949

0.3792496792

0.8012406414

4.7133949796

Parm	Value	Std Error	t-value	95% Confidence Limits	
a	0.186728274	1.955018373	0.095512286	-3.86922639	4.242682937
b	0.230380435	2.300817836	0.100129802	-4.5429828	5.003743672
c	0.051452509	0.872339217	0.058982226	-1.75833525	1.861240265
d	-0.01205429	0.14164161	-0.08510418	-0.3059093	0.281800719
e	0.001036234	0.010262418	0.100973654	-0.02025456	0.022327032
f	-3.3207e-05	0.00027262	-0.12180803	-0.0005988	0.000532381



% ac. acetico vrs tiempo metodo 3

Nov 5, 2000 6:03 PM

28 Active X-Y Points

X: tiempo (dias)

Mean: 5.2142857143

SD: 4.0492993711

Y: % ac. acetico

Mean: 1.2814285714

SD: 0.8415713446

File Source: METODO3.PRN

Rank 52 Eqn 1003 $y=a+bx+cx^2$

r2 Coef Det
0.9307112781

DF Adj r2
0.9220501878

Fit Std Err
0.2302152518

F-value
167.90453991

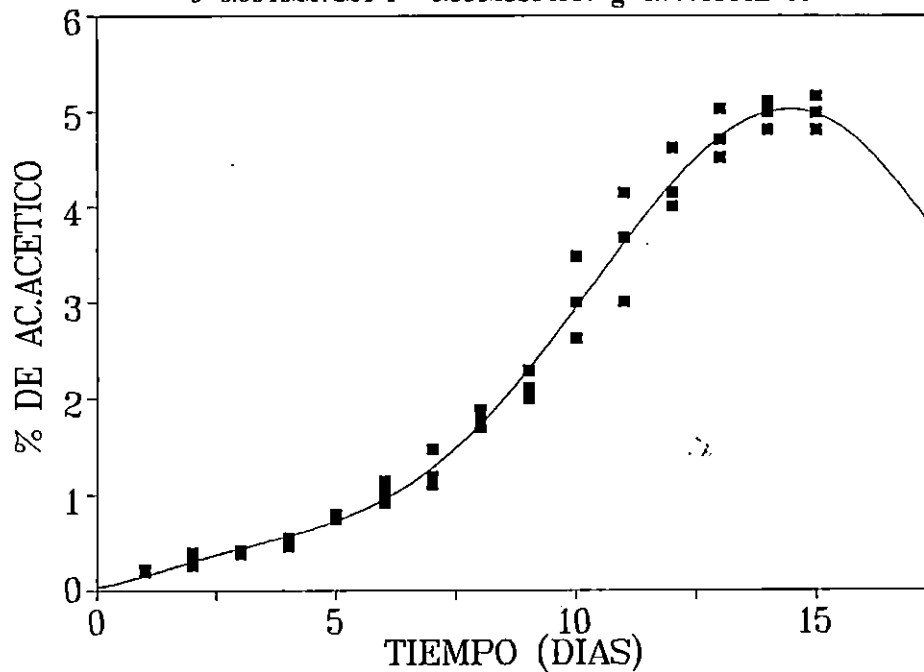
Parm	Value	Std Error	t-value	95% Confidence Limits	
a	0.049249082	0.087074157	0.565599301	-0.13011127	0.228609433
b	0.346825809	0.036237949	9.570790236	0.2721808	0.421470819
c	-0.01340161	0.00304183	-4.4057733	-0.01966735	-0.00713588

ANEXO G

**GRÁFICOS DE REGRESIÓN PARA LOS
DATOS OBTENIDOS EN LA ETAPA DE
OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO.**

% DE AC.ACETICO DEL METODO 1 VRS. TIEMPO
 $r^2=0.987102431$ FitStdErr=0.219505488 Fstat=484.715267
 Rank 3 Eqn 6003 $y=a+bx+cx^2+dx^3+ex^4+fx^5+gx^6$
 $a=0.037240702$ $b=0.064599671$ $c=0.076108726$ $d=-0.029059045$
 $e=0.0046227324$ $f=-0.00028302907$ $g=5.7778144E-06$

157



% DE AC.ACETICO DEL METODO 1 VRS. TIEMPO

Nov 5, 2000 5:34 PM

45 Active X-Y Points

X: TIEMPO (DIAS)

