

# UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA FACULTAD DE CIENCIAS



Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química  
Área de Ingeniería Química

## **ALGUNOS ASPECTOS METODOLÓGICOS EN LA INVESTIGACIÓN SOBRE EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE VINAGRE DE VINO**

Tesis Doctoral presentada por:

Silvia Baena Ruano

Córdoba, abril de 2013

TITULO: *ALGUNOS ASPECTOS METODOLÓGICOS EN LA INVESTIGACIÓN  
SOBRE EL PROCESO DE ELABORACION DE VINAGRE DE VINO*

AUTOR: *SILVIA BAENA RUANO*

---

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

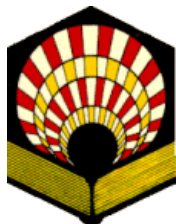
[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---



# UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

## FACULTAD DE CIENCIAS



Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química  
Área de Ingeniería Química

### **ALGUNOS ASPECTOS METODOLÓGICOS EN LA INVESTIGACIÓN SOBRE EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE VINAGRE DE VINO**

Memoria presentada por Doña Silvia Baena Ruano,  
Licenciada en Ciencias Químicas, para aspirar al  
Grado de Doctor en Química.

Córdoba, abril de 2013

Fdo: Silvia Baena Ruano



**ARTURO FCO. CHICA PÉREZ**, Director del Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química de la Universidad de Córdoba.

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral presentada por Doña Silvia Baena Ruano, Licenciada en Ciencias Químicas por la Universidad de Córdoba, titulada **“Algunos aspectos metodológicos en la investigación sobre el proceso de elaboración de vinagre de vino”** ha sido realizada en los laboratorios del Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química, por lo que autorizo su presentación y posterior defensa pública.

Y para que conste y surta los efectos oportunos se firma el presente informe en Córdoba a 8 de marzo de 2013.

Fdo: Arturo Fco. Chica Pérez



**ISIDORO GARCÍA GARCÍA**, Catedrático de Universidad del Área de Ingeniería Química e **INÉS M<sup>a</sup> SANTOS DUEÑAS**, Profesora Ayudante Doctora en el Área de Ingeniería Química, ambos en el Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química de la Universidad de Córdoba.

INFORMAN:

Que el trabajo presentado por Doña Silvia Baena Ruano, titulado **“Algunos aspectos metodológicos en la investigación sobre el proceso de elaboración de vinagre de vino”** ha sido realizado bajo nuestra dirección en los laboratorios del Área de Ingeniería Química, reuniendo todas las condiciones exigidas para su presentación y posterior defensa pública como Tesis Doctoral en la **modalidad de compendio de publicaciones**.

Y para que conste y surta los efectos oportunos se firma el presente informe en Córdoba a 8 de marzo de 2013.

Fdo: Isidoro García García

Fdo. Inés M<sup>a</sup> Santos Dueñas





La normativa reguladora de los estudios de doctorado de la Universidad de Córdoba (Propuesta por la Comisión de Másteres y Doctorado de 14 de diciembre de 2011 y aprobada por Consejo de Gobierno de 21 de diciembre de 2011), establece en su artículo 24, apartado 4 la documentación que ha de incluir una tesis presentada como compendio de publicaciones:

a. Introducción en la que se justifique la unidad temática de la tesis. **[SE PRESENTA EN CAPÍTULO I.](#)**

b. Hipótesis y objetivos a alcanzar, indicando en que publicación o publicaciones se abordan. **[SE PRESENTA EN LOS CAPÍTULOS III, V y VII, no obstante se hace un resumen en Anexo II.](#)**

c. Copia completa de las publicaciones, ya sean publicadas o aceptadas para publicación, donde conste el nombre y adscripción de la autoría y coautoría, en su caso, así como la referencia completa de la revista o editorial en la que los trabajos hayan sido publicados o aceptados para su publicación, en cuyo caso se aportará justificante de la aceptación de la revista o editorial. **[SE PRESENTA EN LOS CAPÍTULOS IV, VI y VIII.](#)**

d. Conclusiones, indicando de qué publicación o publicaciones se desprenden. **[SE PRESENTA EN LOS CAPÍTULOS III, V y VII, no obstante se hace un resumen en Anexo III.](#)**

e. Resúmenes en español y en inglés o, en su defecto, en el idioma habitual para la comunicación científica en su campo de conocimiento científico, técnico o artístico. **[SE PRESENTA EN ANEXO IV.](#)**

f. Otras aportaciones científicas derivadas directamente de la tesis doctoral. **[SE PRESENTA EN ANEXO V.](#)**

g. Informe con el factor de impacto y cuartil del Journal Citation Reports (SCI y/o SSCI) o de las bases de datos de referencia del área en la que se encuentran las publicaciones presentadas. **[SE PRESENTA EN ANEXO VI.](#)**

h. Informe de la persona o personas encargadas de dirigirla, y en caso de que no pertenezcan a la Universidad de Córdoba, deberá avalarse por el tutor o tutora del doctorando. **[SE PRESENTA EN ANEXO VII.](#)**



Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento, de todo corazón, a los Doctores D. Isidoro García García y Dña. Inés María Santos Dueñas, por haber dirigido, en todo este largo camino y de manera tan especial, este trabajo y por su perseverante interés y cuidado en mi formación, orientación académica, profesional y de manera más personal, gracias por su paciencia, confianza, amistad, apoyo, protección, aliento, ... Son mis “angelitos de la guarda”.

También agradecer todo el apoyo y ánimo recibido por mis compañeros del grupo de trabajo, D. José Luis Bonilla Venceslada, D. Jorge E. Jiménez Hornero, Dña. Ana Cañete Rodríguez y D<sup>a</sup>. Carmen M<sup>a</sup> Álvarez Cáliz, porque siempre están dispuestos a echarme una mano.

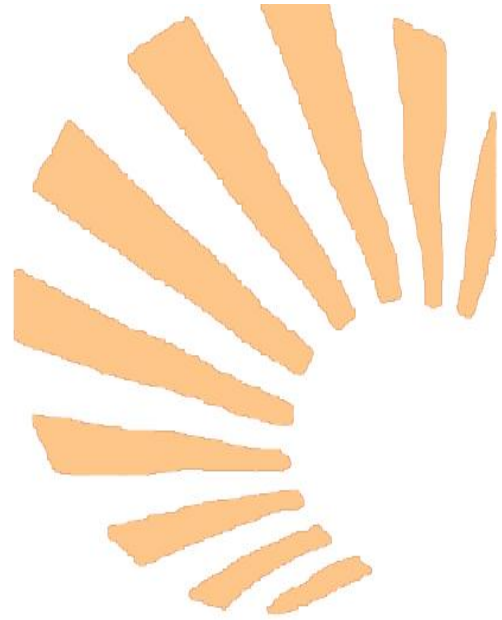
Gracias a todos y cada uno de mis compañeros del Área de Ingeniería Química del Departamento de Química Inorgánica e Ingeniería Química de la Universidad de Córdoba.

Como no, agradecer el apoyo de toda mi familia: a Feli, a mi niña, a mis padres, a mi hermana Yrene, a mis suegros, a mis abuelos y a mis amigos, por animarme a seguir en esta ardua labor.



**A mis tesoros: Feli y Daniela**





# ÍNDICE





<b>I. RESUMEN Y CONTEXTO.....</b>	<b>1</b>
<b>II. HISTORIA, ASPECTOS BÁSICOS E IMPORTANCIA DEL VINAGRE.....</b>	<b>9</b>
II.1. El Vinagre.....	11
II.1.1. Definición .....	11
II.1.2. Tipos de Vinagres .....	15
II.1.3. Evolución Histórica .....	18
II.2. Las bacterias acéticas.....	22
II.2.1. Descripción .....	22
II.2.2. Historia.....	24
II.2.3. Situación actual de la taxonomía de la bacteria acética .....	26
II.2.4. Metabolismo de las bacterias acéticas .....	35
II.2.4.1. Metabolismo del etanol.....	35
II.2.4.2. Metabolismo de los hidratos de carbono.....	38
II.2.4.3. Formación de acetoína .....	40
II.3. Métodos de elaboración de vinagre .....	40
II.3.1. Métodos artesanales de acetificación.....	42
II.3.2. Métodos industriales de acetificación con cultivo superficial ...	42
II.3.2.1. Método de Orleáns.....	43
II.3.2.2. Método Luxemburgués .....	46
II.3.2.3. Método de Schützenbach o método alemán .....	47

II.3.3. Comparación de los diferentes métodos de acetificación con cultivo superficial.....	49
II.3.4. Métodos de acetificación con cultivo sumergido.....	51
II.3.4.1. Acetator Frings.....	52
II.3.5. Métodos de obtención de vinagres artesanales de alta calidad amparados por denominaciones de origen .....	55
II.3.5.1. Vinagre Balsámico Tradicional de Módena.....	56
II.3.5.2. El Vinagre de Jerez .....	58
II.3.5.3. Vinagre del Condado de Huelva .....	60
II.3.5.4. Vinagre de Montilla-Moriles .....	62
II.4. Proceso industrial de elaboración del vinagre .....	65
II.4.1. Recepción y preparación de la materia prima.....	65
II.4.2. Fermentación .....	66
II.4.3. Clarificación.....	67
II.4.3.1. Autoclarificación.....	68
II.4.3.2. Clarificación físico-química.....	68
II.4.4. Envejecimiento .....	69
II.4.5. Filtración.....	71
II.4.6. Estabilización.....	72
II.4.7. Envasado .....	73
II.5. Importancia de la industria de fabricación de vinagre .....	74

<b>III. HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y CONCLUSIONES – CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS.....</b>	<b>79</b>
III.1. Introducción.....	81
III.2. Objetivo.....	82
III.3. Fundamentos .....	83
III.4. Metodología.....	89
III.5. Resultados y conclusiones.....	91
<b>IV. PUBLICACIÓN – CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS .....</b>	<b>101</b>
IV.1. Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process.....	103
<b>V. HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y CONCLUSIONES – ESTIMACIÓN DE VELOCIDAD MEDIA .....</b>	<b>109</b>
V.1. Introducción.....	111
V.2. Condiciones de fermentación .....	112
V.3. Método propuesto.....	113
V.3.1. Análisis de la velocidad media de desaparición de etanol .....	115
V.3.2. Análisis de la velocidad media de formación de ácido acético.....	123
V.3.3. Análisis de la producción global de ácido acético .....	125
V.4. Método para la estimación de las velocidades medias en un conjunto de ciclos de acetificación de vino.....	126
V.4.1. Análisis de la velocidad media de desaparición de etanol .....	128
V.4.2. Análisis de la velocidad media de formación de ácido acético.....	135

V.4.3. Análisis de la producción global de ácido acético .....	139
V.5. Conclusiones .....	140
<b>VI. PUBLICACIÓN – ESTIMACIÓN DE VELOCIDAD MEDIA .....</b>	<b>143</b>
IV.1. Estimating the mean acetification rate via on-line monitored changes in ethanol during a semi-continuous vinegar production cycle.....	145
<b>VII. HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y CONCLUSIONES – EJEMPLOS..</b>	<b>151</b>
VII.1.1. Resumen .....	153
VII.1.2. Introducción.....	153
VII.1.3. Objetivo .....	156
VII.1.4. Resultados y conclusiones .....	156
VII.2.1. Resumen .....	164
VII.2.2. Introducción.....	165
VII.2.3. Resultados y discusión.....	166
<b>VIII. PUBLICACIONES – EJEMPLOS DE APLICACIÓN.....</b>	<b>169</b>
VIII.1. Relationship between changes in the total concentration of acetic acid bacteria and major volatile compounds during the acetic acid fermentation of white wine.....	171
VIII.2. Influence of the final ethanol concentration on the acetification and production rate in the wine vinegar process.....	178
<b>ANEXO I. MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES .....</b>	<b>183</b>
A1.1. Materia prima .....	185
A1.2. Microorganismos.....	185
A1.3. Métodos de análisis .....	185

A1.3.1. Preparación de muestra.....	185
A1.3.2. Grado acético, % (m/v) o acidez total.....	186
A1.3.3. Grado alcohólico volumétrico o % (v/v) de etanol.....	189
A1.3.4. Método de cuantificación de volátiles mayoritarios y polioles .....	199
A1.4 Sistema experimental.....	203
A1.4.1. Elementos del equipo de trabajo y de control.....	204
A1.4.2. Elementos de control del proceso: software necesario para adquisición y control de datos .....	213
<b>ANEXO II. RESUMEN DE HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>221</b>
<b>ANEXO III. CONCLUSIONES.....</b>	<b>227</b>
<b>ANEXO IV. RESUMEN - ABSTRACT .....</b>	<b>233</b>
<b>ANEXO V. OTRAS APORTACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DIRECTAMENTE DE LA TESIS DOCTORAL .....</b>	<b>241</b>
<b>ANEXO VI. INFORME DE LAS PUBLICACIONES PRESENTADAS.....</b>	<b>245</b>
<b>ANEXO VII. INFORME DE LOS DIRECTORES .....</b>	<b>249</b>

---

Tabla II.2.1. Géneros y especies de bacterias acéticas .....	27
Tabla II.5.1. Comercialización de “vinagres de vino” en el ejercicio 2004 .....	75
Tabla III.1.1. Clasificación de diferentes métodos para la determinación de la concentración celular .....	82
Tabla VII.2.1. Valores experimentales de: duración de cada fase, tiempo final del ciclo, acidez final y volumen medio global para las diferentes condiciones estudiadas. Se indican las desviaciones estándar .....	166
Tabla VII.2.2. Valores calculados de las velocidades medias de desaparición de etanol en cada fase, global de desaparición de etanol y de formación de ácido acético y la producción de ácido acético. Se indican las desviaciones estándar .....	167
Tabla A1.3.1. Correcciones a efectuar sobre el grado alcohólico aparente para corregir la influencia de la temperatura .....	193



---

Figura II.2.1. Fotografías realizada mediante microscopía electrónica de barrido de las bacterias acéticas contenidas en el fermentador empleado.....	23
Figura II.2.2. Esquema del proceso de oxidación del etanol a ácido acético ....	37
Figura II.2.3. Rutas principales del metabolismo oxidativo en las bacterias acéticas .....	39
Figura II.3.1. Pilas de botas para la acetificación en una fábrica del vinagre por el método de Orleáns.....	44
Figura II.3.2. Acetificación por el método de Orleáns .....	45
Figura II.3.3. Cuba rotatoria del método Luxemburgués .....	47
Figura II.3.4. Esquema del método Schützenbach o alemán para la producción de vinagres vnicos .....	49
Figura II.3.5. Acetator Frings en acero inoxidable.....	53
Figura II.3.6. Elaboración de Vinagre Balsámico de Módena (Italia).....	57
Figura II.3.7. Tipos de vinagres de la Denominación de Origen “Vinagre de Jerez” .....	60
Figura II.3.8. Tipos de vinagres de la Denominación de Origen “Vinagre de Condado de Huelva”.....	62
Figura II.3.9. Tipos de vinagres de la Denominación de Origen “Vinagre de Montilla-Moriles” .....	64
Figura II.4.1. Esquema del proceso de fabricación industrial de vinagre .....	65
Figura II.4.2. Sistema de soleras .....	70
Figura II.5.1. Ventas de Vinagre en la Unión Europea en el año 2004.....	74
Figura II.5.2. Producción de vino nuevo y dedicación para vinagrería en España .....	76

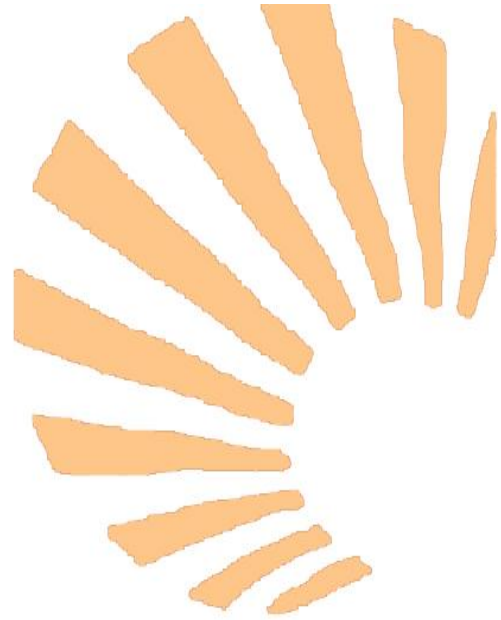
Figura II.5.3. Producción en España de vinos blancos, tintos y rosados y su dedicación para vinagrería.....	76
Figura II.5.4. Ventas de vinagre con denominación de origen de Jerez.....	77
Figura III.3.1. Estructura de la molécula de yoduro de propidio .....	85
Figura III.3.2. Espectro de absorción y de emisión de la molécula de yoduro de propidio .....	85
Figura III.3.3. Espectro de absorción y de emisión de la molécula de SYTO9 .....	86
Figura III.3.4. Estructura de cianina compleja .....	87
Figura III.3.5. Estructura de tricarboxicianinas con sustituyentes en la cadena metínica.....	87
Figura III.3.6. Estructura de cianina asimétrica .....	87
Figura III.3.7. Esquemas de unión covalente de ADN: (a) unión entre pares de bases de una molécula de ADN y (b) unión en las ranuras menores de la hélice de ADN, tomando como ejemplo una molécula de color negro .....	88
Figura III.4.1. Fotografía del microscopio óptico empleado.....	90
Figura III.4.2. Cámara de Neubauer empleada para realizar el recuento de células y cuadrado grande central de la cámara de Neubauer .....	90
Figura III.5.1. Fotografía de un mini-cuadrado visto en el microscopio óptico.....	91
Figura III.5.2. Fotografía de un mini-cuadrado visto en el microscopio óptico con los filtros U-MNB2 y U-MNG2 .....	92
Figura III.5.3. Desviación estándar de la concentración de células totales empleando diferentes diluciones de una misma muestra mediante el método propuesto .....	93

Figura III.5.4. Dispersión de los tamaños y granulometrías de las bacterias acéticas mediante citometría de flujo .....	95
Figura III.5.5. Dispersión de las bacterias acéticas coloreadas con el kit LIVE/DEAD BackLight® mediante citometría de flujo.....	95
Figura III.5.6. Comparación entre el porcentaje de viabilidad determinado mediante el método propuesto con conteo directo empleando cámara de Neubauer y citometría de flujo .....	96
Figura III.5.7. Regresión de los datos obtenidos para el porcentaje de viabilidad determinado mediante el método propuesto con conteo directo empleando cámara de Neubauer y citometría de flujo .....	97
Figura III.5.8. Fotografía de colonias de bacterias acéticas sembradas en placas .....	98
Figura III.5.9. Comparación entre recuento en placa y conteo directo en microscopio en la cámara de Neubauer.....	98
Figura III.5.10. Evolución de la acidez y concentración de células viables con respecto el tiempo para un ciclo de acetificación de vino .....	100
Figura V.3.1. Evolución del volumen y de la concentración de etanol en un ciclo típico de acetificación de vino .....	114
Figura V.3.2. Evolución de la concentración de etanol experimental y estimada, así como, el volumen durante la primera etapa de carga rápida.....	115
Figura V.3.3. Evolución del volumen experimental y su ajuste durante la segunda fase de carga lenta .....	118
Figura V.3.4. Evolución de la concentración de etanol experimental durante la etapa de agotamiento .....	120
Figura V.3.5. Velocidad global de desaparición de etanol y de formación de ácido acético en el ciclo.....	125

Figura V.4.1. Evolución del volumen y de la concentración de etanol en ocho ciclos repetidos de acetificación de vino .....	127
Figura V.4.2. Evolución de la concentración de etanol experimental y estimada, así como, el volumen durante la primera etapa de carga rápida en ocho ciclos repetidos .....	128
Figura V.4.3. Evolución del volumen experimental y su ajuste durante la fase de carga lenta en ocho ciclos repetidos.....	130
Figura V.4.4. Evolución de la concentración de etanol experimental durante la etapa de agotamiento .....	132
Figura V.4.5. Velocidad global de desaparición de etanol y de formación de ácido acético en el ciclo.....	139
Figura V.4.6. Captura de pantalla de la hoja de cálculo realizada para la obtención de los valores de las velocidades y la producción del sistema.....	140
Figura VII.1. Evolución de la concentración de etanol, ácido acético, oxígeno disuelto y células totales, así como del volumen del medio durante el ciclo de acetificación.....	157
Figura VII.2. Contenido en compuestos volátiles del vino de partida y del vinagre obtenido.....	158
Figura VII.3. Variación de las concentraciones de acetoina, acetato de etilo y células totales a lo largo del ciclo de acetificación.....	159
Figura VII.4. Variación de las concentraciones de alcoholes isoamílicos, isobutanol y 1-propanol y células totales a lo largo del ciclo de fermentación.....	161
Figura VII.5. Variación de las concentraciones de etil lactato, acetaldehído y células totales a lo largo del ciclo de acetificación.....	162
Figura A1.3.1. Fotografía del montaje empleado para la determinación del grado acético o la acidez total .....	187

Figura A1.3.2. Esquema del aparato de destilación y aerómetro .....	190
Figura A1.3.3. Fotografía del aparato de destilación y uno de los aerómetros empleados para la medida del grado alcohólico volumétrico.....	191
Figura A1.3.4. Esquema del ebulómetro de Dujardin-Salleron empleado.....	195
Figura A1.3.5. Fotografía del ebulómetro de Dujardin-Salleron empleado...	195
Figura A1.3.6. Fotografía de la regla deslizante o disco de cálculo empleado .....	196
Figura A1.3.7. Fotografía del cromatógrafo de gases empleado.....	198
Figura A1.3.8. Fotografía del cromatógrafo de gases empleado.....	200
Figura A1.3.9. Cromatograma obtenido por el análisis por cromatografía de gases de los patrones empleados.....	201
Figura A1.4.1. Dispositivo experimental utilizado en el laboratorio .....	204
Figura A1.4.2. Fotografía del fermentador vacío empleado en el laboratorio .....	205
Figura A1.4.3. Fotografía del sistema de condensación empleado en la salida de gases del fermentador, sin y con recubrimiento aislante para el mejor funcionamiento.....	206
Figura A1.4.4. Sensor de presión diferencial .....	207
Figura A1.4.5. Sensor de temperatura y de oxígeno disuelto.....	208
Figura A1.4.6. Sensor y transductor de la señal de la concentración de alcohol .....	209
Figura A1.4.7. Módulos de adquisición y tratamiento de las señales e interfaz de red.....	210
Figura A1.4.8. Electroválvula .....	211

Figura A1.4.9. Resistencia eléctrica .....	211
Figura A1.4.10. Bombas peristálticas empleadas en la carga y descarga.....	212
Figura A1.4.11. Vista de la pantalla principal del proceso.....	214
Figura A1.4.12. Vista de la pantalla de monitorización del proceso.....	215
Figura A1.4.13. Vista de la pantalla de los parámetros de control automático .....	216
Figura A1.4.14. Vista de la pantalla del control manual del proceso.....	218
Figura A1.4.15. Vista de la pantalla de calibración del proceso .....	219
Figura A1.4.16. Vista de la pantalla de observación .....	220



## **CAPÍTULO I**

### **RESUMEN Y CONTEXTO**





En el contexto del estudio y posible optimización del proceso de elaboración de vinagre, es necesario evaluar cuáles son las principales variables que le afectan y cuantificar el grado de influencia sobre diversas funciones objetivo que pudieran establecerse.

Una de las etapas más sensibles del proceso global en la que se pueden encontrar más oportunidades para su optimización es la correspondiente a la de biotransformación. Como se sabe, para llevar a cabo la acetificación del medio alcohólico se emplean biorreactores en los que, además de ser muy eficientes desde el punto de vista de la transferencia de materia, se han de minimizar las pérdidas de volátiles provocadas por arrastre de la corriente de aire que circula, de modo continuo, a través del reactor<sup>1</sup>.

Un aspecto fundamental es el modo operativo de estos biorreactores. En principio, por las características del metabolismo microbiano ante el que nos encontramos, sería posible trabajar tanto en modo discontinuo, semicontinuo o, incluso, continuo. Aunque la elección final depende de múltiples factores, en general, se ha de garantizar que el modo elegido ofrezca un entorno adecuado para el desarrollo y actividad de las bacterias acéticas. En este sentido, es necesario conocer cuáles son las variables que más afectan al comportamiento de estas bacterias y de qué manera, en función de que se trabaje de una forma o de otra, se modifican estas variables.

El comportamiento de las bacterias acéticas, en el contexto de la elaboración de vinagre, ha sido objeto de múltiples estudios<sup>2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12</sup>

---

<sup>1</sup> García-García, I.; Santos-Dueñas, I.M.; Jiménez-Ot, C.; Jiménez-Hornero, J. y Bonilla-Venceslada, J. (2009). "Chapter 6: Vinegar Engineering". In: *Vinegars of the World*. Solieri, L. y Giudici, P. Eds. Springer-Verlag, Italia, 97-120.

<sup>2</sup> Nieto, F.J. (1991). "Algunos aspectos de la tecnología de la fermentación acética". En: *El Vinagre de Vino*. Llaguno-Marchena, C. y Polo, M.C. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.

<sup>3</sup> Ebner, H.; Sellmer, S. y Follmann, H. (1996). "Acetic acid". In Rehm H.J., Reed G. (eds) "Biotechnology", 2º ed. VCH Weinheim, volumen 6, 381-401.

<sup>4</sup> Tesfaye, W.; Morales, M.L.; García-Parrilla, M.C. y Troncoso A.M. (2002). "Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation". *Trends Food Science & Technology* 13, 12-21.

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

<sup>6</sup> González-Sáiz, J.M.; Pizarro, C. y Garrido-Vidal, D. (2003). "Evaluation of kinetic models for industrial acetic fermentation: proposal of a new model optimized by genetic algorithms". *Biotechnology Progress* 19, 599-611.

en los que se ha puesto de manifiesto su sensibilidad a diversas variables entre las que destacan: la temperatura, las concentraciones de etanol y ácido acético, la suma de ambas y la disponibilidad de oxígeno disuelto en el medio de cultivo. Así por ejemplo, la exposición a niveles altos de etanol y ácido acético implican una fuerte inhibición bacteriana; en concreto, cuando la concentración de etanol supera valores de  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , la velocidad de acetificación disminuye. Por otro lado, el efecto de su exposición a una escasez de etanol tiene un mayor o menor efecto sobre ellas dependiendo de la acidez del medio. Por lo tanto, la selección del modo operativo se verá condicionado por influencias como las comentadas; así por ejemplo, si se deseara obtener un vinagre de alta graduación, el empleo de un modo continuo de trabajo limitaría los valores máximos de acidez a valores de 8-9 %, dado que una acidez final superior implicaría un entorno muy hostil para las bacterias que reduciría mucho su actividad.

Por otro lado, el trabajo en modo discontinuo, además de la menor productividad que normalmente implica, tiene un importante inconveniente para este proceso como es la de la preparación de los inóculos para cada ciclo. La dificultad para el mantenimiento y propagación de cultivos de este tipo de bacterias, así como la necesidad de adaptación de éstas al medio que se pretende acetificar, hace muy difícil la estabilidad de un proceso industrial basado en este modo de trabajo.

---

<sup>7</sup> Emde, F. (2006). "State of the art technologies in submersible vinegar production". Eds: García-García, I. Second Symposium on R+D+I for Vinegar Production, 101-109. Córdoba, España.

<sup>8</sup> Sellmer, S. (2006). "New strategies in process control for the production of wine vinegar". Eds: García-García, I. Second Symposium on R+D+I for Vinegar Production, 127-132. Córdoba, España.

<sup>9</sup> Jiménez-Hornero, J.E.; Santos-Dueñas, I.M. y García-García, I. (2008). "Structural identifiability of a model for the acetic acid fermentation process". *Mathematical Biosciences* 216, 154-162.

<sup>10</sup> Jiménez-Hornero, J.E.; Santos-Dueñas, I.M. y García-García, I. (2009). "Optimization of biotechnological processes. The acetic acid fermentation. Part I: The proposed model". *Biochemical Engineering Journal*, 45, 1-6.

<sup>11</sup> Jiménez-Hornero, J.E.; Santos-Dueñas, I.M. y García-García, I. (2009). "Optimization of biotechnological processes. The acetic acid fermentation. Part II: Practical identifiability analysis and parameter estimation". *Biochemical Engineering Journal*, 45, 7-21.

<sup>12</sup> Jiménez-Hornero, J.E.; Santos-Dueñas, I.M. y García-García, I. (2009). "Optimization of biotechnological processes. The acetic acid fermentation. Part III: Dynamic optimization". *Biochemical Engineering Journal*, 45, 22-29.

En la práctica, el modo que, mayoritariamente se ha impuesto para la elaboración industrial de vinagre es el modo semicontinuo. En este caso, el fermentador trabaja por ciclos en los que al final de cada uno se descarga una parte del medio de cultivo, quedando el resto como inóculo para el ciclo siguiente en el que se repone con medio fresco el volumen de producto retirado en el ciclo previo. Dependiendo de variables operacionales tales como la concentración de etanol residual y acidez existentes en el momento de la descarga, del volumen que se descargue y del modo mediante el cual se reponga el volumen descargado, las bacterias que quedan en el fermentador se ven expuestas a condiciones ambientales muy diferentes que afectan a su concentración y actividad.

Básicamente, con este método de trabajo:

- Se puede aprovechar una parte de la biomasa generada en un ciclo para el siguiente.
- A través de la selección adecuada del valor de las variables operacionales se pueden controlar las concentraciones de etanol y de ácido acético dentro de un rango adecuado para las bacterias acéticas. De este modo, se produce, de forma natural, una autoselección de las bacterias más adecuadas para el medio concreto con el que se esté trabajando.
- El punto anterior permite, en la práctica, adaptar el fermentador para la elaboración de productos dentro de un margen relativamente amplio de acidez final.

Pues bien, si se desea evaluar el efecto que las diferentes variables sobre las que se puede actuar tienen sobre el sistema, es necesario el desarrollo de una amplia investigación experimental que permita encontrar, de la forma más rigurosa posible, las relaciones existentes entre éstas y determinadas funciones objetivo que puedan plantearse. El número de variables implicadas así como las complejas interrelaciones existentes en este caso, hacen recomendables el empleo de modelos matemáticos que, una vez demuestren su capacidad para reproducir los resultados experimentales, puedan emplearse para optimizar el sistema.

Existen diferentes tipos de modelos para representar el comportamiento de un sistema dado. El tipo de aproximación a seguir depende mucho de las características del proceso que se pretende modelar así como, del objetivo y uso concreto que se desee para el modelo en cuestión.

Por ejemplo, si con el modelo sólo se desea poder reproducir unos resultados experimentales y saber cuál sería la respuesta del sistema ante determinados valores de sus variables operacionales, para su utilización como elemento de control o para la optimización de sus variables operacionales, un modelo tipo caja negra podría ser suficiente. En este caso, se pueden emplear ecuaciones polinomiales, de segundo orden en muchos casos, que generan superficies cuadráticas que son muy efectivas para el objetivo buscado. Otras posibilidades para esta aproximación al modelado pueden ser los denominados sistemas basados en “lógica difusa”<sup>13</sup> o bien el empleo de redes neuronales.

En general, estos modelos no entran en buscar explicaciones de por qué los resultados son los que son, sino que se limitan, por el procedimiento que sea, a encontrar relaciones entre las variables que nos interesen y determinadas funciones objetivo. No están interesados en saber, por ejemplo, si la aparente disminución de la velocidad de fermentación está causada por la existencia de una baja concentración de células o de una disminución de su actividad provocada por una alta acidez o bien una escasez de sustrato o por la causa que sea. Son aproximaciones muy prácticas para la optimización y/o el control de un proceso y que no tienen interés en profundizar en los conocimientos básicos de tipo bioquímico y microbiológico que sustentan el proceso en sí.

Por otro lado, existen aproximaciones más estructuradas que, basadas en ecuaciones de conservación (balance de materia y energía), relaciones cinéticas y de equilibrio, intentan, no sólo reproducir los resultados experimentales, sino que, además, pretenden comprender el porqué de esos resultados. Son modelos con los que se intenta profundizar en nuestro nivel de conocimientos sobre los aspectos básicos del sistema con el que se trabaja. En el caso de la elaboración de vinagre<sup>14, 15</sup> se han realizado diversas propuestas para intentar explicar las complejas relaciones existentes entre las bacterias acéticas y las variables sobre las que, de modo directo o indirecto, podemos actuar. Dado el modo semicontinuo con el que se trabaja y la complejidad de las ecuaciones cinéticas que se suelen proponer, estos modelos conducen a complejos sistemas de ecuaciones diferenciales que pueden implicar difíciles problemas matemáticos para su resolución. Sin embargo, el esfuerzo que exigen

---

<sup>13</sup> Arnold, S.; Becker, T.; Delgado, A.; Emde, F. y Enenkel, A. (2002). “Optimizing high strength acetic acid bioprocess by cognitive methods in an unsteady state cultivation”. *Journal of Biotechnology* 97, 133-145.

<sup>14</sup> Véase referencia nº 6 página 3.

<sup>15</sup> Jiménez-Hornero, J. y García-García, I. (2006). “Estudio de la identificabilidad estructural de un modelo para el proceso de la fermentación acética”. Eds: García-García, I. *Second Symposium on R+D+I for Vinegar Production*, 185-192. Córdoba, España.

para su planteamiento puede ser aprovechado, para, como se ha indicado, avanzar en el conocimiento de los aspectos bioquímicos y microbiológicos que hacen posible la biorreacción.

Para el desarrollo de modelos de este tipo, y desde luego en el caso del bioproceso que nos ocupa, es fundamental la realización de una ímproba labor experimental que suministre suficientes resultados experimentales para poder estimar adecuadamente los parámetros del modelo. **Entre las variables que hay que determinar es fundamental la determinación de la concentración de células totales y viables para, en primer lugar, evaluar la influencia de las principales variables que afectan al proceso de acetificación sobre la biomasa responsable de éste.** Así por ejemplo, la realización de experimentos con diferentes condiciones operativas en los que se modifiquen los valores medios de etanol y acidez de los ciclos y en los que se siga la evolución de la concentración de células viables, pueden sugerir o no la existencia de inhibiciones por parte de alguno de estos componentes clave en el sistema. Esto justificaría determinadas propuestas de ecuaciones cinéticas en las que se tienen en cuenta estas influencias<sup>16</sup>.

Igualmente, como una medida representativa del comportamiento del sistema, **es importante la evaluación de las velocidades de fermentación.** En concreto, en este caso se ha de determinar la velocidad instantánea y media a lo largo del ciclo. Esta velocidad puede estar referida al consumo de etanol o bien a la del aumento de la acidez; si bien, ambas, normalmente coinciden, no tiene por qué. Así por ejemplo, cuando parte del etanol desaparece del medio por arrastre con el aire que se emplea para la oxigenación, el consumo aparente de etanol es mayor que la generación de ácido acético. Por lo tanto, el modelado necesita de medidas adecuadas de estas velocidades que permitan comprobar las relaciones que se propongan para explicar la influencia de las variables del sistema.

Pues bien, en todo este contexto, en este trabajo:

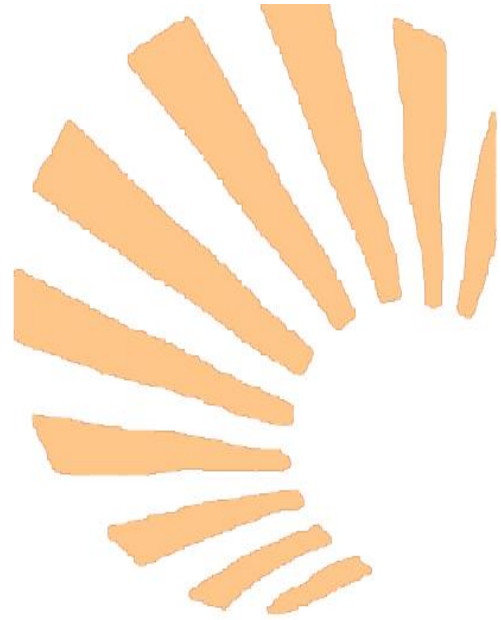
- Se ha desarrollado una metodología rápida para la determinación de la concentración de células totales y viables durante la acetificación.
- Se ha desarrollado un método para la evaluación de las velocidades de fermentación a partir de medidas online de la concentración de etanol existente en cada momento.