Mean: 8

SD: 4.3693144875

Y: % DE AC.ACETICO

Mean: 2.2631111111

SD: 1.7962091676

File Source: VINAM1.PRN

Rank 3 Eqn 6003 $y=a+bx+cx^2+dx^3+ex^4+fx^5+gx^6$

r2 Coef Det
 0.9871024307

DF Adj r2
 0.9846623501

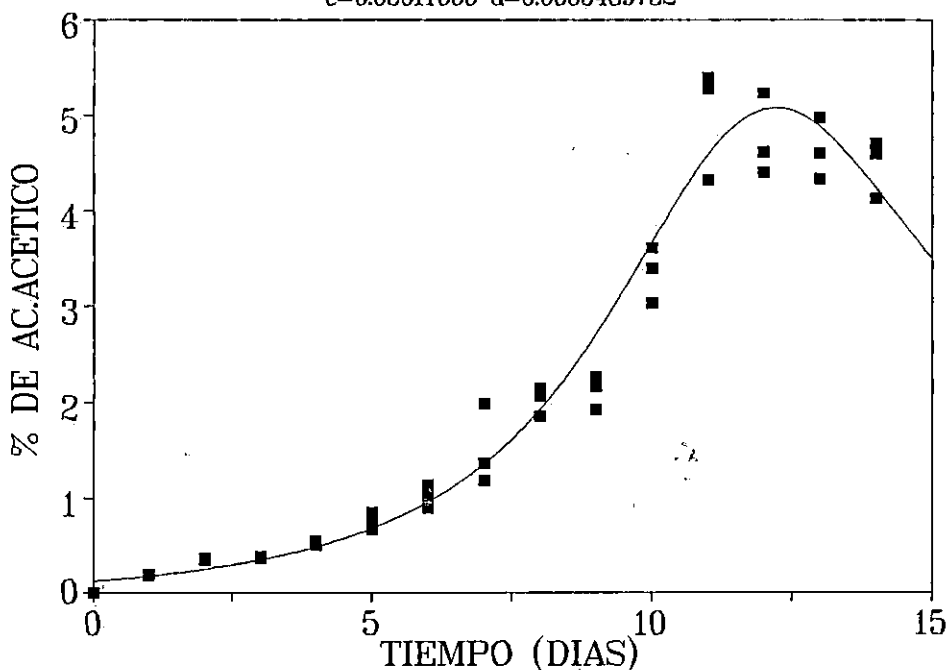
Fit Std Err
 0.2195054882

F-value
 484.7152665

Parm	Value	Std Error	t-value	95% Confidence Limits	
a	0.037240702	0.010814233	3.443674733	0.01535179	0.059129615
b	0.064599671	0.018515005	3.489044207	0.027123753	0.102075589
c	0.076108726	0.020849353	3.650411936	0.033907893	0.118309558
d	-0.02905904	0.012148935	-2.39190052	-0.05364951	-0.00446858
e	0.004622732	0.002116485	2.184155724	0.00033879	0.008906675
f	-0.00028303	0.000150364	-1.88229764	-0.00058738	2.13194e-05
g	5.77781e-06	3.78912e-06	1.524843824	-1.8917e-06	1.34473e-05

% DE AC.ACETICO DEL METODO 2 VRS. TIEMPO
 $r^2=0.967367231$ FitStdErr=0.344097636 Fstat=405.135262
 Rank 1 Eqn 7002 $y=(a+cx)/(1+bx+dx^2)$
 $a=0.11768466$ $b=-0.1540316$
 $c=0.03011666$ $d=0.0065489732$

158



% DE AC.ACETICO DEL METODO 2 VRS. TIEMPO

Nov 5, 2000 5:47 PM

45 Active X-Y Points

X: TIEMPO (DIAS)

Mean: 7

SD: 4.3693144875

Y: % DE AC.ACETICO

Mean: 2.0688888889

SD: 1.8387399616

File Source: VINA2.PRN

Rank 1 Eqn 7002 $y=(a+cx)/(1+bx+dx^2)$

r2 Coef Det
 0.9673672309

DF Adj r2
 0.9641039539

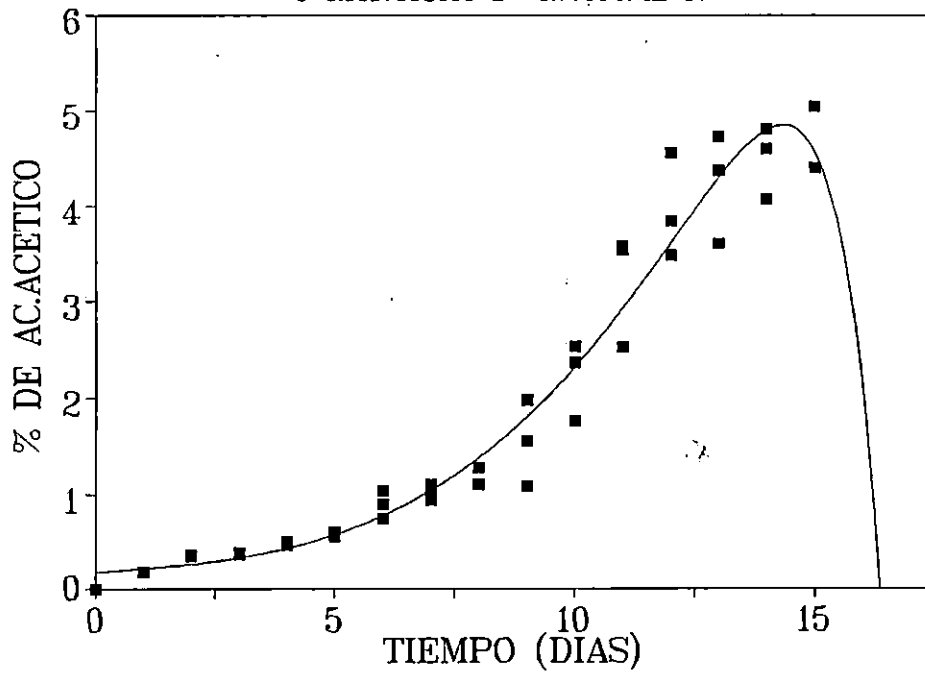
Fit Std Err
 0.344097636

F-value
 405.13526236

Parm	Value	Std Error	t-value	95% Confidence Limits	
a	0.117684658	0.123341885	0.954133773	-0.13136762	0.366736936
b	-0.1540316	0.018549839	-8.30366246	-0.19148748	-0.11657571
c	0.03011666	0.03225261	0.933774355	-0.0350079	0.095241221
d	0.006548973	0.001228464	5.331026374	0.004068456	0.009029491