---

<sup>16</sup> Véase referencia nº 10 página 4.

- Finalmente, y a modo de ejemplo, se muestran dos aplicaciones para las que la disponibilidad de estas técnicas es absolutamente necesaria.

Si se desea obtener una visión más profunda del contexto e importancia del proceso de elaboración de vinagre, se recomienda la lectura del siguiente capítulo: “**Historia, contexto e importancia de la elaboración de vinagre de vino**”.



## **CAPÍTULO II**

# **HISTORIA, ASPECTOS BÁSICOS E IMPORTANCIA DEL VINAGRE**





## II.1. EL VINAGRE.

### II.1.1. Definición.

El vinagre es un producto que se conoce desde la antigüedad, y que ha sido definido de diferentes formas, atendiendo, entre otros aspectos, al nivel de conocimientos existentes en cada momento. La palabra vinagre procede etimológicamente del latín “*vinum acre*”, equivalente a “*vino duro*” de la que deriva la locución francesa “*vin aigre*” cuyo significado es vino agrio, pero en esta acepción su procedencia no queda relegada al vino, sino que puede aplicarse a cualquier sustrato amiláceo<sup>17</sup>. En todas las lenguas latinas tiene una procedencia similar con excepción del italiano, que toma el nombre de su principal componente, el ácido acético, y lo llaman “*aceto*”. Sin embargo, si comprobamos el significado de la palabra “*aigre*”, en francés antiguo, descubriremos que su significado era “*agudo*”, “*intenso*” o “*penetrante*”, mientras que en latín, “*acer*” también significa “*intenso*”. Esto indica que el nombre del vinagre puede haber significado originariamente “vino intenso” en lugar de “*agrio*”. A partir de aquí, por extensión, se denominan vinagres a los productos resultantes de la fermentación acética de diversos sustratos alcohólicos, añadiendo al nombre de vinagre el del sustrato correspondiente, como vinagre de sidra, de malta, etc. para indicar la materia prima empleada en cada caso. Originariamente, la materia prima utilizada para obtener los primeros vinagres fue el vino.

La acepción de vinagre que ofrece el diccionario de la Real Academia de la Lengua Española<sup>18</sup> es, “*Líquido agrio y astringente, producido por la fermentación acética del vino, y compuesto principalmente de ácido acético y agua*”

Según la Organización Mundial de la Salud<sup>19</sup>, en una definición mucho más amplia, “*el vinagre es un líquido, apto para el consumo humano, producido exclusivamente con productos idóneos que contienen almidón o azúcares, o almidón y azúcares por el procedimiento de doble fermentación, alcohólica y acética*”. Pueden contener cantidades determinadas de ácido acético, y otros ingredientes opcionales (hierbas, especias, sal), lo que será regulado por la Comisión del Codex Alimentarius, según el tipo de ingrediente,

---

<sup>17</sup> Schumacher, T. (1911). “Definition of vinegar”. *Z. Nahr. Genussm.*, 22, 104.

<sup>18</sup> Real Academia Española (2005). *Diccionario de la lengua española*, 22ª edición. Espasa Calpe, Madrid.

<sup>19</sup> Codex Alimentarius (1987). “Norma del codex para el vinagre (Norma Regional Europea)”. *Codex Stan 162-1987*.

al objeto de obtener un aroma peculiar y característico de cada tipo de vinagre. Esta definición señala que el alcohol que contenga la materia prima debe ser producido por fermentación alcohólica, por lo cual no se permite la práctica de añadir alcohol de origen sintético. Esta peculiaridad también es extensible a la legislación española aplicada a este producto. También indica el contenido total de ácido para los vinagres de vino en  $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  como mínimo. Para otros vinagres el contenido mínimo es  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , siempre y cuando no sea dicha cantidad superior a la obtenida exclusivamente por la fermentación biológica. El contenido mínimo de alcohol residual es de  $0.5 \text{ \% (v/v)}$ , como máximo, excepto en el caso del vinagre de vino, que podrá ser del  $1 \text{ \% (v/v)}$ .

La norma Europea UNE-EN 13188 titulada “Vinagre. Producto derivado de productos líquidos de origen agrícola. Definiciones, requisitos, etiquetado” define al vinagre como: “*Producto generado exclusivamente por el proceso biológico de doble fermentación, alcohólica y acética, a partir de productos líquidos u otras sustancias de origen agrícola*”<sup>20, 21</sup>. Esta norma también indica los contenidos totales de ácido y de alcohol residual:

*“El contenido total de ácido del vinagre no deberá ser inferior a 45 g por cada 1000 mL, calculado en términos de ácido acético libre de agua. El contenido total de ácido del vinagre de vino no deberá ser inferior a 60 g por cada 1000 mL, calculado en términos de ácido acético libre de agua”.*

*“El contenido de alcohol residual no deberá sobrepasar el  $0.5 \text{ \% (v/v)}$  para los vinagres distintos del vinagre de vino, el  $1 \text{ \% (v/v)}$  para el vinagre de vino, y el  $3 \text{ \% (v/v)}$  para vinagres especiales producidos a base de vinagre de vino”.*

---

<sup>20</sup> Norma española UNE-EN 13188 (2000). “Vinagre. Producto derivado de productos líquidos de origen agrícola. Definiciones, requisitos, etiquetado”. Comité Europeo de Normalización (CEN). AENOR.

<sup>21</sup> Norma española UNE-EN 13188/AC (2002). “Erratum Europeo de la Norma española UNE-EN 13188 (2000). Vinagre. Producto derivado de productos líquidos de origen agrícola. Definiciones, requisitos, etiquetado”. Comité Europeo de Normalización (CEN). AENOR.

La Unión Europea<sup>22</sup> define al vinagre de vino como el vinagre “*obtenido exclusivamente por fermentación acética del vino, y con una acidez total, expresada en ácido acético, no inferior a 60 g·L<sup>-1</sup>*”.

La legislación española<sup>23</sup> define al vinagre según la Reglamentación Técnico Sanitaria como:

*“Vinagre es el líquido apto para el consumo humano resultante de la doble fermentación alcohólica y acética de productos de origen agrario.”*

Dicha reglamentación española también indica las características específicas que ha de tener el producto terminado:

*“Los vinagres deberán presentar las siguientes características:*

- a) Un contenido de C<sup>14</sup> correspondiente a su origen biológico.*
- b) Un contenido de metanol que no exceda de 0.5 g·L<sup>-1</sup>.*
- c) Acidez total, expresada en gramos de ácido acético por litro.*

*Vinagre de vino: Mínimo 60 g·L<sup>-1</sup>.*

*Otros vinagres: Mínimo 50 g·L<sup>-1</sup>.*

- d) Alcohol residual.*

*Vinagre de vino: Máximo 1.5 por 100 V/V.*

*Otros vinagres: Máximo 0.5 por 100 V/V.*

*Como excepción, el alcohol residual máximo de los vinagres con denominación de origen protegida (DOP) o indicación geográfica protegida (IGP) será el que se establezca en el correspondiente pliego de condiciones, una vez la DOP o IGP quede inscrita en el Registro Comunitario, o en caso de no estar aún inscrita, tenga protección nacional transitoria.*

- e) Extracto seco.*

---

<sup>22</sup> Reglamento CEE 479/2008, de 29 de abril de 2008; Diario Oficial de la Unión europea del 6 de junio de 2008, núm 148, pág 1-61. “Se establece la organización común del mercado vitivinícola”.

<sup>23</sup> Real Decreto 661/2012, de 13 de abril, Boletín Oficial del Estado del 26 de abril de 2012, núm. 100, pág. 32031-32036. Ministerio de la Presidencia; “Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración y comercialización de los vinagres”.

*Vinagre de vino: Mínimo 1.2 g·L<sup>-1</sup> (grado de ácido acético)<sup>1</sup>.*

f) *Acetoína.*

*Vinagre de vino: Mínimo 30 mg·L<sup>-1</sup>”.*

Se observa cómo la reglamentación española es más estricta que las normativas vigentes en la Unión Europea. Es conveniente señalar que los vinagres de vino que se encuentran amparados en denominaciones de origen o específicas y en otras denominaciones de calidad reconocidas, quedan excluidos de la reglamentación estatal para dicho producto, pues se rigen exclusivamente por una normativa específica, cualquiera que sea su ámbito.

El vinagre es rojo, amarillo o blanco, según el color del vino del que proviene; transparente cuando es puro, de olor picante, agradable y sabor agrio más o menos pronunciado, según la concentración de ácido acético que posea<sup>24</sup>. El vinagre no es ácido acético diluido en agua; además contiene todos los ácidos, las sales orgánicas e inorgánicas que se hallan en el vino (es decir, los ácidos tartáricos, cítrico, málico, etc., y los tartratos y bitartratos), un principio gomoso o mucilaginoso, así como glicerina y alcohol en cantidades muy variables y que, combinándose con los ácidos bajo la influencia de ciertas circunstancias, le comunican este olor y sabor tan suaves del éster acético, olor y sabor que no se encuentran jamás en los vinagres adulterados o en los extraídos de madera, sidra, etc<sup>25</sup>.

Dependiendo del almacenamiento puede producirse una variación en la calidad de un vinagre, debido a las posibles modificaciones físico-químicas que enaltecen las propiedades sensoriales del producto, con la formación de ésteres a partir de diferentes alcoholes, ácidos y acetatos que juegan un papel decisivo<sup>26</sup>.<sup>27, 28, 29</sup> La calidad final de un vinagre está determinada por la materia prima

---

<sup>24</sup> Kehrer, C.L. (1921). “The chemistry of vinegar”. *Journal of Food Product and The American Vinegar Industry* 1, 5-20.

<sup>25</sup> Baeza, A. (1920). “La vid, el vino y los vinagres”. Ediciones ibéricas, Madrid.

<sup>26</sup> Rehm, H.J. y Reed, G. (1983). “Biotechnology, Volumen 5: Food and Feed Production with Microorganisms. Chapter 9: Vinegar”. Ed. Verlag-Chemie, Florida.

<sup>27</sup> García-Parrilla, M.C.; Heredia, F.J. y Troncoso, A.M. (1999). “Sherry wine vinegars: phenolic composition changes during aging”. *Food Research International* 32, 433-440.

<sup>28</sup> Tesfaye, W.; Morales, M.L.; García-Parrilla, M.C. y Troncoso A.M. (2003). “Optimising wine vinegar production: fermentation and ageing”. *Applied Biotechnology Food Science and Policy* 1, 1-6.

<sup>29</sup> Tesfaye, W.; Morales, M.L.; Benítez, B.; García-Parrilla, M.C. y Troncoso A.M. (2004). “Evolution of wine vinegar composition during accelerated aging with oak chips”. *Analytica Chimica Acta* 513, 239-245.

empleada como sustrato, el sistema de acetificación empleado y, si es el caso, el envejecimiento en madera. La composición química y los parámetros físico-químicos finales del vinagre están influenciados por éstos factores<sup>30</sup>.

## II.1.2. Tipos de Vinagres.

Los vinagres se clasifican en función del tipo de sustrato empleado o del método usado en su elaboración. En los países Mediterráneos la principal materia prima empleada es el vino; en otros países donde no se cultiva la vid o su cultivo es minoritario, se utilizan otras materias primas: sidra, malta, cereales, melazas, suero de leche, miel o arroz<sup>31, 32</sup>. El color y el aroma del vinagre obtenido dependen de la materia prima a partir de la cual se haya elaborado.

Según la normativa estatal aplicable<sup>33</sup> se establece que las distintas denominaciones de los vinagres depende de la materia prima empleada para su obtención:

1. *Vinagre de vino: Es el producto obtenido exclusivamente por fermentación acética del vino.*
2. *Vinagre de frutas o vinagre de bayas: Es el producto obtenido a partir de frutas o de bayas de fruta mediante fermentación alcohólica y acética.*
3. *Vinagre de sidra: Es el producto obtenido a partir de sidra, mediante fermentación acética.*
4. *Vinagre de alcohol: Es el producto obtenido por la fermentación acética de alcohol destilado de origen agrícola.*
5. *Vinagre de cereales: Es el producto obtenido, sin destilación intermedia, por el procedimiento de doble fermentación alcohólica y acética, a partir de cualquier cereal en grano, cuyo almidón se haya transformado en*

---

<sup>30</sup> Troncoso, A. (2005). "Evolution of polyphenol and related substances during vinegar aging". In: Book of Abstracts, International Symposium of Vinegars and Acetic Acid Bacteria. Reggio Emilia, Italia.

<sup>31</sup> Llaguno-Marchena, C. y Polo, M.C. (1991). "El Vinagre de Vino". Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.

<sup>32</sup> Pepler Hendry, J. y Beaman Robert, G. (1967). "Microbial technology". In: "Teoman. Chapter 13 vinegar fermentation". 1ª Ed. Illinois: Reinhold Publishing Corporation, 344-359.

<sup>33</sup> Véase referencia nº 23 página 13.

*azúcares mediante la diastasa de la cebada malteada o por cualquier otro proceso.*

6. *Vinagre de malta: Es el producto obtenido, sin destilación intermedia, por el procedimiento de doble fermentación alcohólica y acética, a partir de la cebada malteada, con o sin adición de grano, cuyo almidón se ha desdoblado en azúcares mediante la diastasa de la cebada malteada.*
7. *Vinagre de malta destilado: Es el producto obtenido mediante la destilación del vinagre de malta, a presión reducida, que sólo contiene los componentes volátiles del vinagre de malta del que se deriva.*
8. *Vinagre balsámico: Es el producto obtenido por adición de mosto de uva, mosto de uva concentrado o mosto de uva concentrado rectificado al vinagre de vino, dando lugar a un vinagre dulce, con un contenido mínimo de azúcar total de  $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , procedente exclusivamente de los mostos indicados.*
9. *Vinagre balsámico de sidra: Es el producto obtenido por adición de zumo concentrado de manzana al vinagre de sidra, dando lugar a un vinagre dulce con un contenido mínimo de azúcar total de  $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , procedente exclusivamente del zumo concentrado de manzana.*
10. *Otros vinagres: Vinagres obtenidos a partir de productos de origen agrícola no contemplados en los apartados anteriores, ambos inclusive, por doble fermentación."*

Según el Comité Europeo de Normalización (CEN)<sup>34</sup> se consideran otras posibles denominaciones de vinagre también en función de las diferentes materias primas que se empleen para su fabricación:

1. *"Vinagre (producto derivado de productos líquidos de origen agrícola): Producto generado exclusivamente por el proceso biológico de doble fermentación, alcohólica y acética, a partir de productos líquidos u otras sustancias de origen agrícola.*
2. *Vinagre de vino: Vinagre obtenido exclusivamente a partir de vino, mediante el proceso biológico de fermentación acética.*
3. *Vinagre de frutas o vinagre de vino de frutas, vinagre de bayas o vinagre de vino de bayas, vinagre de sidra*
  - a. *Vinagre de frutas, vinagre de bayas: Vinagres obtenidos a partir de frutas o bayas mediante el proceso biológico de fermentación alcohólica y acética.*

---

<sup>34</sup> Véase referencia nº 20 página 12.

- b. Vinagre de vino de frutas, vinagre de vino de bayas: Vinagres obtenidos a partir de vino de frutas o de vino de bayas mediante el proceso biológico de fermentación acética.*
  - c. Vinagre de sidra: Vinagre obtenido a partir de sidra mediante el proceso biológico de fermentación acética.*
- 4. Vinagre de alcohol: Vinagre obtenido a partir de alcohol destilado, mediante el proceso biológico de fermentación acética.*
- 5. Vinagre de granos: Vinagre obtenido sin destilación intermedia mediante el proceso descrito en el apartado 1, a partir de los granos de cualquier cereal, cuyo almidón se ha convertido en azúcares mediante un proceso distinto de la simple digestión enzimática de la diastasa de la malta de la cebada.*
- 6. Vinagre de malta: Vinagre obtenido sin destilación intermedia a partir de la malta de la cebada, con o sin adición de granos de cereales, cuyo almidón se ha convertido en azúcares solamente por efecto de la diastasa de la malta de cebada, mediante el proceso descrito en el apartado 1.*
- 7. Vinagre de malta destilado: Vinagre obtenido mediante la destilación del vinagre de malta, según se describe en el apartado 6, a presión reducida. Contiene solamente los componentes volátiles del vinagre de malta a partir del cual procede.*
- 8. Vinagre de especias, vinagre condimentado: Vinagres de los apartados 2 a 7 a los que se han añadido hierbas, condimentos y otros ingredientes.*
- 9. Otros tipos de vinagre: Por ejemplo vinagre de centeno, vinagre de cerveza, vinagre de miel.*

*Otros ingredientes que pueden añadirse a los vinagres son los condimentos que proporcionan sabores y las siguientes sustancias:*

- a. Plantas o partes de las plantas, incluyendo especias y fruta, estas deberán utilizarse:*
  - a.1 Bien frescas o en seco, y bien cortadas en rodajas o no;*
  - b.1 En forma de extractos.*
- b Azúcar.*
- c Sal.*
- d Miel.*



*e Zumos de frutas concentrados o no concentrados, de acuerdo con la Directiva de la UE 93/77/CEE<sup>35</sup>".*

### II.1.3. Evolución Histórica.

Desde la antigüedad, el vinagre se ha empleado como un condimento y conservante importante de los alimentos, así como ingrediente para diversos remedios. La historia del vinagre está muy ligada a la historia del vino<sup>36</sup>. Según Duddington (1961) la elaboración del vino data desde hace unos 10.000 años, por lo tanto, se puede suponer la existencia del vinagre desde este tiempo<sup>37</sup>.

El vinagre fue considerado antiguamente un accidente en el proceso de vinificación pero, en realidad, era el resultado de la contaminación del vino en maduración por bacterias acéticas.

Basándonos en datos históricos, las primeras referencias del vinagre emanan desde hace más de cinco mil años. Estas reseñas acerca del empleo del vinagre se encuentran en la cultura babilónica sobre la obtención de un vinagre de dátiles<sup>38</sup>. Existen fuentes históricas que hacen referencia a un vinagre de cerveza (civilización egipcia) y de un vinagre de vino (época romana)<sup>39</sup>. Otras frutas mediterráneas, entre ellas las uvas y los higos, también se empleaban como materias primas para obtener vinagre. Por otra parte, tribus nómadas del norte de Europa y Asia, empleaban manzanas para hacer una bebida agria fermentada. Por lo tanto, el uso del vinagre se ha extendido durante miles de años, desde los fenicios, egipcios, griegos, romanos hasta el resto del mundo occidental.

El ácido acético, ha sido durante muchos años el ácido más fuerte del que se disponía y el componente principal del vinagre. Los alquimistas lo usaban por su capacidad disolvente. Para mejorar su capacidad como ácido, se

---

<sup>35</sup> Directiva del consejo de 21 de diciembre de 1976 relativa a las medidas de protección contra la introducción en los Estados miembros de organismos nocivos para los vegetales o productos vegetales (UE 93/77/CEE). (1976). Diario Oficial de las Comunidades Europeas Nº L 26/20, 03/Vol 11, pag 121-155.

<sup>36</sup> Garrido-Suarez, N. (1957). "Elaboración de Vinagres". Editorial Sintet, Barcelona.

<sup>37</sup> Duddington, C.L. (1961). "Micro-organisms as allies: the industrial use of fungi and bacteria". Ed. Faber and Faber, London, p. 256.

<sup>38</sup> Véase referencia nº 31 página 15.

<sup>39</sup> Bourgeois, J.F. y Barja, F. (2005). "Vinegars: their use in foods, cosmetics, therapeutics and detergents". In: Book of Abstracts, Internacional Symposium of Vinegars and Acetic Acid Bacteria. Reggio Emilia, Italia.

concentró mediante destilación. El alquimista árabe Geber destiló vinagre hacia los años 760-800; el proceso se describió en lo que pudo ser el primer tratado sobre la elaboración de vinagre. En la Edad Media aparecieron los primeros artesanos elaboradores de vinagre. En Francia, durante el reinado de Carlos VI, se agruparon los primeros artesanos convirtiéndose en cofradía. Sus primeros estatutos fueron sancionados y registrados en el Châtelet por sentencia del 28 de octubre de 1394<sup>40</sup>. Tenían unas normas muy severas ya que empleaban fórmulas secretas utilizando sustancias de fuerte sabor, como por ejemplo la pimienta, el jengibre y otras especias o hierbas aromáticas, que proporcionaban al vinagre un sabor característico. En la Edad Media, Orleáns era el gran centro productor de vinos y vinagres; de aquí viene el nombre de uno de los métodos empleados durante mucho tiempo para la producción industrial de vinagre, el llamado Método Orleáns.

Una aplicación muy antigua era la limpieza de llagas y heridas por medio de vinagre diluido. También, recomendados por Galeno, había remedios para el alivio de la tos; éstos se obtenían mediante una mezcla de miel y vinagre. A Hipócrates se atribuye el uso de vinagre en los remedios contra las molestias respiratorias<sup>41, 42</sup>. Entre otras de las aplicaciones conocidas del vinagre, se puede destacar su uso para aliviar picaduras de insectos, torceduras y reducir los problemas provocados por las varices.

Inicialmente se creía que la fermentación acética se producía sobre vino, sidra, cerveza y otros líquidos hidroalcohólicos que se acetificaban o avinagraban espontáneamente en contacto con el aire y a elevada temperatura. Hasta el siglo XVIII no se obtienen las primeras conclusiones sobre este proceso; fue en 1732 cuando el holandés Boerhaave describe a la llamada “madre del vinagre” como el organismo vivo responsable del proceso de acetificación<sup>43</sup>. En 1789, Lavoisier intenta establecer una nomenclatura química en esta clase de fermentación<sup>44</sup> y llega a la conclusión de que “*el alcohol suministra el hidrógeno y una porción de carbono, el ácido carbónico desprendido de la fermentación alcohólica proporciona carbono y oxígeno y, finalmente, el aire atmosférico debe surtir lo que falta de oxígeno para llevar la mezcla al estado de ácido acetoso (vinagre)*”; cabe destacar que no se hace referencia ninguna a las bacterias acéticas.

---

<sup>40</sup> Molnar, E. (1947). “Elaboración de vinagres: estudio completo y detallado de la industria vinagrera”. Klug Marchino & Cía: Pan América, Buenos Aires.

<sup>41</sup> Véase referencia nº 24 página 14.

<sup>42</sup> Conner, H. A. y Allgeier, R. J. (1976). “Vinegar, Its History and Development”. *Advances in Applied Microbiology* 20, 81-133. Academia Press, London.

<sup>43</sup> Boerhaave, H. (1732). “*Elementa Chemicæ*”. *Lugduni Batavorum* 2, 179-207.

<sup>44</sup> Lavoisier, A.L. (1982). “*Tratado Elemental de Química*”. Ed. Alfaguara. Madrid.

Berthollet llegó a la conclusión de que el oxígeno se combina con el hidrógeno para descomponer el vino<sup>45</sup>. Fue en 1821 cuando Davy descubrió que al humedecer una esponja de negro de platino en alcohol se ponía incandescente y continuaba ardiendo mientras había alcohol en el medio.

Döbereiner comprobó que el alcohol absorbe oxígeno, produciendo agua y ácido acético sin desprendimiento de carbónico<sup>46</sup>. Midiendo el volumen de oxígeno que absorbe una cantidad determinada de alcohol llegó a probar “*que los elementos de un átomo de alcohol se combinan con cuatro átomos de oxígeno de manera que se formaban un átomo de ácido acético y tres átomos de agua*”<sup>47</sup>; cabe destacar que, en aquella época, no se conocía la nomenclatura de átomos y moléculas.

Incluso Berzelius (1829)<sup>48</sup> reconoció que la llamada Mycoderma o “madre del vinagre” tiene influencia en la producción de vinagre pero no se identificaba como la causa de la fermentación acética sino como un producto formado en el proceso de putrefacción del vinagre. Persoon (1822)<sup>49</sup> observó cómo se forma una película de grasa sobre la superficie de vino, cerveza o vinagre que tiene naturaleza vegetal, añadiendo nuevas especies de *Mycoderma* en la “Micología europea” de la época. Por otro lado, Chaptal (1924)<sup>50</sup> observó cómo las llamadas “flores del vino” aparecen antes de la fermentación, por lo cual se puede identificar su aparición como un anuncio del comienzo de dicha fermentación.

Un gran avance en el estudio del proceso de formación de vinagre se produjo gracias a Kützing<sup>51</sup>. Realizando observaciones al microscopio de las levaduras y de la “madre del vinagre” observó cómo la fina película que aparece sobre el vino al comenzar el proceso de acetificación está formada por glóbulos seis veces más pequeños que las levaduras; además, clasificó a los glóbulos que forman la “madre del vinagre” como *Acetobacter Kützingianum*, siendo la primera clasificación taxonómica de estos microorganismos.

---

<sup>45</sup> Berthollet, C.L. (1803). "Essai de Statistique Chimique". Vol. 2, tomo 2, Paris, 525.

<sup>46</sup> Döbereiner, J.W. (1823). Annales de Chimie et de Physique, 24, 91-96.

<sup>47</sup> Véase referencia nº 31 página 15.

<sup>48</sup> Berzelius, J.J. (1829). "Traité de Chimie", tomo IV, París, 552.

<sup>49</sup> Persoon, G. H. (1822). "Mycologia Europea", 42(1), 96.

<sup>50</sup> Chaptal, J.A. (1924). "Traité sur les Vins". Annales de Chimie 34(9), 249-251.

<sup>51</sup> Kützing, F.T. (1837). "Mikroskopische Untersuchungen". J.F. Prakt. Chemie 11(7), 385-409.

Liebig (1840)<sup>52</sup> asemeja el proceso de producción de vinagre como un proceso puramente químico, responsabilizando a las sustancias nitrogenadas de la materia prima como responsables de la absorción del oxígeno por el alcohol presente en dicho medio.

Finalmente, Louis Pasteur, en 1867, demostró que sin *Mycoderma*, la cual denominó *aceti*, no hay acetificación. El proceso de acetificación era independiente de la cantidad de sustancias nitrogenadas del medio y las virutas de madera empleadas en el procedimiento alemán de acetificación sólo eran el soporte para el desarrollo del *Mycoderma aceti*<sup>53</sup>.

---

<sup>52</sup> Liebig, J. (1840). “Traité de Chimie Organique”. Tomo I, París, pp. 386-397.

<sup>53</sup> Véase referencia nº 31 página 15.

## II.2. LAS BACTERIAS ACÉTICAS.

### II.2.1. Descripción.

Las bacterias acéticas, Figura II.2.1, son las responsables del proceso de oxidación del etanol a ácido acético durante la fermentación. Las bacterias acéticas son gram negativas y su metabolismo es aerobio estricto, donde el oxígeno es el último aceptor electrónico<sup>54</sup>. Su morfología es variable, se presentan en forma elipsoidal o de bastoncillos<sup>55</sup>. Su tamaño oscila entre 0.5-0.8 µm de diámetro y 0.9-4.2 µm de largo. El pH óptimo para el crecimiento de las bacterias acéticas es 5-6.5<sup>56</sup>, aunque pueden crecer a valores más bajos.

Las bacterias acéticas producen ácido acético mediante la oxidación incompleta del etanol; cabe destacar que una alta concentración de ácido acético o de etanol inhibe el metabolismo de dichas bacterias, aunque no pueden sobrevivir en un medio sin etanol<sup>57</sup>. Son un conjunto heterogéneo, que comprende organismos con flagelación peritrica o polar.

Los organismos con flagelación polar difieren principalmente por su tolerancia al ácido y por su incapacidad de oxidar completamente los alcoholes, estos organismos están incluidos actualmente en el género *Gluconobacter*. Por el contrario, el género *Acetobacter* comprende los organismos con flagelación peritrica, los cuales son capaces de oxidar hasta dióxido de carbono el ácido acético que produce.

---

<sup>54</sup> González, A.; Hierro, N.; Poblet, M.; Rozès, N.; Mas, A. y Guillamón, J. M. (2004). "Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation". *Journal of Applied Microbiology* 96, 853-860.

<sup>55</sup> Suárez Lepe, J.A. e Iñigo Leal, B. (1990). "Vinagre de Vino y Vinagre de Orujo". *Microbiología Enológica*, Ed. Mundi-Prensa, Madrid, pp. 381-399.

<sup>56</sup> Holt, J.M.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Staley, J.Y. y Williams, S.T. (1994). "Genus *Acetobacter* and *Gluconobacter*". In: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 9th Edition, Ed. Williams & Wilkens, Maryland, 71-84.

<sup>57</sup> Emde, F. (2005). "Improvements for an optimized process strategy in vinegar fermentation". In: *Book of Abstracts, International Symposium of Vinegars and Acetic Acid Bacteria*. Reggio Emilia, Italia.

Dentro de la familia de las bacterias acéticas, las especies *Acetobacter* y *Gluconobacter* tienen una especial capacidad para una mayor oxidación del etanol y una enorme acumulación de ácido acético en el exterior de las células<sup>58</sup>.

La sensibilidad<sup>59, 60</sup> de las bacterias acéticas a situaciones con déficit de oxígeno, genera no sólo ralentizaciones del proceso sino también efectos irreversibles sobre su propia viabilidad, haciendo que la oxigenación del medio de cultivo, la concentración de dichas bacterias y la concentración de alcohol y ácido acético, sean aspectos claves en la fermentación.

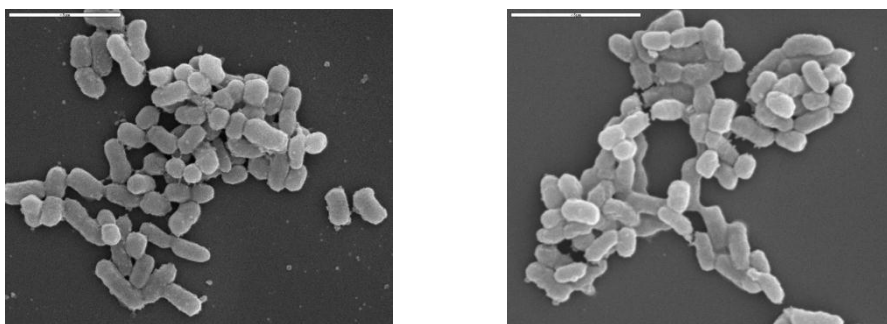


Figura II.2.1. Fotografías realizada mediante microscopía electrónica de barrido de las bacterias acéticas contenidas en el fermentador empleado (trabajo propio).

Concentraciones de etanol en el medio de trabajo superiores a 9 % (v/v) producen una fase lag en la cual la velocidad de oxidación por parte de las bacterias es considerablemente inferior<sup>61</sup>.

Los medios donde aparecen las bacterias acéticas son azucarados y/o alcohólicos, ligeramente ácidos como flores, frutas, cerveza, vino, sidra,

---

<sup>58</sup> Matsushita, K.; Inoue, T.; Adachi, O. y Toyama, H. (2005). "A proton motive force-dependent acetic acid efflux pump in *Acetobacter aceti*". In: Book of Abstracts, Internacional Symposium of Vinegars and Acetic Acid Bacteria. Reggio Emilia, Italia.

<sup>59</sup> Nieto, F.J. (1991). "Algunos aspectos de la tecnología de la fermentación acética". En: El Vinagre de Vino. Llaguno-Marchena, C. y Polo, M.C. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.

<sup>60</sup> Ebner, H.; Follmann, H. y Sellmer, S. (1996). "Vinegar". En "Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry", volumen A27, pp. 403-418.

<sup>61</sup> Adachi, O.; Moonmangmee, D.; Toyama, H.; Yamada, M.; Shinagawa, E. y Matsushita, K. (2003). "New developments in oxidative fermentation". *Appl Microbiol Biotechnol* 60, 643-653.

vinagre, zumos de frutas y miel. Tienen la capacidad de oxidar azúcares y alcoholes para formar ácidos orgánicos. Dado que el ácido acético es el producto más conocido a nivel industrial, es por lo que tradicionalmente se las conoce como “acéticas”. Sin embargo, no sólo son importantes por su capacidad de síntesis de ácido acético, sino también por la capacidad para oxidar glucosa a ácido glucónico, galactosa a ácido galactónico, arabinosa a ácido arabinico, entre otros ejemplos, lo que las hace interesantes para otros fines biotecnológicos<sup>62</sup>.

### II.2.2. Historia.

La clasificación taxonómica tradicional de los microorganismos se ha visto sometida continuamente a reordenaciones y cambios debido a que se basaba fundamentalmente en criterios morfológicos y fisiológicos.

El primer taxonomista de este grupo de bacterias fue el científico francés Louis Pasteur (siglo XVIII); estudiando el método de Orleáns para la producción de vinagre demostró que, tras una primera oxidación en la que el etanol se transformaba a ácido acético, éste podía sufrir una segunda oxidación transformándose en dióxido de carbono y agua. Este resultado llevó a Pasteur a formular la implicación de estos microorganismos en el proceso, confirmando la existencia de *Mycodema aceti* que había sido descrita por Persoon en 1822<sup>63</sup>, ya que el proceso de fermentación no es posible si no está presente el *Mycoderma aceti*.

Más tarde propusieron los nombres de *Termobacterium*, *Bacterium*, *Bacilus*, *Acatobacterium*, etc. Posteriormente, en 1894, Hansen observó que la microbiota que transforma el alcohol en ácido acético, no es pura sino que está formada por varias especies que reaccionaron con el yodo, en concreto, distinguió cuatro especies: *Bacterium aceti*, *Bacterium pasteurianum*, *Bacterium kutzingianum* y *Bacterium xilynum*<sup>64</sup>. Pero no fue hasta 1900 cuando Beijerinck propuso el género *Acetobacter*, utilizado hoy día universalmente para estos microorganismos, tras realizar una clasificación basándose en los

---

<sup>62</sup> Du Toit, W.J. y Pretorius, I.S. (2002). “The occurrence, control and esoteric effect of acetic acid bacteria in winemaking”. *Ann Microbiol* 52(2), 155-179.

<sup>63</sup> Asai, T. (1968). “Acetic acid bacteria. Classification and biochemical activities”. University of Tokio Press. Tokio.

<sup>64</sup> Véase referencia nº 31 página 15.

hábitats donde se encuentran las bacterias y en su capacidad de fijar nitrógeno inorgánico<sup>65</sup>.

El primero en proponer una clasificación basada en criterios bioquímicos y fisiológicos para este género fue Vissert Hooft (1925). Secuencialmente, Asai (1934-1935) realizó la propuesta de una clasificación de las bacterias acéticas en dos géneros: *Acetobacter* y *Gluconobacter* gen. nov. La diferencia entre estos dos géneros se basa fundamentalmente en características fisiológicas, aunque también existen diferencias citológicas, pues *Acetobacter* tiene la capacidad de oxidar el etanol a ácido acético y, posteriormente, puede completar la oxidación del ácido acético a agua y dióxido de carbono y, además, pueden tener flagelos peritricos, mientras que el género *Gluconobacter* no puede realizar la oxidación del ácido acético y pueden presentar flagelos polares<sup>66</sup>.

Fue Frateur (1950) quien formuló una clasificación basada principalmente en criterios bioquímicos: la producción de catalasa, oxidación de acetato y lactato a carbonato, formación de compuestos cetónicos, producción de ácido glucónico y capacidad de crecer en un medio con alcohol y sales de amonio como única fuente nitrogenada (medio Hoyer). Básicamente este criterio de clasificación ha dividido el género *Acetobacter* en cuatro grupos: *Peroxydans*, *Oxydans*, *Mesoxydans* y *Suboxydans*, el nombre de cada grupo indica su mayor o menor capacidad para realizar la oxidación del etanol a ácido acético.

Leifson (1954) agrupó estas bacterias acéticas según si tenían flagelos peritricos y si eran capaces de oxidar etanol en el género *Acetobacter*, y si tenían flagelos polares y eran incapaces de llevar a cabo la completa oxidación en el género *Gluconobacter*.