% DE AC.ACETICO DEL METODO 3 VRS. TIEMPO
 $r^2=0.960637568$ FitStdErr=0.338292176 Fstat=333.534104
 Rank 6 Eqn 2086 $y=a+bx+cx^3+dexpx$
 $a=0.17347901$ $b=0.03578625$
 $c=0.0017998099$ $d=-6.7700272E-07$

159



% DE AC.ACETICO DEL METODO 3 VRS. TIEMPO

Nov 5, 2000 5:44 PM

45 Active X-Y Points

X: TIEMPO (DIAS)

Mean: 7.666666667

SD: 4.395245365

Y: % DE AC.ACETICO

Mean: 1.856444444

SD: 1.6459497887

File Source: VINAM3.PRN

Rank 6 Eqn 2086 $y=a+bx+cx^3+dexpx$

r2 Coef Det
 0.9606375682

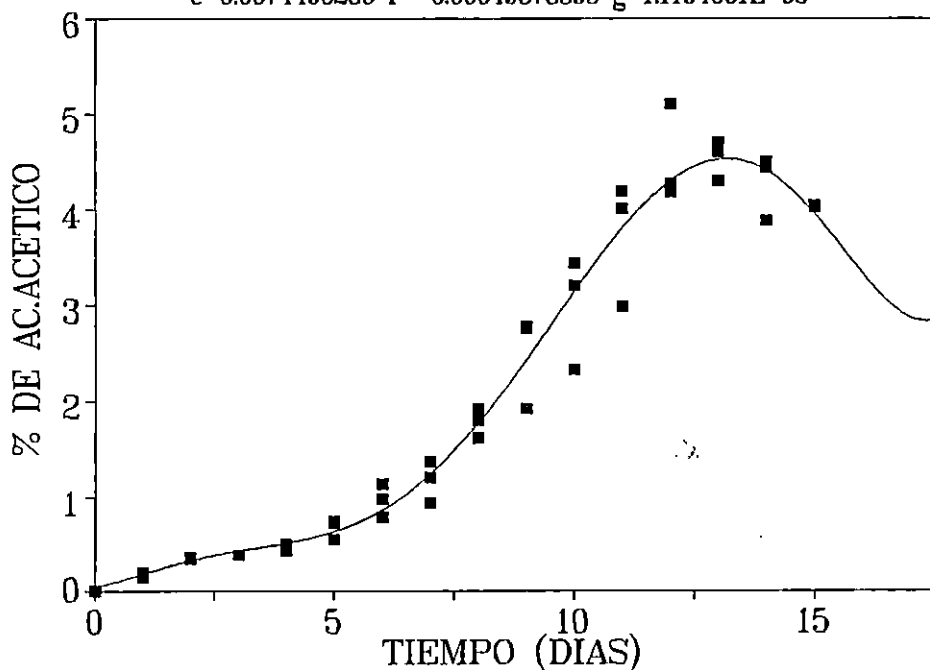
DF Adj r2
 0.956701325

Fit Std Err
 0.3382921757

F-value
 333.53410391

Parm	Value	Std Error	t-value	95% Confidence Limits	
a	0.173479012	0.147829593	1.173506655	-0.12501892	0.471976939
b	0.03578625	0.035608934	1.004979517	-0.03611541	0.107687909
c	0.00179981	0.000204251	8.811743217	0.001387385	0.002212235
d	-6.77e-07	1.38992e-07	-4.87078835	-9.5766e-07	-3.9635e-07

% DE AC.ACETICO DEL METODO 4 VRS. TIEMPO
 $r^2=0.972659715$ FitStdErr=0.300231138 Fstat=225.315066
 Rank 1 Eqn 6003 $y=a+bx+cx^2+dx^3+ex^4+fx^5+gx^6$
 $a=0.046281073$ $b=0.077824818$ $c=0.089384925$ $d=-0.04243357$
 $e=0.0074490286$ $f=-0.00049878895$ $g=1.1194061E-05$



% DE AC.ACETICO DEL METODO 4 VRS. TIEMPO Nov 5, 2000 5:58 PM
 45 Active X-Y Points
 X: TIEMPO (DIAS) Mean: 7.666666667 SD: 4.395245365
 Y: % DE AC.ACETICO Mean: 2.076888889 SD: 1.6874063236
 File Source: VINAM4.PRN

Rank 1 Eqn 6003 $y=a+bx+cx^2+dx^3+ex^4+fx^5+gx^6$

r2	Coef Det	DF Adj	r2	Fit Std Err	F-value
0.9726597147	0.9674872283	0.3002311385	225.31506648		

Parm	Value	Std Error	t-value	95% Confidence Limits	
a	0.046281073	0.015178151	3.04919053	0.015559227	0.077002919
b	0.077824818	0.025352442	3.069716876	0.026509357	0.12914028
c	0.089384925	0.028461673	3.140536517	0.031776118	0.146993731
d	-0.04243357	0.016663671	-2.5464719	-0.07616223	-0.00870491
e	0.007449029	0.002914067	2.556231358	0.001550714	0.013347343
f	-0.00049879	0.000207828	-2.4000095	-0.00091945	-7.8128e-05
g	1.11941e-05	5.25899e-06	2.128558056	5.4943e-07	2.18387e-05

ANEXO H

COMPOSICION DE MEDIOS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO

COMPOSICION DE MEDIOS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICO

CUADRO H.1. COMPOSICION DE MEDIOS DE CULTIVOS PARA BACTERIAS ACETICAS

COMPUESTO	MEDIO SOLIDO GRAMOS/LITRO	MEDIO LIQUIDO GRAMOS/LITRO
CARBONATO DE CALCIO ^a	9.0	9.0
GLUCOSA ^b	36.0	36.0
LEVADURA ^c	7.5	7.5
AGAR GRANULADO	15.0	
ALCOHOL ETILICO	2% V/V	

(Melendez Diaz, et al 1991)

^a Calidad reactivo

^b Glucosa comercial 45° Bé

^c Levadura comercial

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Se preparo 500 ml de medio de cultivo sólido y se dejó reposar por 20 minutos, luego se llevó a ebullición agitando continuamente. El medio líquido se preparó según lo detallado en la tabla anterior.

La esterilización de los medios se realizó por 15 minutos a 15 lb/plg² y 121 °C. Luego se procedió a la inoculación de las bacterias acéticas, teniendo el cuidado de hacerlo en un ambiente estéril para evitar cualquier contaminación de los medios (tanto sólido como líquido) con microorganismos extraños.

ANEXO I

**DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ÁCIDO
ACÉTICO EN MUESTRAS DE VINAGRE**

DETERMINACION DEL CONTENIDO DE ACIDO ACETICO EN MUESTRAS DE VINAGRE

Para la determinación de la acidez se aplico un método de volumetría ácido-base; sin embargo es recomendable el uso de métodos potenciométricos, conductivimétricos o de cromatografía de gases para una mayor precisión de los resultados.

En el método utilizado se miden 5 ml de muestra (Solución de ácido acético a cuantificar) y se introducen en un Erlenmeyer de 125 ml adicionando 50 ml de agua desmineralizada; se añaden 2 gotas de fenolftaleína y se titula con hidróxido de sodio 0.1 N hasta que aparece el primer vire a rosado.

El resultado se obtiene como porcentaje peso / volumen expresado como ácido acético:

$$\% \text{ p/v de } \text{CH}_3\text{COOH} = \frac{V \times N \times \text{meq-gr de } \text{CH}_3\text{COOH}}{V_m}$$

Donde:

V = ml consumidos de NaOH 0.1 N

N = normalidad del NaOH

meq-gr. = miliequivalente gramo de ácido acético (0.06)

V_m = volumen de muestra (ml)

ANEXO J

**MÉTODO ESTADÍSTICO APLICADO
PARA EL ANÁLISIS DE LOS DATOS
EXPERIMENTALES
EXPERIMENTOS FACTORIALES 2^k**

EXPERIMENTOS FACTORIALES 2^k

Casi en cualquier estudio experimental en el que se aplican procedimientos estadísticos a una colección de datos científicos, los métodos implican la realización de ciertas operaciones o cálculos sobre la información de la muestra, seguidos de la obtención de inferencias acerca de la población o de las poblaciones estudiadas. Con frecuencia hay características del experimento sujetas al control del experimentador; cantidades como el tamaño de la muestra, el número de niveles de los factores, las combinaciones de los tratamientos a ser utilizados, etc. Estos parámetros experimentales pueden a menudo tener un gran efecto en la precisión con la cual son probadas las hipótesis o lograda la estimación.

Se conoce como experimento factorial 2^k a los diseños experimentales en los que el plan experimental requiere del estudio del efecto sobre una respuesta de k factores, cada uno de ellos a dos niveles. El diseño factorial completo requiere que cada nivel de todos los factores ocurra con cada nivel de cualquier otro factor, dando como un total de 2^k combinaciones de tratamientos. Se designarán los niveles superiores de los factores A, B, C,... por las letras a, b, c,... y los niveles inferiores de cada factor con la notación (1).

El experimento factorial permite el efecto de todos y cada uno de los factores a ser estimados y probados en forma independiente a lo largo del análisis de varianza usual. Además, los efectos de interacción son evaluados con facilidad. Por ejemplo, si se desea estudiar el efecto de ocho variables, se requieren $2^8 = 256$ combinaciones de tratamientos.