Las claves taxonómicas de las bacterias han sido históricamente recogidas en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey. En su novena edición<sup>67</sup>, algunas técnicas moleculares han sido incluidas como la composición de ácidos grasos, electroforesis de proteínas solubles, % del contenido de G+C, e hibridación ADN-ADN. Los géneros *Gluconobacter* y *Acetobacter* han sido incluidos en la familia de las *Acetobacteraceae*. El género *Acetobacter* estaba

---

<sup>65</sup> Véase referencia nº 63 página 24.

<sup>66</sup> De Ley, J., Gosselé, F. y Swings, J. (1984). "Genus I *Acetobacter*". In: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". Ed. Williams & Wilkens, Maryland, 267-279.

<sup>67</sup> Véase referencia nº 66 página 25.



compuesto por cuatro especies: *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *A. liquefaciens* y *A. hansenii*. El género *Gluconobacter* sólo consistía en *G. oxydans*.

### II.2.3 Situación actual de la taxonomía de la bacteria acética.

Actualmente la aplicación de las técnicas moleculares al estudio taxonómico ha modificado los criterios de clasificación.

En la familia *Acetobacteraceae*<sup>68</sup> han sido añadidos nuevos géneros de bacterias acéticas a los géneros mencionados anteriormente: *Acetobacter*<sup>69</sup>, *Acidomonas*<sup>70, 71</sup>, *Gluconacetobacter*<sup>72</sup>, *Gluconobacter*<sup>73</sup>, *Asaia*<sup>74</sup>, *Kozakia*<sup>75</sup>, *Saccharibacter*<sup>76</sup>, *Swaminathania*<sup>77</sup>, *Granulibacter*<sup>78</sup>, *Neosaia*<sup>79</sup>, *Frateuria*<sup>80</sup>, *Ameyamaea*<sup>81</sup> y *Tanticharoenia*<sup>82</sup>.

---

<sup>68</sup> Gillis, M y De Ley, J. (1980). "Intra- and intergeneric similarities of the ribosomal ribonucleic acid cistrons of *Acetobacter* and *Gluconobacter*". *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30, 7-27.

<sup>69</sup> Skerman, V.B.D.; McGowan, V. y Sneath, P.H.A. (editors). (1981) "Approved Lists of Bacterial Names". *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30, 225-420.

<sup>70</sup> Urakami, T.; Tamaoka, J.; Suzuki, K. y Komogata, K. (1989). "*Acidimonas* gen. nov., incorporating *Acetobacter* methanolicus as *Acidomonas* methanolica comb. Nov". *International Journal of Systematic Bacteriology* 39, 50-55.

<sup>71</sup> Yamashita, S., Uchimura, T., Komagata, K., (2004). "Emendation of the genus *Acidomonas* Urakami, Tamaoka, Suzuki and Komagata 1989". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 865-870.

<sup>72</sup> Yamada, Y.; Hocino, K. y Ishikawa, T. (1997). "The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconobacter* to the generis level". *Bioscience Biotechnology & Biochemistry* 61, 1244-1251.

<sup>73</sup> Asai, T. (1935). "Taxonomic studies on acetic acid bacteria and allied oxidative bacteria isolated from fruits. A new classification of the oxidative bacteria". *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan* 11, 674-708.

<sup>74</sup> Yamada, Y.; Katsura, K.; Kawasaki, H.; Widyastuti, Y.; Saono, S.; Seki, T.; Uchimura, Y. y Komagata, K. (2000). "*Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the alpha-proteobacteria". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 823-829.

<sup>75</sup> Lisdiyanti, P.; Kawasaki, H.; Widyastuti, Y.; Saono, S.; Seki, T.; Yamada, Y.; Uchimura, T. y Komogata, K. (2002). "*Kozakia baliensis* sp. nov., a novel acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -Proteobacteria". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 813-818.

<sup>76</sup> Jojima, Y.; Mihara, Y.; Suzuki, S.; Yokozeki, K.; Yamanaka, S. y Fudou, R. (2004). "*Saccharibacter floricola* gen. nov., sp. nov., a novel osmophilic acetic acid bacteria

Actualmente, la familia *Acetobacteraceae* consiste en 13 géneros y 58 especies. Véase tabla II.2.1.

Tabla II.2.1. Géneros y especies de bacterias acéticas.

Género	Especie	Aislamiento	Referencia
<i>ACETOBACTER</i>			Beijerinck, 1898 <sup>83</sup>
<i>Acetobacter</i>	<i>aceti</i>	Vinagre	(Pasteur, 1864) <sup>84</sup> Beijerinck 1898 <sup>85</sup>
<i>Acetobacter</i>	<i>cerevisiae</i>	Cerveza	Cleenwerck et al., 2002 <sup>86</sup>

isolated from pollen”. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 2263-2267.

<sup>77</sup> Loganathan, P. y Nair, S. (2004). “*Swaminathania salitolerans* gen. nov., sp. nov., a salt-tolerant, nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacterium from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka)”. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54, 1185-1190.

<sup>78</sup> Greenberg, D.E.; Porcella, S.F.; Stock, F.; Wong, A.; Conville, P.S.; Murray, P.R.; Holland, S.M. y Zelazny, A.M. (2006). “*Granulibacter bethesdensis* gen. nov., sp. nov., a distinctive pathogenic acetic acid bacterium in the family Acetobacteraceae”. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56, 2609-2616.

<sup>79</sup> Yukphan, P.; Malimas, T.; Potacharoen, W.; Tanasupawat, S.; Tanticharoen, M. y Yamada, Y. (2005). “*Neosasaia chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., a novel osmotolerant acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -Proteobacteria”. Journal of General and Applied Microbiology 51, 301-311.

<sup>80</sup> Véase referencia n° 75 página 26.

<sup>81</sup> Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., et al. (2009). “*Ameyamaea chiangmaiensis* gen. nov., an acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -Proteobacteria”. Bioscience Biotechnology Biochemistry, 73, 2156-2162.

<sup>82</sup> Yukphan, P.; Malimas, T.; Muramatsu, Y.; Takahashi, M.; Kaneyasu, M.; Tanasupawat, S.; Nakagawa, Y.; Suzuki, K.I.; Potacharoen, W. y Yamada, Y. (2008). “*Tanticharoenia sakaeratensis* gen. nov., sp. nov., a new osmotolerant acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -Proteobacteria”. Biosci. Biotechnol. Biochem., 72, 672-676.

<sup>83</sup> Beijerinck, M.W., 1898. “Über die Arten der Essigbakterien. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene”. Zweite Abteilung 4, 209–216.

<sup>84</sup> Pasteur, L. (1864) “Mémoire sur la fermentation acétique”. Annales Scientifiques de l'École Normale Supérieure Paris, 1, 113-158.

<sup>85</sup> Véase referencia n° 83 página 27.

<sup>86</sup> Cleenwerck, I., Vandemeulebroecke, K., Janssens, D., Swings, J., (2002). “Reexamination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. and *Acetobacter malorum* sp. Nov”. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52, 1551–1558.

Género	Especie	Aislamiento	Referencia
<i>Acetobacter</i>	<i>cibinongensis</i>	Fruta	Lisdiyanti et al., 2002 <sup>87</sup>
<i>Acetobacter</i>	<i>estunensis</i>	Sidra	Lisdiyanti et al., 2000 <sup>88</sup>
<i>Acetobacter</i>	<i>ghanensis</i>	Haba de cacao	Cleenwerck et al., 2007 <sup>89</sup>
<i>Acetobacter</i>	<i>indonesiensis</i>	Fruta y flor	Lisdiyanti et al., 2000 <sup>90</sup>
<i>Acetobacter</i>	<i>lovaniensis</i>	Suelo	(Frateur, 1950) Lisdiyanti et al., 2000 <sup>91</sup>
<i>Acetobacter</i>	<i>malorum</i>	Manzana	Cleenwerck et al., 2002 <sup>92</sup>
<i>Acetobacter</i>	<i>nitrogenifigens</i>	Té de kombucha	Dutta and Gachhui 2006 <sup>93</sup>
<i>Acetobacter</i>	<i>oeni</i>	Vino	Silva et al., 2006 <sup>94</sup>
<i>Acetobacter</i>	<i>orientalis</i>	Flor de canna	Lisdiyanti et al., 2002 <sup>95</sup>
<i>Acetobacter</i>	<i>orleanensis</i>	Cerveza	(Henneberg, 1906) Lisdiyanti et al., 2000 <sup>96</sup>
<i>Acetobacter</i>	<i>pasteurrianus</i>	Cerveza	(Hansen, 1879) <sup>97</sup> Beijerinck and Folpmers

<sup>87</sup> Véase referencia nº 75 página 26.

<sup>88</sup> Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T., Komagata, K., 2000. Systematic study of the genus *Acetobacter* with descriptions of *Acetobacter indonensis* sp. nov., *Acetobacter tropicalis* sp. nov., *Acetobacter orleanensis* (Henneberg 1906) comb. nov., *Acetobacter lovaniensis* (Frateur 1950) comb. nov., and *Acetobacter estunensis* (Carr 1958) comb. nov. *Journal of General and Applied Microbiology* 46, 147–165.

<sup>89</sup> Cleenwerck, I., Camu, N., Engelbeen, K., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., De Vos, P y De Vuyst, L. (2007). *Acetobacter ghanensis* sp. nov., a novel acetic acid bacterium isolated from traditional heap fermentations of Ghanaian cocoa beans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57(Pt 7), 1647-1652.

<sup>90</sup> Véase referencia nº 88 página 28.

<sup>91</sup> Véase referencia nº 88 página 28.

<sup>92</sup> Véase referencia nº 86 página 27.

<sup>93</sup> Dutta, D., Gachhui, R., (2006). “Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1899–1903.

<sup>94</sup> Silva, L.R., Cleenwerck, I., Rivas, R., Swings, J., Trujillo, M.E., Willems, A., Velázquez, E., 2006. *Acetobacter oeni* sp. nov., isolated from spoiled red wine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 21–24.

<sup>95</sup> Véase referencia nº 75 página 26.

<sup>96</sup> Véase referencia nº 88 página 28.

<sup>97</sup> Hansen, E.C. (1879). “*Mycoderma aceti* (Kütz) Pasteur et *Myc. Pasteurianum*. *Compte Rendu des Travaux du Laboratoire Carlsberg*, 1, 96-100.

Género	Especie	Aislamiento	Referencia
			1916 <sup>98</sup>
<i>Acetobacter</i>	<i>peroxydans</i>	Agua estancada	Visser't Hooft, 1925 <sup>99</sup>
<i>Acetobacter</i>	<i>pomorum</i>	Fermentación de vinagre industrial	Sokollek et al., 1998 <sup>100</sup>
<i>Acetobacter</i>	<i>senegalensis</i>	Fruta de mango	Ndoye et al., 2007 <sup>101</sup>
<i>Acetobacter</i>	<i>syzygii</i>	Jugo de manzana orgánico	Lisdiyanti et al., 2002 <sup>102</sup>
<i>Acetobacter</i>	<i>tropicalis</i>	Coco	Lisdiyanti et al., 2000 <sup>103</sup>
<b>ACIDOMONAS</b>			Urakami et al., 1989 <sup>104</sup> Yamashita et al., 2004 <sup>105</sup>
<i>Acidomonas</i>	<i>methanolica</i>	Fermentación de levadura	(Uhlig et al., 1986) Urakami et al., 1989 <sup>106</sup> Yamashita et al., 2004 <sup>107</sup> Yamada et al., 2000 <sup>108</sup>
<b>ASAIA</b>			Yamada et al., 2000 <sup>109</sup>
<i>Asaia</i>	<i>bogorensis</i>	Flor del árbol de orquídea	Yamada et al., 2000 <sup>110</sup>

<sup>98</sup> Beijerinck, M.W. y Folpmers, T. (1916). Verslagen van de gewone vergadering der wis- en natuurkundige afdeling. *Koninklijke Akademie van Wetenschappente Amsterdam*, 18, 1198-1200

<sup>99</sup> Visser't Hooft, F. (1925). Biochemische Onderzoekingen over het geslacht *Acetobacter*. Dissertation. Technical University, Delft, Meinema, 1-129.

<sup>100</sup> Sokollek, S.J., Hertel, C., Hammes, W.P., 1998b. Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 935-940.

<sup>101</sup> Ndoye, B., Weekers, F., Diawara, B., Guiro, A. T., & Thonart, P. (2007). Survival and preservation after freeze-drying process of thermoresistant acetic acid bacteria isolated from tropical products of Subsaharan Africa. *Journal of Food Engineering*, 79, 1374-1382.

<sup>102</sup> Véase referencia nº 75 página 26.

<sup>103</sup> Véase referencia nº 88 página 28.

<sup>104</sup> Véase referencia nº 70 página 26.

<sup>105</sup> Véase referencia nº 71 página 26.

<sup>106</sup> Véase referencia nº 70 página 26.

<sup>107</sup> Véase referencia nº 71 página 26.

<sup>108</sup> Véase referencia nº 74 página 26.

<sup>109</sup> Véase referencia nº 74 página 26.

<sup>110</sup> Véase referencia nº 74 página 26.

Género	Especie	Aislamiento	Referencia
<i>Asaia</i>	<i>lannensis</i>	Flor del lirio araña	Malimas et al., 2008 <sup>111</sup>
<i>Asaia</i>	<i>krungthepensis</i>	Flor de heliconia	Yukphan et al., 2004 <sup>112</sup>
<i>Asaia</i>	<i>spathodeae</i>	Flor de un árbol de orquídea	Kommanee et al., 2010 <sup>113</sup>
<i>Asaia</i>	<i>siamensis</i>	Flor de calotropis	Katsura et al., 2001 <sup>114</sup>
<b>GLUCONACETOBACTER</b>			Yamada et al., 1997 <sup>115</sup>
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>azotocaptans</i>	Planta de café	Fuentes-Ramírez et al., 2001 <sup>116</sup>
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>diazotrophicus</i>	Azúcar de caña	(Gilis et al., 1989) Yamada et al., 1997 <sup>117</sup>
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>entanii</i>	Fermentación industrial de vinagre ácido	Schüller et al., 2000 <sup>118</sup>
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>europaeus</i>	Fermentación de vinagre ácido	(Sievers et al., 1992) Yamada et al., 1997 <sup>119</sup>
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>hansenii</i>	Vinagre	(Gosselé et al., 1983) Yamada et al., 1997 <sup>120</sup> Lisdiyanti et al., 2006 <sup>121</sup>

<sup>111</sup> Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., et al. (2008). *Asaia lannaensis* sp. nov., a new acetic acid bacterium in the Alphaproteobacteria. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 72, 666-671.

<sup>112</sup> Yukphan, P., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanticharoen, M., Yamada, Y., (2004). *Asaia krungthepensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the  $\alpha$ -Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 313–316.

<sup>113</sup> Kommanee, J., Tanasupawat, S., Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y., et al. (2010). “*Asaia spathodeae* sp. nov., an acetic acid bacterium in the  $\alpha$ - Proteobacteria”. *Journal of General and Applied Microbiology*, 56, 81-87.

<sup>114</sup> Véase referencia n° 113 página 30.

<sup>115</sup> Véase referencia n° 72 página 26.

<sup>116</sup> Fuentes-Ramírez, L.E., Bustillos-Cristales, R., Tapia-Hernandez, A., Jimenez-Salgado, T., Wang, E.T., Martinez-Romero, E., Caballero-Mellado, J., (2001). “Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov., associated with coffee plants”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 1305–1314.

<sup>117</sup> Véase referencia n° 72 página 26.

<sup>118</sup> Schüller, G., Hertel, C., & Hammes, W. P. (2000). *Gluconacetobacter entanii* sp. nov., isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 2013-2020.

<sup>119</sup> Véase referencia n° 72 página 26.

<sup>120</sup> Véase referencia n° 72 página 26.

Género	Especie	Aislamiento	Referencia
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>intermedius</i>	Té de kombucha	(Boesch et al., 1998) Yamada et al., 2000 <sup>122</sup>
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>johannae</i>	Planta de café	Fuentes-Ramírez et al., 2001 <sup>123</sup>
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>kombuchae</i>	Té de kombucha	Dutta and Gachhui, 2006 <sup>124</sup>
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>liquefaciens</i>	Frutos secos	(Asai, 1935) Yamada et al., 1997 <sup>125</sup>
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>nataicola</i>	Nata de coco	Lisdiyanti et al., 2006 <sup>126</sup>
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>oboediens</i>	Fermentación industrial de vinagre de vino tinto	(Sokollek et al. 1998) Yamada et al., 2000 <sup>127</sup>
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>rhaeticus</i>	Zumo de manzana orgánica	Dellaglio et al., 2005 <sup>128</sup>
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>sacchari</i>	Azúcar de caña	Franke et al., 1999 <sup>129</sup>
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>saccharivorans</i>	Zumo de remolacha	Lisdiyanti et al., 2006 <sup>130</sup>
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>swingsii</i>	Zumo de manzana orgánica	Dellaglio et al., 2005 <sup>131</sup>
<i>Gluconacetobacter</i>	<i>xylinus</i>	Bayas del árbol de ceniza de montaña	(Brown, 1886)

<sup>121</sup> Lisdiyanti, P., Navarro, R. R., Uchimura, T., & Komagata, K. (2006). "Reclassification of *Gluconacetobacter hansenii* strains and proposals of *Gluconacetobacter saccharivorans* sp. nov. and *Gluconacetobacter nataicola* sp. Nov". International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56, 2101-2111.

<sup>122</sup> Véase referencia nº 74 página 26.

<sup>123</sup> Véase referencia nº 116 página 30.

<sup>124</sup> Véase referencia nº 93 página 28.

<sup>125</sup> Véase referencia nº 72 página 26.

<sup>126</sup> Véase referencia nº 121 página 31.

<sup>127</sup> Véase referencia nº 74 página 26.

<sup>128</sup> Dellaglio, F., Cleenwerck, I., Felis, G. E., Engelbeen, K., Janssens, D., & Marzotto, M. (2005). Description of *Gluconacetobacter swingsii* sp. nov., and *Gluconacetobacter rhaeticus* sp. nov., isolated from Italian apple fruit. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55, 2365-2370.