Análisis de varianza

Considere inicialmente un plan factorial 2^2 en el cual hay n observaciones experimentales por cada combinación de tratamientos. Extendiendo la notación anterior, se pueden interpretar los símbolos (1), a, b, y ab como los resultados totales para cada una de las combinaciones de tratamientos. El cuadro F-1 proporciona una tabla con dos direcciones acerca de estos comportamientos totales.

Cuadro J-1. Experimentos factoriales 2²

	B		Media
A	(1)	B	$\frac{b + (1)}{2n}$
	a	Ab	$\frac{ab + a}{2n}$
Media	$\frac{a + (1)}{2n}$	$\frac{ab + b}{2n}$	

Definiéndose los siguientes contrastes entre los totales de los tratamientos:

$$\text{Contraste A} = ab + a - b - (1)$$

$$\text{Contraste B} = ab - a + b - (1)$$

$$\text{Contraste AB} = ab - a - b + (1)$$

Con seguridad habrá exactamente un contraste con un grado de libertad para las medias de cada factor A y B, que se escribirá como:

$$W_A = \frac{ab + a - b - (1)}{2n} = \frac{\text{contraste A}}{2n}$$

y

$$W_B = \frac{ab + b - a - (1)}{2n} = \frac{\text{contraste B}}{2n}$$

El contraste w_A es observado como la diferencia entre la respuesta media a los niveles bajo y alto del factor A. de hecho a w_A se le denomina **efecto principal de A**. De modo

análogo, w_b es el efecto principal del factor B. Se observa una interacción aparente en los datos al inspeccionar la diferencia entre $ab - b$ y $a - (1)$, o entre $ab - b$ y $b - (1)$ en la tabla J-1. Si por ejemplo, $ab - b \approx b - (1)$ o $ab - a - b + (1) \approx 0$, una línea que conecte las respuestas para cada nivel del factor A en el nivel alto del factor B será aproximadamente paralela a una línea que conecte las respuestas para cada nivel del factor A en el nivel bajo del factor B. Las rectas no paralelas de la figura J-1 sugieren la presencia de interacción. Para probar si esta interacción aparente es significativa, se construye un tercer contraste en los totales de los tratamientos, ortogonal a los contrastes del efecto principal, denominado **efecto de interacción**, se obtiene evaluando:

$$W_{AB} = \frac{ab - a - b + (1)}{2n} = \frac{\text{contraste AB}}{2n}$$

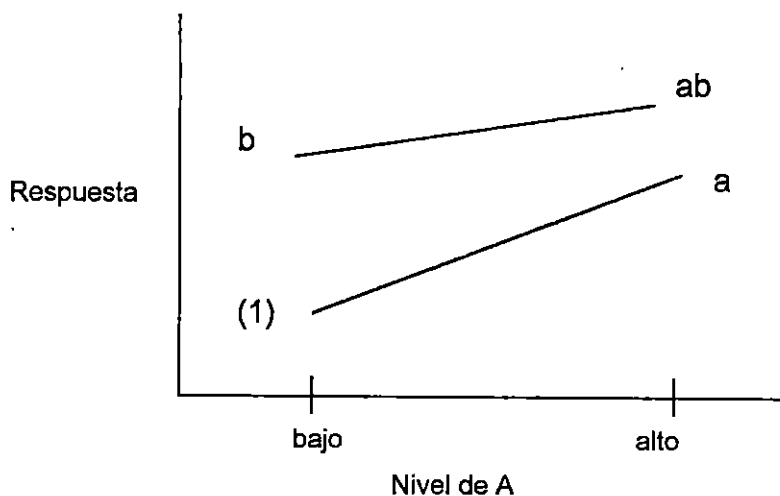


Figura J-1. Respuesta que sugiere interacción aparente.

Se aprovecha el hecho de que en el factorial 2^2 , o para el caso en el experimento factorial 2^k más general, cada efecto de interacción y cada efecto principal está asociado con un grado de libertad. Por ello, es posible escribir $2^k - 1$ contrastes ortogonales con un grado de libertad en las combinaciones de los tratamientos, representando cada uno de ellos la variación debida a algún efecto principal o de interacción. Así, pues bajo las suposiciones usuales sobre independencia y normalidad en el modelo experimental, pueden efectuarse

pruebas para determinar si los contrastes reflejan variación sistemática o sólo variación al azar o aleatoria. Se encuentran las sumas de cuadrados para cada contraste siguiendo los procedimientos planteados para análisis de variación con un solo grado de libertad. Escribiendo $T_{1..} = b + (1)$, $T_{2..} = ab + a$, $c_1 = -1$, y $c_2 = 1$, donde $T_{1..}$ y $T_{2..}$ son el total de las $2n$ observaciones, se tiene:

$$\begin{aligned} \tilde{SSA} = \tilde{SSW}_A &= \frac{\left(\sum_{i=1}^2 c_i T_{i..} \right)^2}{2n \sum_{i=1}^2 c_i^2} \\ &= \frac{[ab + a - b - (1)]^2}{2^2 n} = \frac{(\text{contraste } A)^2}{2^2 n}, \end{aligned}$$

con 1 grado de libertad. De manera análoga, se encuentra que:

$$\tilde{SSB} = \frac{[ab + b - a - (1)]^2}{2^2 n} = \frac{(\text{contraste } B)^2}{2^2 n},$$

y

$$\tilde{SS(AB)} = \frac{[ab + (1) - a - b]^2}{2^2 n} = \frac{(\text{contraste } AB)^2}{2^2 n},$$