<sup>129</sup> Franke, I.H., Fegan, M., Hayward, C., Leonard, G., Stackebrandt, E., Sly, L.I., (1999). "Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp. nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugar cane and from the pink sugar-cane mealy bug". International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 49, 1681-1693.

<sup>130</sup> Véase referencia nº 121 página 31.

<sup>131</sup> Véase referencia nº 128 página 31.

Género	Especie	Aislamiento	Referencia
			Yamada et al., 2000 <sup>132</sup>
<b>GLUCONOBACTER</b>			Asai, 1935 <sup>133</sup>
<i>Gluconobacter</i>	<i>albidus</i>	Flor de dalia	(ex Kondo and Ameyama, 1958) Yukphan et al., 2005 <sup>134</sup>
<i>Gluconobacter</i>	<i>cerinus</i>	Cereza	(ex Asai, 1935) Yamada and Akita 1984 <sup>135</sup> Katsura et al., 2001 <sup>136</sup>
<i>Gluconobacter</i>	<i>frateurri</i>	Fresa	Mason and Claus, 1989 <sup>137</sup> (Henneberg, 1897)
<i>Gluconobacter</i>	<i>japonicus</i>	Frutos de Myrica rubra	Malimas et al., 2009 <sup>138</sup>
<i>Gluconobacter</i>	<i>kondonii</i>	Fresa	Malimas et al., 2007 <sup>139</sup>
<i>Gluconobacter</i>	<i>oxydans</i>	Cerveza	(Henneberg, 1897) De Ley 1961 <sup>140</sup> Gosselé et al., 1983 <sup>141</sup>

<sup>132</sup> Véase referencia n° 74 página 26.

<sup>133</sup> Véase referencia n° 73 página 26.

<sup>134</sup> Véase referencia n° 79 página 27.

<sup>135</sup> Yamada, Y., y Akita, M. (1984). An electrophoretic comparison of enzymes in strains of *Gluconobacter* species. *Journal of General and Applied Microbiology*, 30, 115-126.

<sup>136</sup> Véase referencia n° 113 página 30.

<sup>137</sup> Mason, L. M., y Claus, W. (1989). "Phenotypic characteristics correlated with deoxyribonucleic acid sequence similarities for three species of *Gluconobacter*: *G. oxydans* (Henneberg 1897) De Ley 1961, *G. frateurri* sp. nov., and *G. asaii* sp. nov.". *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34, 174-184.

<sup>138</sup> Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Muramatsu, Y., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., et al. (2009). *Gluconobacter japonicus* sp. nov., an acetic acid bacterium in the Alphaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 466-471.

<sup>139</sup> Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., et al. (2007). "*Gluconobacter kondonii* sp. nov., an acetic acid bacterium in the  $\alpha$ - Proteobacteria". *Journal of General and Applied Microbiology*, 53, 301-307.

<sup>140</sup> De Ley, J., (1961). "Comparative carbohydrate metabolism and a proposal for a phylogenetic relationship of the acetic acid bacteria". *Journal of General Microbiology* 24, 31-50.

<sup>141</sup> Gosselé, F., Swings, J., Kersters, K., De Ley, J., (1983). "Numerical analysis of phenotypic features and protein gel electrophoregram of *Gluconobacter* Asai 1935

Género	Especie	Aislamiento	Referencia
			Mason and Claus, 1989 <sup>142</sup>
<i>Gluconobacter</i>	<i>roseus</i>	Caqui	Malimas et al., 2008a <sup>143</sup>
<i>Gluconobacter</i>	<i>sphaericus</i>	Uvas frescas	Malimas et al., 2008b <sup>144</sup>
<i>Gluconobacter</i>	<i>thailandicus</i>	Flores	Tanasupawat et al., 2004 <sup>145</sup>
<i>Gluconobacter</i>	<i>wancherniae</i>	Semillas	Yukphan et al., 2010 <sup>146</sup>
<b>GRANULIBACTER</b>			Greenberg et al., 2006 <sup>147</sup>
<i>Granulibacter</i>	<i>bethesdensis</i>	Cultivo de un nodo linfático de un paciente con la enfermedad granulomatosa crónica	Greenberg et al., 2006 <sup>148</sup>
<b>KOZAKIA</b>			Lisdiyanti et al., 2002 <sup>149</sup>
<i>Kozakia</i>	<i>baliensis</i>	Azúcar moreno de caña	Lisdiyanti et al., 2002 <sup>150</sup>
<b>FRATEURIA</b>			Swings et al., 1980 <sup>151</sup>

emend. mut. char. Asai, Iizuka and Komagata 1964". International Journal of Systematic Bacteriology 33, 65–81.

<sup>142</sup> Véase referencia nº 137 página 32.

<sup>143</sup> Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Muramatsu, Y., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., et al. (2008). *Gluconobacter roseus* (ex Asai 1935) sp. nov., nom. rev., a pink-colored acetic acid bacterium in the Alphaproteobacteria. Journal of General and Applied Microbiology, 54, 119-125.

<sup>144</sup> Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Muramatsu, Y., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., et al. (2008). *Gluconobacter sphaericus* (Ameyama 1975) comb. nov., a brown pigmentproducing acetic acid bacterium in the Alphaproteobacteria. Journal of General and Applied Microbiology, 54, 211-220.

<sup>145</sup> Tanasupawat, S., Thawai, C., Yukphan, P., Moonmangmee, D., Itoh, T, Adachi, O y Yamada, Y. (2004) *Gluconobacter thailandicus* sp. nov., an acetic acid bacterium in the alpha-Proteobacteria. J Gen Appl Microbiol, 50(3), 159-167.

<sup>146</sup> Yukphan, P., Malimas, T., Lundaa, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M. et al. (2010). *Gluconobacter wancherniae* sp. nov., an acetic acid bacterium from Thai isolates in the  $\alpha$ -Proteobacteria. Journal of General and Applied Microbiology. 56,67-73.

<sup>147</sup> Véase referencia nº 78 página 27.

<sup>148</sup> Véase referencia nº 78 página 27.

<sup>149</sup> Véase referencia nº 75 página 26.

<sup>150</sup> Véase referencia nº 75 página 26.

<sup>151</sup> Swings, J., Gillis, M., Kersters, K., De Vos, P., Gosselé, F. y De Ley, J. (1981). *Frateuria*, a new genus for "*Acetobacteraurantius*". Int. J. Syst. Bacteriol., 30, 547-556.



Género	Especie	Aislamiento	Referencia
<i>Frateuria</i>	<i>aurantia</i>	Flor de fruta	(ex Kondo and Ameyana, 1958) Swings et al., 1980 <sup>152</sup>
<b>NEOSAIA</b>			Yukphan et al., 2005 <sup>153</sup>
<i>Neosaia</i>	<i>chiangmaiensis</i>	Flor de jengibre rojo	Yukphan et al., 2005 <sup>154</sup>
<b>SACCHARIBACTER</b>			Jojima et al., 2004 <sup>155</sup>
<i>Saccharibacter</i>	<i>floricola</i>	Flores	Jojima et al., 2004 <sup>156</sup>
<b>SWAMINATHANIA</b>			Loganathan and Nair, 2004 <sup>157</sup>
<i>Swaminathania</i>	<i>salitolerans</i>	Arroz salvaje en los manglares	Loganathan and Nair, 2004 <sup>158</sup>
<b>AMEYAMAEA</b>			Yukphan et al., 2009 <sup>159</sup>
<i>Ameyamaea</i>	<i>chiangmaeiensis</i>	Flor de ginger rojo	Yukphan et al., 2009 <sup>160</sup>
<b>TANTICHAEROENIA</b>			Yukphan et al., 2008 <sup>161</sup>
<i>Tanticharoenia</i>	<i>sakaeratensis</i>	Suelo	Yukphan et al., 2008 <sup>162</sup>

Desde el punto de vista de la producción industrial es de gran importancia conocer las cepas implicadas en la transformación de etanol en ácido acético. En general, la producción de vinagres se asocia con las especies: *A. aceti*, *A. pasteurianus*, *Ga. Europaeus* Gax. Mientras que la especie *G. oxydans* se asocia a la producción de “condimentos alimentarios” que parten directamente de mosto para la producción de acético, como sería el “Aceto Balsamico Tradizionale”<sup>163</sup>.

<sup>152</sup> Véase referencia nº 151 página 33.

<sup>153</sup> Véase referencia nº 79 página 27.

<sup>154</sup> Véase referencia nº 79 página 27.

<sup>155</sup> Véase referencia nº 76 página 26.

<sup>156</sup> Véase referencia nº 76 página 26.

<sup>157</sup> Véase referencia nº 77 página 27.

<sup>158</sup> Véase referencia nº 77 página 27.

<sup>159</sup> Véase referencia nº 81 página 27.

<sup>160</sup> Véase referencia nº 81 página 27.

<sup>161</sup> Véase referencia nº 82 página 27.

<sup>162</sup> Véase referencia nº 82 página 27.

<sup>163</sup> Guillamón, J.M.; González, A.; Hierro, N; Rozes, A; Mas, A y Poblet, M. (2003). “Técnicas de identificación de bacterias acéticas”. Unitat d’Enologia del centre de Referència de tecnologia d’Aliments. Dept. Bioq. y Biotc. Facultat d’Enologia de Tarragona. Universitat Rovira i Virgili.

## II.2.4. Metabolismo de las bacterias acéticas

Los aspectos bioquímicos de las bacterias acéticas no han sido tan extensamente estudiados como los de otras bacterias, levaduras, *Escherichia coli*..., aun así, existen muchos trabajos realizados sobre su metabolismo.

El metabolismo de las bacterias acéticas es respiratorio, es importante destacar que son aerobias estrictas, siendo el oxígeno molecular uno de sus nutrientes esenciales.

### II.2.4.1. Metabolismo del etanol.

La reacción de acetificación es una reacción biológica oxidativa que se puede representar por:



Los requisitos nutritivos básicos para los procesos microbiológicos son el carbono, el nitrógeno, las sustancias minerales y la energía. Normalmente, se emplea un compuesto orgánico como fuente de energía y de carbono en los microorganismos “heterótrofos”, como es el caso. Las bacterias acéticas tienen un metabolismo respiratorio, donde el oxígeno es el aceptor final de electrones, son aerobias estrictas.

Una característica importante de las bacterias acéticas es la capacidad de oxidar una gran variedad de sustratos; esta capacidad de oxidación es debida a la gran actividad de las deshidrogenasas que se encuentran en la membrana celular, estas deshidrogenasas se encuentran interconectadas con la cadena citocrómica<sup>164</sup>.

La oxidación del etanol a ácido acético por las bacterias acéticas es el proceso mejor conocido de estos microorganismos. Se realiza en dos etapas: en la primera el etanol es oxidado a acetaldehído y, en la segunda, el acetaldehído

---

<sup>164</sup> Matsushita, K.; Honobe, M.; Shinagawa, E.; Adachi, G. y Ameyama, M. (1985). “Isolation and characterization of outer and cytoplasmic membranes from spheroplasts of *Acetobacter*”. *Antonie van Leeuwenhoek* 20, 102.

es oxidado a acetato; en ambas etapas se transfieren electrones que terminan aceptados por el oxígeno<sup>165, 166, 167</sup>.

La alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa son las dos enzimas implicadas en el proceso de oxidación; ambas se encuentran en la membrana citoplasmática, teniendo su zona activa en el exterior de dicha membrana<sup>168, 169, 170</sup>.

La enzima alcohol deshidrogenasa está formada por dos o tres subunidades (dependiendo de la especie): la deshidrogenasa (72-78 kDa), el citocromo c (48 kDa) y la tercera subunidad es una proteína de 20 kDa que solo se ha encontrado en las especies *Acetobacter aceti* y *Acetobacter pasteurianus*. Las dos subunidades de mayor tamaño son esenciales para la actividad de las enzimas y participan en el transporte intramolecular de electrones de la alcohol deshidrogenasa a la ubiquinona, mientras que la subunidad más pequeña facilita la asociación a la membrana de la citocromo oxidasa<sup>171, 172</sup>. La bacteria del género *Acetobacter* produce más ácido acético debido a que la actividad de la alcohol deshidrogenasa de *Acetobacter* es más estable en condiciones acéticas que la enzima del género *Gluconobacter*<sup>173</sup>.

El segundo tipo de enzima implicada en el proceso de oxidación del etanol es la aldehído deshidrogenasa. Esta enzima se encuentra localizada en la membrana citoplasmática, su pH óptimo se encuentra entre 4 y 5 aunque

---

<sup>165</sup> Nickol, G.B. (1979). "Vinegar". In: Peppler, H. J. y Perlman, D. "Microbiology technology". 2º Ed., Academia Press, New York. pp. 155-172.

<sup>166</sup> Canning, A. (1985). "Vinegar Brewing". Journal of Food Sci Sept/Oct, 20-21.

<sup>167</sup> Véase referencia nº 61 página 23.

<sup>168</sup> Adachi, O.; Miyagawa, E.; Shinagawa, E.; Matsushita, K. y Ameyama, M. (1978). "Purification and properties of particulate alcohol dehydrogenase from *Acetobacter aceti*". Agric Biol Chem 42, 2331-2340.

<sup>169</sup> Véase referencia nº 61 página 23.

<sup>170</sup> Saeki, A.; Theeragool, G.; Matsushita, K.; Toyama, H.; Lotong, N. y Adachi, O. (1997). "Development of thermotolerant acetic acid bacteria useful for vinegar fermentation at higher temperatures". Biosci Biotech Biochem 61, 138-145.

<sup>171</sup> Kondo, K. y Horinouchi, S. (1997). "Characterization of the genes encoding the Three-Component Membrane-Bound Alcohol Dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans* and their expression in *Acetobacter pasteurianus*". Appl Environ Microbiol 63, 1131-1138.

<sup>172</sup> Véase referencia nº 170 página 36.

<sup>173</sup> Matsushita, K.; Toyama, H. y Adachi, O. (1994). "Respiration chains and bioenergetics of acetic acid bacteria". Adv Microbiol Physiol 36, 247-301.

también realiza su función catalítica a valores más bajos de pH<sup>174</sup>. Esta enzima es sensible a bajas concentraciones de oxígeno y a la presencia de etanol<sup>175</sup>.

Las bacterias acéticas producen altas concentraciones de ácido acético, superiores a 15 % (m/v)<sup>176, 177</sup>, siendo la resistencia a dicho ácido dependiente de la cepa<sup>178</sup>. Un requisito para esta alta tolerancia se basa en una adaptación a altas concentraciones de acetato<sup>179</sup>.

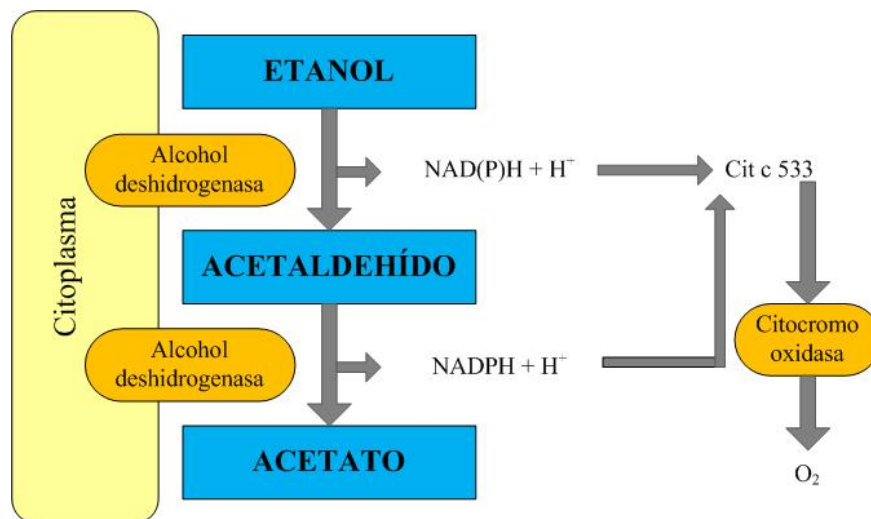


Figura II.2.2. Esquema del proceso de oxidación del etanol a ácido acético.

<sup>174</sup> Adachi, O.; Tayama, K.; Shinagawa, E.; Matsushita, K. y Ameyama, M. (1980). "Purification and characterization of membrane-bound aldehyde dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydand*". *Agric Biol Chem* 44, 503-515.

<sup>175</sup> Muraoka, H.; Watabe, Y.; Ogasawara, N. y Takahashi, H. (1983). "Trigger damage by oxygen deficiency to the acid production system during submerged acetic acid fermentation with *Acetobacter aceti*". *J Ferment Technol* 61, 89-93.

<sup>176</sup> Sievers, M.; Lorenzo, A.; Gianotti, S.; Boesch, C. y Teuber, M. (1996). "16-23S ribosomal RNA spacer regions of *Acetobacter europaeus* and *A. xylinum*, tRNA genes and antitermination sequences". *FEMS Microbiol Lett* 142, 43-48.

<sup>177</sup> Lu, S.F.; Lee, F.L. y Chen, H.K. (1999). "A thermotolerant and high acetic acid-producing bacterium *Acetobacter* sp". *J Appl Microbiol* 86, 55-62.

<sup>178</sup> Nanba, A.; Tamura, A. y Nagai, S. (1984). "Synergistic effects on acetic acid and ethanol on the growth of *Acetobacter* sp". *J Ferment Technol* 62, 501-505.

<sup>179</sup> Lasko, D.R.; Zamboni, N. y Saber, U. (2000). "Bacterial response to acetate challenge: a comparison of tolerance among species". *Appl Microbiol Biotechnol* 54, 243-247.