Cada uno con un grado de libertad, en tanto que el error de la suma de cuadrados, con $2^2(n-1)$ grados de libertad, se obtiene por sustracción de la fórmula:

$$\tilde{SSE} = \tilde{SST} - \tilde{SSA} - \tilde{SSB} - \tilde{SS(AB)}.$$

Al calcular las sumas de cuadrados para los efectos principales de A y B, y para el efecto de interacción AB, es conveniente presentar los comportamientos totales de las

combinaciones de tratamientos junto con los signos algebraicos apropiados para cada contraste, como en la tabla J-2. Los efectos principales son obtenidos como simples comparaciones entre los niveles bajo y alto. Así, se asigna un signo positivo a la combinación de tratamiento que está en el nivel superior de un factor dado y un signo negativo a la combinación de tratamientos de nivel bajo. Los signos positivo y negativo para el nivel de interacción se obtienen multiplicando los signos correspondientes de los contrastes de los factores que interactúan.

Cuadro J-2. Signos para los contrastes en un experimento factorial 2^2

Combinación de tratamientos	Efecto factorial		
	A	B	AB
(1)	-	-	+
a	+	-	-
b	-	+	-
ab	+	+	+

ANEXO K

GUÍA ARTESANAL DE ELABORACIÓN DE VINAGRE DE AGUA DE COCO

GUÍA ARTESANAL DE
ELABORACIÓN DE
VINAGRE DE AGUA DE
COCO

POR:

Sandra Mónica Artiga

Ana Sabrina Pérez

Olga Dinora Renderos



INTRODUCCIÓN

Para fabricar vinagre también puedes utilizar agua de coco, a continuación te presentamos un proceso fácil y práctico de elaboración de vinagre con agua de coco.

MATERIALES Y EQUIPO



- Los materiales y equipos que necesitas para elaborar vinagre no son difíciles de encontrar, lo que necesitas es:
- Dos barriles o cubetas de plástico con tapadera
- Un pedazo de manguera de unos 5 mm de diámetro
- Una balanza
- Botellas para almacenar el vinagre
- Dos vasos
- Un embudo
- Algodón

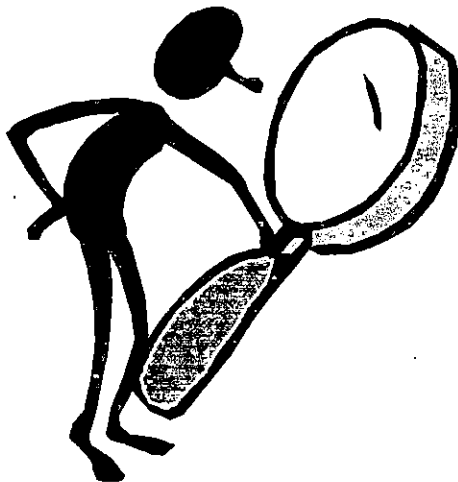
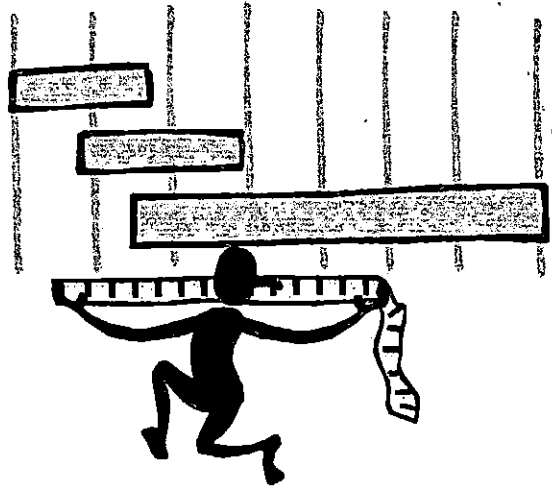
ADEMÁS NECESITARÁS...

- ☞ Agua de coco
- ☞ Levadura de uso en panadería
- ☞ Dulce de panela
- ☞ Vinagre iniciador
- ☞ Madre de vinagre
- ☞ Lejía
- ☞ Azúcar
- ☞ Bisulfito de sodio



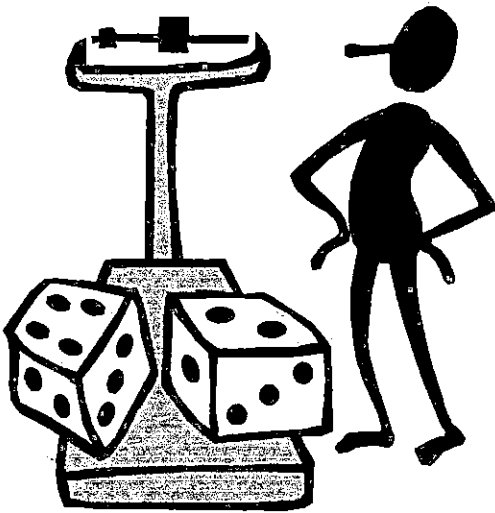
PASO 1

a -Mide el agua de coco que has recolectado.



b -Utiliza un colador para quitar cualquier partícula sólida que se encuentre en el agua, como pedazos de estopa, trozos de coco, etc..