#### II.2.4.2. Metabolismo de los hidratos de carbono.

Las bacterias acéticas pueden utilizar diferentes carbohidratos como fuente de carbono, siendo la glucosa la más utilizada. A diferencia de lo que sucede en levaduras, las bacterias acéticas no pueden metabolizar la glucosa por la vía de la glucólisis o Embden-Meyerhof Parnas debido a la falta de la enzima fosfofructoquinasa. Por lo tanto, las bacterias acéticas deben utilizar otras rutas alternativas para utilizar los hidratos de carbono como fuente de carbono y energía, tales como:

- Sistema de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa: un mol de glucosa 6-fosfato es transformado en un mol de ribulosa-5-fosfato con formación de dos moles de NADPH. La producción de energía es debida a la reoxidación de estos moles de NADPH a través de la cadena respiratoria y a la producción de ATP por la fosforilación oxidativa.
- Vía Enter-Doudoroff: se trata de una extensión del sistema anterior, en la que a partir de glucosa-6-fosfato se produce gluconato-6-fosfato, el cual se hidroliza mediante una aldolasa a piruvato y gliceraldehído-3-fosfato. A partir de ambas moléculas se acaba formando acetato por descarboxilación. Esta reacción es característica de algunas cepas de *Gluconobacter oxydans*.
- La vía Warburg-Dickens o ciclo de las hexosas monofosfato: Esta ruta es la más común para metabolizar glucosa, estando presente en todas las especies de BA. A partir de ribulosa-5-fosfato, formada por el sistema de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, se producen monosacáridos de distinto tamaño que dan finalmente lugar a triosas-fosfato, las cuales sí que pueden ser metabolizadas por la vía Embden-Meyerhoff Parnas. La ruta por la cual las bacterias acéticas oxidan la glucosa depende del pH y de la concentración de glucosa<sup>180</sup>. Los productos finales de todas las rutas descritas pueden ser oxidados completamente hasta CO<sub>2</sub> y agua a través el ciclo de Krebs, excepto en las especies del género *Gluconobacter*, que presentan un ciclo de Krebs no funcional, por lo tanto, son incapaces de oxidar completamente estas moléculas. En cambio, las especies *Acetobacter* y *Gluconacetobacter*, pueden llevar a cabo la oxidación completa, aunque la presencia de glucosa/fructosa o etanol reprimen el funcionamiento de esta ruta metabólica y por tanto, ésta sólo se dará cuando se hayan consumido completamente las fuentes

---

<sup>180</sup> Qazi, G.N., Parshad, R., Verma, V. y Chopra, C.L. (1991). Diketogluconate fermentation by *Gluconobacter oxydans*. *Enzyme Microb Technol* 13, 504–507

de carbono presentes en el medio<sup>181</sup>. Aunque como se acaba de comentar la glucosa puede ser oxidada completamente, también puede ser parcialmente oxidada a ácido glucónico<sup>182</sup>. Esta reacción es especialmente activa en *G. oxydans*, siendo característica de sustratos ricos en azúcares como la uva o los mostos. En estos casos, la acumulación de ácido glucónico es un marcador típico del crecimiento de las bacterias acéticas. De todas maneras, la glucosa no es el único carbohidrato que metabolizan las bacterias acéticas, pudiendo utilizar otros como la fructosa, galactosa, arabinosa, manitol, manosa, ribosa, sorbitol o xilosa<sup>183</sup>.

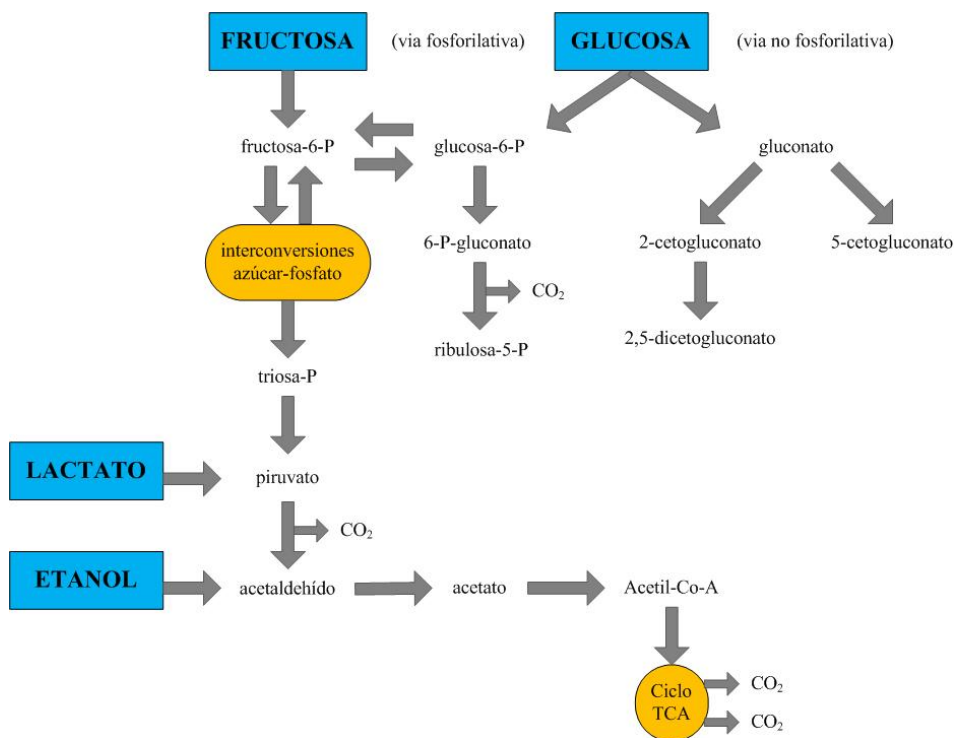


Figura II.2.3. Rutas principales del metabolismo oxidativo en las bacterias acéticas<sup>184</sup>.

<sup>181</sup> Véase referencia nº 170 página 36.

<sup>182</sup> Cañete-Rodríguez, A.M., Santos-Dueñas, I.M., Mauricio, J.C., Martínez-Pedrajas, C. y García-García, I. (2012). “Submerged cultures of *Gluconobacter* genus in strawberry pulp for making a gluconic acid based product. An ingredient for new healthy beverages”. *Acetic Acid Bacteria*, 1(s1), 31.

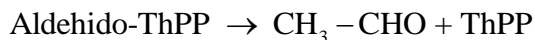
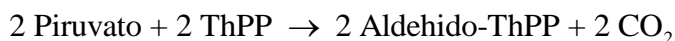
<sup>183</sup> Véase referencia nº 66 página 25.

<sup>184</sup> Véase referencia nº 31 página 15.

### II.2.4.3. Formación de acetoína.

El primero en revelar la formación de acetoína por parte de las bacterias acéticas fue Kitasato en 1929, usando piruvato como sustrato.

El pirofosfato de tiamina (ThPP) favorece la producción de CO<sub>2</sub> y la síntesis de acetoína a partir de piruvato. Cuando adicionamos acetaldehído al piruvato en condiciones anaerobias, se incrementa la formación de acetoína pero no la producción de CO<sub>2</sub>, lo que apoya la teoría de que la acetoína se forma por reacción entre el acetaldehído y el aldehído ThPP.



La producción de acetoína en presencia de etanol se incrementa por la adición de piruvato y lactato. Es mayor la formación de acetoína cuando se añade al medio glicerina, succinato, malato, fumarato o oxalacetato en presencia de etanol que cuando el etanol no está presente. Al parecer estas fuentes carbonadas podrían ser metabolizadas a piruvato y éste a su vez reaccionaría con acetaldehído formado a partir del etanol, para dar acetoína. La adición de acetato, acetaldehído, gluconato, citrato y  $\alpha$ -cetoglutarato, no incrementan la producción de acetoína<sup>185</sup>.

## II.3. MÉTODOS DE ELABORACIÓN DE VINAGRE.

El método más antiguo empleado para la producción de vinagre, a pequeña escala, es muy simple: exponer a la acción del aire el vino o sustrato alcohólico empleado, hasta que se transforme completamente en vinagre<sup>186</sup>.

La fabricación de vinagre se puede llevar a cabo por diferentes métodos, pero dependiendo del modo de cultivo de las bacterias, se clasifican normalmente en dos grupos:

---

<sup>185</sup> Véase referencia n° 31 página 15.

<sup>186</sup> Véase referencia n° 25 página 14.

- a) Empleando un cultivo superficial. Las bacterias se encuentran en contacto directo con el oxígeno gaseoso del aire o fijadas sobre soportes sólidos, normalmente de virutas.
- b) Empleando un cultivo sumergido de dichas bacterias acéticas en el seno del líquido a fermentar. Este procedimiento requiere el aporte continuo de oxígeno mediante la aireación del medio.

Adicionalmente, también se puede hacer referencia a la posibilidad de llevar a cabo un cultivo sumergido con células inmovilizadas. Este último caso pretende retener las células que se pierden en la descarga del fermentador acompañando al producto obtenido. Sin embargo, las elevadas velocidades de acetificación que pueden llegar a conseguirse no compensan, a nivel industrial, las dificultades encontradas para la transferencia de oxígeno y la baja acidez final obtenida<sup>187, 188, 189, 190, 191</sup>.

En los países mediterráneos se suelen usar biorreactores con cultivo sumergido para elaborar el vinagre de vino, el vinagre obtenido puede sufrir un proceso de envejecimiento en madera o no, similar al proceso de envejecimiento del vino. Uno de los objetivos actuales de la industria vinagrera es intentar conseguir una productividad lo más alta posible<sup>192</sup>.

Las cualidades del vinagre dependen de las condiciones del proceso de obtención, incluida la velocidad de acetificación. Se encuentran importantes

---

<sup>187</sup> Kennedy, J.F.; Humphreys, J.D. y Barker, S.A. (1980). "Application of living immobilized cells to the acceleration of the continuous conversion of ethanol to acetic acid hydrous titanium (IV) oxide-immobilized *Acetobacter* species". *Enzym Microb Technol* 2, 209.

<sup>188</sup> Ghommidh, C y Navarro, J. M. (1982). "A study of acetic acid production by immobilized *Acetobacter* cells: product inhibition effects". *Biotechnol Bioeng* 24, 1991-1999.

<sup>189</sup> Ghommidh, C.; Navarro, J.M. y Durand, G. (1982). "A study of acetic acid production by immobilized *Acetobacter* cells: oxygen transfer". *Biotechnol Lett* 24, 650-657.

<sup>190</sup> Nanba, A.; Tamura, A. y Nagai, S. (1985). "Vinegar production by *Acetobacter rancens* cells fixed on a hollow fiber module". *J Ferment Technol* 63, 175-179.

<sup>191</sup> Okumara, A. (1985). "Vinegar production with *Acetobacter* grown on a fibrous support". *J Ferment Technol* 63, 57-60.

<sup>192</sup> Garcia, I.; Baena, S.; Jiménez, C.; Cantero, D. y Bonilla, J.L. (2005). "Optimisation of the wine vinegar process. Influence of ethanol concentration at the moment of discharge". In: *Book of Abstracts, Internacional Symposium of Vinegars and Acetic Acid Bacteria*. Reggio Emilia, Italia.



diferencias sensoriales entre los vinagres fabricados con un cultivo sumergido y con un cultivo superficial<sup>193</sup>.

### **II.3.1. Métodos artesanales de acetificación.**

Antiguamente, la producción de vinagre se llevaba a cabo, normalmente, mediante un proceso lento en el que el contacto con el aire de un medio alcohólico iba acetificando a éste. El sustrato alcohólico podía ser muy variado: vino, malta fermentada, miel de dátiles, melazas de azucarería, alcohol de patatas, de cereales, suero de leche fermentada, etc<sup>194</sup>. El proceso era completamente natural, la única etapa a realizar era añadir al sustrato alcohólico vinagre turbio o la llamada “madre del vinagre” y, posteriormente, retirar una parte del vinagre obtenido antes de añadir nuevo sustrato. El vinagre obtenido tenía aproximadamente 4-5 % (m/v) de acidez y una elevada concentración de etanol sin transformar.

### **II.3.2. Métodos industriales de acetificación con cultivo superficial.**

La descripción más antigua de la fabricación de vinagre data de 1616<sup>195</sup>. Se describe la acetificación de mosto de cerveza y vino en barriles de madera semi-llenos dejados al aire libre para favorecer el proceso de acetificación; se empleaban diferentes barriles y el proceso se realizaba transfiriendo una pequeña cantidad de vinagre de un barril a otro. Este proceso se mantuvo cientos de años y fue llamado por los británicos como “fielding process”.

Los principales métodos de acetificación utilizados a lo largo del tiempo son los descritos a continuación.

---

<sup>193</sup> Nieto, J.; González-Vinas, M.A.; Barba, P.; Martín-Álvarez, P.J.; Aldave, L.; García-Romero, E. y Cabezudo, M.D. (1993). “Recent process in wine vinegar R&D and some indicators for the future: Influence of process conditions in the concentrations of volatiles in the vinegar obtained, Food, Flavors, Ingredients and Composition”. Elsevier Applied Science Publishers, 1º Ed., New-York, 479-497.

<sup>194</sup> Véase referencia nº 31 página 15.

<sup>195</sup> Véase referencia nº 42 página 19.

### II.3.2.1. Método de Orleáns.

En el siglo XVII la principal industria vinagrera se hallaba en Orleáns. Allí se desarrolló uno de los métodos más antiguos para la fabricación de vinagre<sup>196</sup>.

El método está basado en un cultivo superficial y estacionario de las bacterias acéticas, aunque en esta época no se identificaban como auténticas responsables del proceso. Las condiciones operativas consistían en mantener en contacto con el aire una fina capa grasienta que se mantenía en la superficie del vino, evitando que no se cayera al fondo del barril, para lo cual había que renovar parcialmente el contenido del barril<sup>197</sup>.

El método emplea toneles de, aproximadamente, 200 L de capacidad dispuestos en posición horizontal formando filas superpuestas. Dichos toneles tienen dos agujeros de unos 5 cm (2 pulgadas) en cada uno de los fondos del barril en la mitad superior; estos agujeros tienen la misión de dejar pasar el aire y se encuentran rellenos con estopa para evitar la entrada de las “moscas del vinagre”.

---

<sup>196</sup> Mitchell, C.A. (1916). “Vinegar: Its manufacture and examination”. Ed: Charles Griffin and Company, London.

<sup>197</sup> Véase referencia nº 32 página 15.

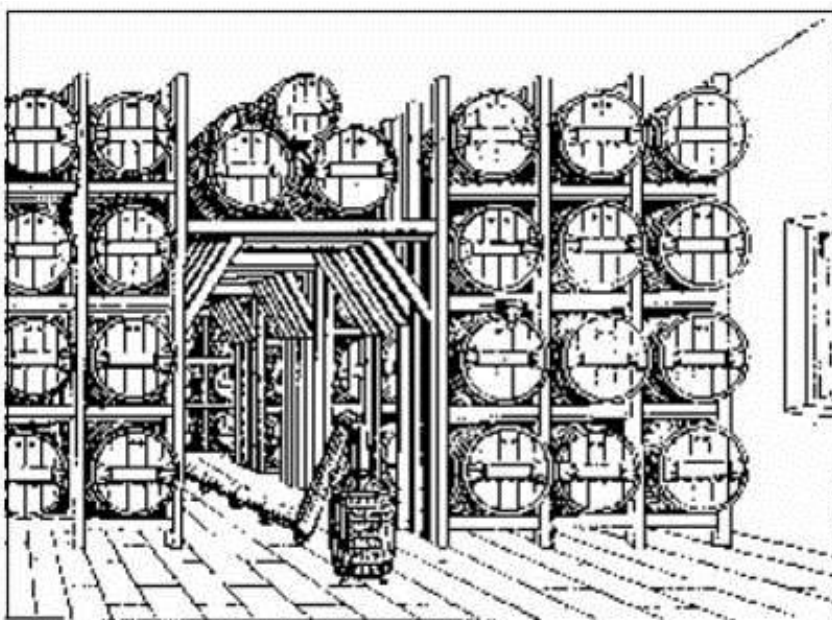


Figura II.3.1. Pilas de botas para la acetificación en una fábrica de vinagre por el método de Orleáns<sup>198</sup>.

En cada uno de los toneles, cabe destacar la presencia de un tubo de vidrio desde la parte superior del tonel hasta casi el fondo del líquido para no alterar la capa superficial en las diferentes etapas de la renovación parcial del contenido del tonel.

---

<sup>198</sup> Véase referencia nº 36 página 18.

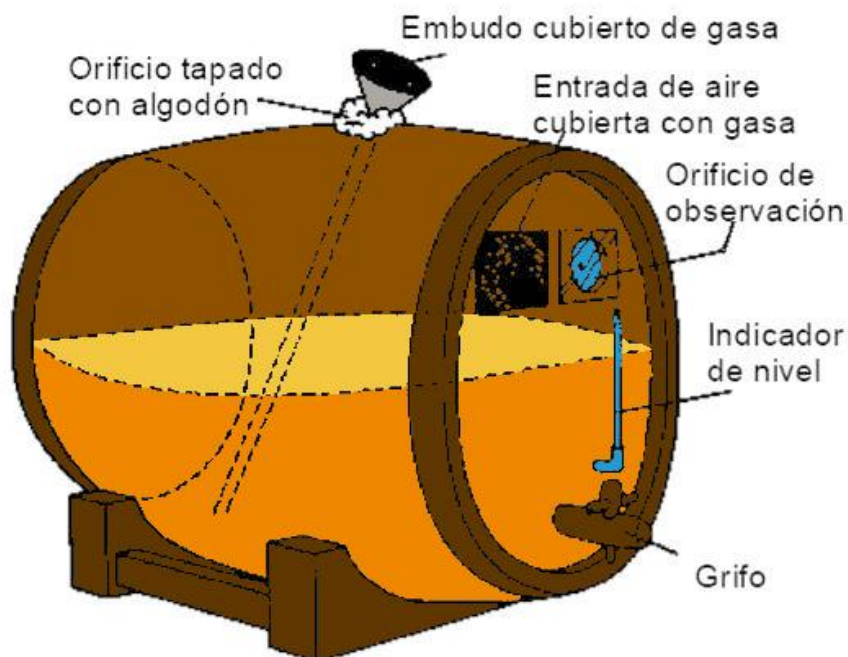


Figura II.3.2. Acetificación por el método de Orleáns<sup>199</sup>.

El sustrato empleado es una mezcla de vino de baja graduación alcohólica y un 20 % de vinagre turbio. En este proceso se obtiene un bajo rendimiento de transformación del etanol a ácido acético. Una vez que comienza la acetificación dentro del tonel, el proceso de transformación dura entre 8 y 10 días.