PASO 2



- c - En una balanza pesa 150 gramos de dulce de panela por cada litro de agua de coco que hayas recolectado.

- d - Mezcla el dulce de panela con el agua de coco en un recipiente suficientemente grande donde puedas agitar bien la mezcla para disolver el dulce completamente.



PASO 3

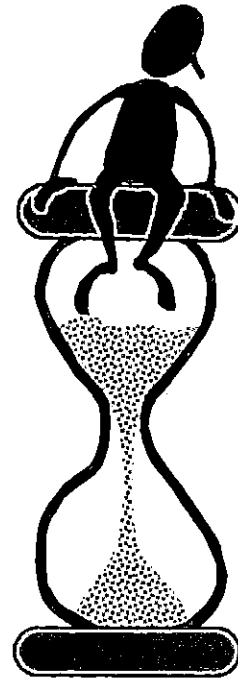
e - Agrega levadura de la utilizada para fabricar pan, a razón de 1 gramo de levadura por litro de agua recolectada.



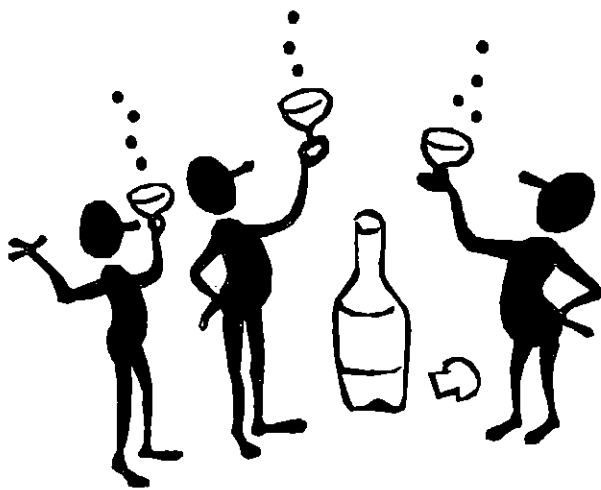
f - Agrega la levadura al agua y cierra el recipiente donde se realizará la fermentación, dejando un pequeño agujero por donde pasará una manguera que estará conectada a un recipiente con lejía.

PASO 4

g - El agua de coco acondicionada se deja por dos días, que son suficientes para obtener la concentración de alcohol necesario para pasar a la etapa de acetificación.



h - Pasados dos días tienes que separar los sólidos que se fueron al fondo del recipiente del agua fermentada, esto lo puedes hacer por decantación.

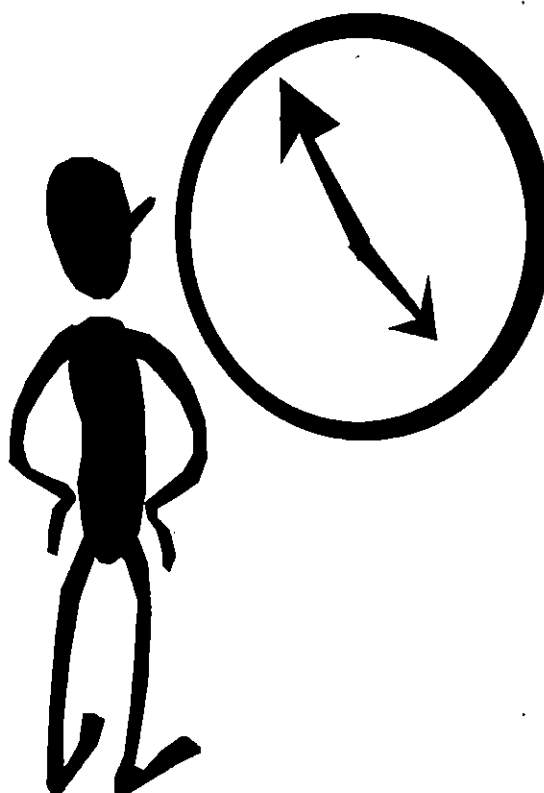


Y ya tienes tu solución alcohólica!!!

PASO 5

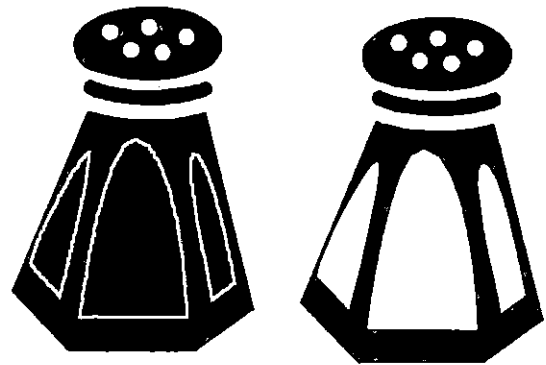
- i - Para iniciar la transformación del alcohol en vinagre se agregaran 20 ml de vinagre iniciador al recipiente que contiene la solución alcohólica y 12 g de madre de vinagre por litro de solución alcohólica.

Ahora hemos iniciado la etapa de producción de vinagre, la que durará un período de 13 a 14 días.



PASO 6

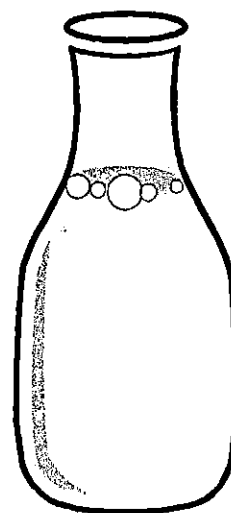
- j - Pasados los 13 a 14 días es necesario detener la formación de vinagre, para lo que debes añadir al vinagre ya filtrado 2.5 gramos de sal por cada diez litros de vinagre.



- k - Para poder almacenar el vinagre una vez terminado el proceso de acetificación se pueden utilizar botellas de segunda mano.

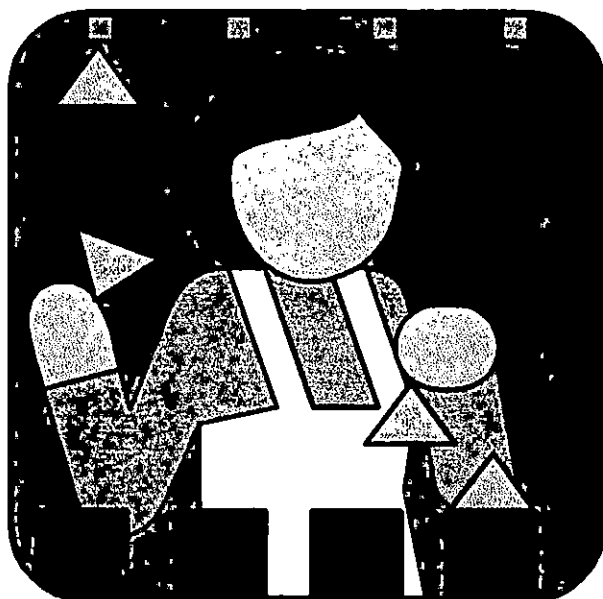
Lavado de las botellas

- Puedes lavar las botellas con detergente y posteriormente con lejía diluida en agua, o dos cucharadas pequeñas de soda cáustica por diez litros de agua. Como último enjuague se utiliza una cucharadita de Bisulfito de Sodio por diez litros de agua, finalmente las botellas se escurren bien.



ALMACENAMIENTO

- Las botellas se llenan con un embudo limpio, se colocan corchos o tapones plásticos, se usarán botellas transparentes. Finalmente se recomienda almacenar el vinagre en un ambiente seco y limpio, protegido del sol.



ANEXO L

**EXPORTACIONES E IMPORTACIONES DE
VINAGRE COMESTIBLE Y SUCEDANEOS
COMESTIBLES DEL VINAGRE OBTENIDOS
CON ÁCIDO ACÉTICO PARA EL PERÍODO DE
1996-1999**

Cuadro L1. Cantidad y valor de importación y exportación según capítulo, sub-capítulo y partida del sistema arancelario Centroamericano (SAC): 1996.

Descripción	Importaciones		Exportaciones	
	Cantidad (Kg)	Valor (¢)	Cantidad (Kg)	Valor (¢)
Total	69,763	394,232	25,784	147,804
USA	13,747	143,540
México	286	2,093
Guatemala	52,079	215,654	12,233	83,067
Nicaragua	13,551	64,737
Venezuela	2,005	16,926
Italia	1,646	16,019

Cuadro L2. Cantidad y valor de importación y exportación según capítulo, sub-capítulo y partida del sistema arancelario Centroamericano (SAC): 1997.

Descripción	Importaciones		Exportaciones	
	Cantidad (Kg)	Valor (¢)	Cantidad (Kg)	Valor (¢)
Total	6,455	58,642	84,693	411,915
Guatemala	5,788	55,782	60,222	237,367
Italia	1,826	5,892
Honduras	667	2,860
Venezuela	205	2,293
USA	22,442	166,273

Cuadro L3. Cantidad y valor de importación y exportación según capítulo, sub-capítulo y partida del sistema arancelario Centroamericano (SAC): 1998.

Descripción	Importaciones		Exportaciones	
	Cantidad (Kg)	Valor (¢)	Cantidad (Kg)	Valor (¢)
Total	9,801	94,646	127,825	728,869
Costa Rica	161	593
Guatemala	9,081	94,646	75,614	276,249
Italia	4,555	29,918
España	261	4,770
USA	37,234	417,339

Cuadro L4. Cantidad y valor de importación y exportación según capítulo, sub-capítulo y partida del sistema arancelario Centroamericano (SAC): 1999.

Descripción	Importaciones		Exportaciones	
	Cantidad (Kg)	Valor (¢)	Cantidad (Kg)	Valor (¢)
Total	7,737	90,906	136,731	855,938
Costa Rica	2,061	21,068
Guatemala	7,737	90,906	60,695	355,881
Italia	806	14,449
Japón	3	52
México	1	3,575
España	408	7,142
USA	72,757	453,771