Es importante que la temperatura de los locales donde se encuentran los toneles se mantenga a 20-25 °C; normalmente se utilizaban bodegas o recintos en cuyo interior la temperatura se mantenía alta en invierno, ya que experimentalmente se comprobó que la acetificación se producía con mayor rapidez a una temperatura ambiente mayor.

La preparación de cada tonel es fundamental para realizar el proceso de acetificación. Inicialmente se añaden 60 L de vinagre de excelente calidad; una vez que han transcurrido ocho días, se adicionan 12 L de vino a través de la

<sup>199</sup> Adams, M. R. (1985). Vinegar. In: Wood, J. B., Microbiology of fermented foods. Elsevier Applied Science Publishers, New York, pp. 1-46.

varilla de vidrio que se encuentra atravesando el tonel. Inmediatamente, se procede a la inoculación del tonel con un poco del cultivo superficial de otro tonel en pleno proceso de producción. Llegado este momento, se repite la adición de 12 L de vino cada ocho días, hasta que el líquido contenido llegue al borde del orificio que se encuentra en cada uno de los fondos del tonel. A partir de ese instante, se da por iniciada la etapa de producción.

Una vez que el tonel se encuentre en proceso productivo, cada ocho o diez días se sacan unos 12 L de vinagre y se sustituyen por otros 12 L de vino. De este modo, el tonel puede prolongar indefinidamente el proceso de elaboración, siempre que no se produzca ningún tipo de infección por parte de bacterias productoras de celulosa y/o las consumidoras de ácido acético, así como contaminación por anguñulas.

La renovación del líquido del tonel depende de varios factores que influyen en el proceso: temperatura, capacidad de transformación de las bacterias acéticas, grado alcohólico y composición del vino empleado. En cualquier caso, el proceso de acetificación tiene lugar de forma lenta<sup>200</sup>.

### **II.3.2.2. Método Luxemburgués.**

Este método a diferencia del método de Orleáns, emplea bacterias acéticas inmovilizadas sobre virutas de haya que se sumergen periódicamente en el líquido a acetificar. De este modo se consigue un aumento en la velocidad de acetificación.

En este método se emplea una cuba giratoria que dispone de un orificio en el centro de uno de los fondos para permitir la entrada del aire. En la parte más alejada de esta abertura, en uno de los costados, se realiza un orificio estrecho para el vaciado del contenido. El tonel empleado está dividido en dos partes por un falso fondo, agujereado por orificios finos y numerosos. La parte menor está rellena de virutas de haya y tiene un termómetro para controlar la temperatura.

Con este método se puede obtener una cantidad de vinagre igual a la cuarta parte del contenido del tonel, pasadas cuarenta y ocho horas. El vinagre

---

<sup>200</sup> Xandri-Tagueña, J.M. (1977). “Vinagrería Vínica. Fermentaciones Vínicas, Iniciación a la Cervecería y Vinagrería Vínica”. Universidad Politécnica, Madrid, 265-310.

elaborado se extrae de la cuba y se sustituye por un volumen igual de vino. El proceso de acetificación continúa indefinidamente, salvo contaminación o accidente<sup>201</sup>.

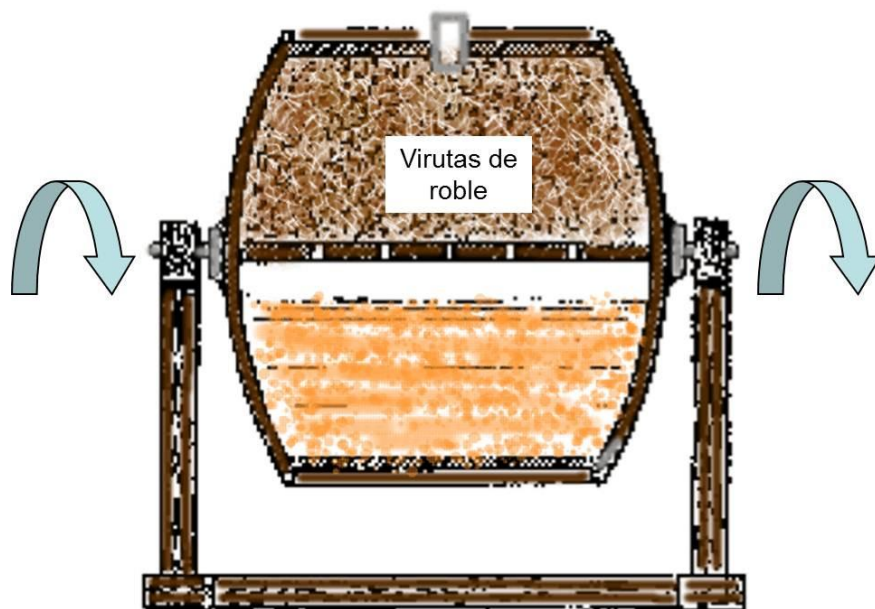


Figura II.3.3. Cuba rotatoria del método Luxemburgués<sup>202</sup>.

### II.3.2.3. Método de Schützenbach o método alemán.

En este proceso se emplean toneles o generadores verticales fabricados con madera de encina, con doble fondo. El primer fondo se encuentra agujereado y sirve como soporte de una serie de capas de virutas de madera de haya que se encuentran impregnadas con vinagre de buena calidad y que inmovilizan a las bacterias acéticas<sup>203</sup>.

Con la ayuda de una bomba, se realiza un proceso de recirculación mediante el cual se rocía el líquido proveniente del fondo del recipiente sobre el lecho fijo de virutas, contactando así con las bacterias y el aire que circula en

---

<sup>201</sup> Véase referencia nº 200 página 46.

<sup>202</sup> Véase referencia nº 200 página 46.

<sup>203</sup> Véase referencia nº 32 página 15.

contracorriente. Cuando la concentración de alcohol desciende hasta 0-3 % (v/v), se descargan aproximadamente las 4/5 partes del volumen líquido y se repone con vino fresco. Esta descarga se realiza cada 7-10 días. Así, se consigue una producción semi-continua de vinagre y una mejor regulación del oxígeno en comparación a los métodos anteriores. Se emplea un cambiador de calor externo refrigerado con agua, que actúa mediante un termostato, para controlar la temperatura. La temperatura óptima de trabajo se encuentra en el intervalo de 30 a 32.2 °C<sup>204</sup>.

El vinagre obtenido por métodos que emplean un cultivo superficial se caracteriza por el aroma y el gusto singular que le aporta la propia lentitud del proceso de acetificación, que se ve favorecido por el simultáneo envejecimiento<sup>205</sup>.

---

<sup>204</sup> Hickey-Richard, J. y Vaughn-Reese, H. (1954). "Industrial fermentation: Chapter 17 – acetic acid (vinegar)". Vol 1. Ed. Chemical Publishing Co., New York, pp. 498-535.

<sup>205</sup> Véase referencia n° 31 página 15.

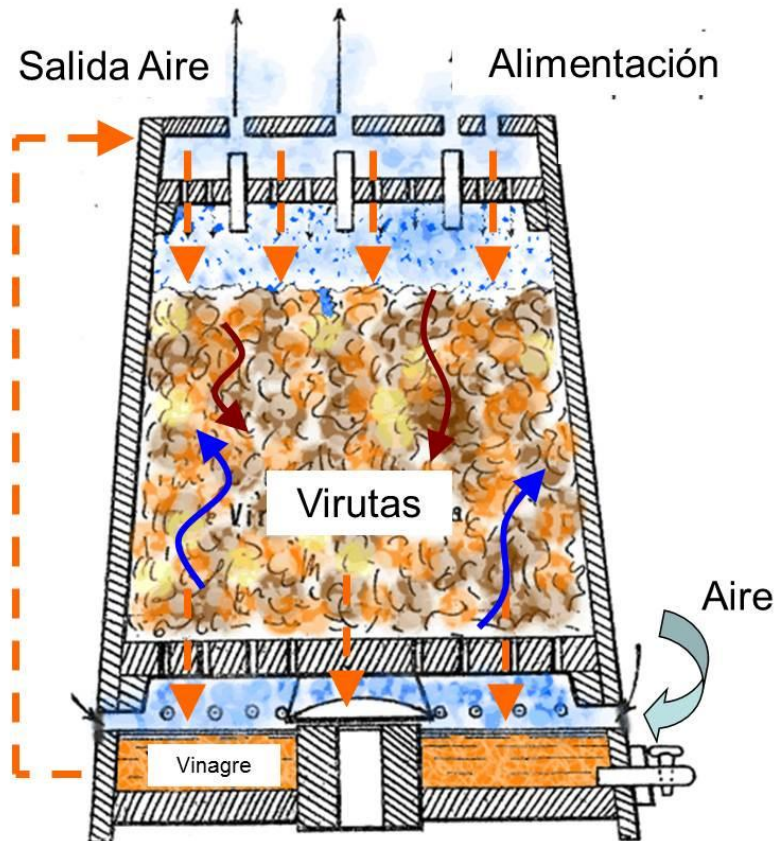


Figura II.3.4. Esquema del método Schützenbach o alemán para la producción de vinagres vínicos<sup>206</sup>.

### II.3.3. Comparación de los diferentes métodos de acetificación con cultivo superficial.

Los procesos de acetificación que emplean cultivo superficial son los métodos que supusieron un primer paso hacia la industrialización de la fabricación del vinagre.

<sup>206</sup> Véase referencia nº 200 página 46.



El contacto directo del aire con las bacterias acéticas es la característica principal de estos métodos, existiendo dos posibilidades: las bacterias se pueden encontrar en un cultivo sobre la superficie del medio a acetificar con una interfase líquido-gas (caso del método de Orleáns) o se pueden encontrar fijadas a las virutas empleadas como soportes (como en los métodos luxemburgués y Schützenbach).

A pesar de la elevada calidad que presenta el vinagre producido mediante métodos de acetificación con cultivo superficial, aumenta el riesgo de pérdida de sustancias volátiles por evaporación, a la vez que se ralentiza el proceso de producción. Adicionalmente, el empleo de virutas como soporte de fijación para las bacterias acéticas, introduce una serie de desventajas entre las que se pueden destacar las siguientes:

- Aumento de la temperatura sin controlar, conduciendo a pérdidas de alcohol por arrastre produciendo una disminución en el rendimiento.
- Acumulación de bacterias muertas sobre las virutas, debido a la falta de aireación y los aumentos de temperatura.
- Contaminación por bacterias productoras de celulosa (*Acetobacter xylinum*), que impiden la buena circulación del aire.
- Infección por anguñulas, que al desarrollarse paralizan el proceso de acetificación.
- Obliga al reemplazamiento anual del material de relleno, con el consiguiente periodo de acondicionamiento.
- Precisa de grandes espacios para los generadores de relleno, debido al elevado tamaño de éstos.

Estos métodos han permitido obtener entre 8-10 %(m/v) de ácido acético hasta que apareció la tecnología del cultivo sumergido. En cualquier caso, el principal problema de estos métodos es la gran lentitud del proceso y el menor volumen de producción<sup>207</sup>.

---

<sup>207</sup> García-Parrilla, M.C.; Heredia, F.J. y Troncoso, A.M. (1998). “The influence of the acetification process on the phenolic composition of wine vinagres”. *Sciences des aliments* 18, 211-221.

### II.3.4. Métodos de acetificación con cultivo sumergido.

Actualmente, el método más común de producción de vinagre es el que emplea un cultivo sumergido<sup>208, 209, 210</sup>, en el que el medio es mezclado y aireado continuamente<sup>211</sup>.

La característica principal de este procedimiento es el empleo de un cultivo de bacterias sumergidas libremente en el líquido a fermentar. El líquido está adecuadamente aireado para facilitar el aporte de oxígeno que el sistema necesita. Se emplean toneles de madera o tanques de acero inoxidable que trabajan en modo semi-continuo. De este modo, como inóculo para cada ciclo, se utiliza parte del medio del ciclo anterior, por lo que sólo se produce una renovación parcial del medio de fermentación al final de cada ciclo<sup>212, 213, 214, 215, 216, 217, 218</sup>.

Este método permite realizar rápidamente la acetificación. Como resultado se obtiene un vinagre homogéneo y con elevados rendimientos, facilitando la operación y control del proceso, dada la posibilidad de automatizar los ciclos. Aunque el capital inicial y coste de funcionamiento son mayores que en el método con cultivo superficial<sup>219</sup> al obtener un vinagre con mayor concentración de acético, se reduce el coste de almacenamiento y los volúmenes de filtración<sup>220</sup>.

---

<sup>208</sup> De Ory, I.; Romero, L.E. y Cantero, D. (1999). "Maximun yield acetic acid fermenter. Comparative fed-batch and continuous operation studies at pilot plant scales". *Bioprocess Engineering* 21, 187-190.

<sup>209</sup> Hromatka, O. y Ebner, H. (1951). "Investigacions of the vinegar fermentation.III. The influence of aeration on sumerged fermentation". *Enzymologia* 15, 57-69.

<sup>210</sup> Véase referencia nº 1 página 3.

<sup>211</sup> Véase referencia nº 66 página 25.

<sup>212</sup> De Ory, I.; Romero, L.E. y Cantero, D. (1999b). "Operation in semi-continuous with a closed pilot plant scale acetifier for vinegar production". *J Food Eng* 63, 39-45.

<sup>213</sup> Véase referencia nº 13 página 6.

<sup>214</sup> Véase referencia nº 1 página 3.

<sup>215</sup> Véase referencia nº 9 página 4.

<sup>216</sup> Véase referencia nº 10 página 4.

<sup>217</sup> Véase referencia nº 11 página 4.

<sup>218</sup> Véase referencia nº 12 página 4.

<sup>219</sup> Adams, M. R. y Twiddy, D. R. (1987). Performance parameters in the quick vinegar process. *Enzyme Microb Technol* 9, 369-373.

<sup>220</sup> Berraud, C. (2000). "Production of highly concentrated vinegar in fed-batch culture". *Biotechnol Lett* 22, 451-454.

Industrialmente se ha impuesto el sistema sumergido para la fabricación de vinagre<sup>221, 222, 223, 224, 225</sup>. La velocidad de acetificación que se puede alcanzar es mucho mayor que en los restantes métodos de acetificación, pudiéndose conseguir, aproximadamente, hasta  $0.4 \text{ g ácido acético (100mL}\cdot\text{h)}^{-1}$  en fermentadores industriales. La elevada velocidad de acetificación se debe a la eficacia de la transferencia de materia en el proceso.

Además de las ventajas ya indicadas, en comparación con el empleo de un cultivo superficial, este procedimiento destaca por las siguientes:

- Se reduce la pérdida de volátiles por evaporación al 3-5 %.
- Se facilita el empleo de sistemas automáticos para regular las etapas de carga y descarga, temperatura, concentración de etanol, etc...
- Se consigue mantener una temperatura uniforme dentro del fermentador, debida a la gran homogeneidad existente dentro del biorreactor.
- No emplea material de relleno, y consecuentemente, se eliminan todos los problemas que implica su empleo.
- La limpieza y el mantenimiento son más rápidos y eficaces.

### II.3.4.1. Acetator Frings.

Heinrich Frings fundó en Aquisgrán una sociedad productora de vinagre, en 1878. En 1950, incorpora las patentes de invención resultantes de la investigación del proceso de fermentación sumergida, produciéndose un alto grado de desarrollo tecnológico. Una de las bases de la biotecnología vinagrera actual es, sin duda alguna, el empleo del Acetator Frings.

---

<sup>221</sup> Levonen, E. y Llaguno, C. (1983). "Tecnología de la fabricación de vinagre". Rev Agroquim Tecnol Aliment 18, 289-296.

<sup>222</sup> Véase referencia nº 31 página 15.

<sup>223</sup> Suarez Lepe, J.A. e Iñigo Leal, B. (1992). "Microbiología Enológica. Fundamentos de vinificación". Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

<sup>224</sup> Ebner, H. y Follmann, H. (1983). "Acetic Acid. Biotechnology". Vol. 3. Ed. Rehm, H.-J. & Reed, G. Verlag Chemie GMBH, Weinheim.

<sup>225</sup> Véase referencia nº 1 página 3.

El Acetator Frings fue construido en los años 40 basándose en las investigaciones realizadas por Hromatka y Ebner<sup>226</sup> y, desde ese momento, se mantiene funcionando con algunas modificaciones en la mayoría de las industrias vinagreras actuales para elaborar la mayor parte de la producción.

Los acetificadores industriales, actualmente constan de un depósito de acero inoxidable, cuya capacidad se encuentra entre 100 y 300 HL, dotados de intercambiadores de calor para disipar el calor producido y mantener la temperatura alrededor de 30°C.

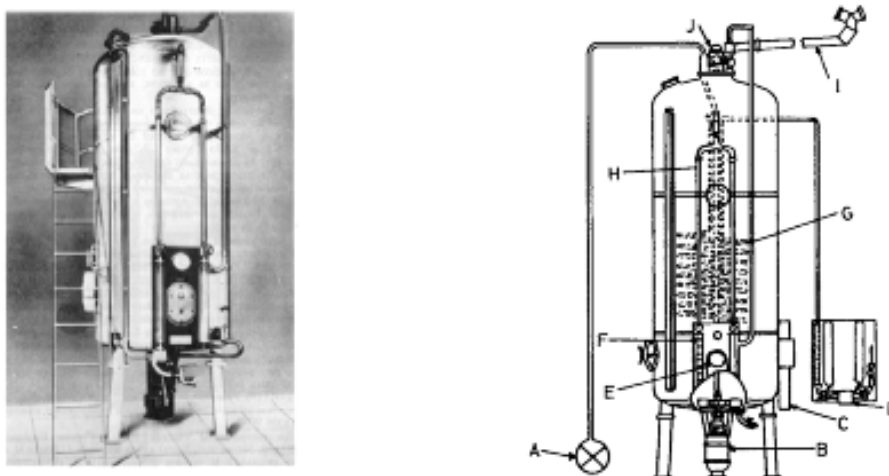


Figura II.3.5. Acetator Frings en acero inoxidable<sup>227</sup>.

El éxito de estos equipos es el diseño de las turbinas que emplean. Éstas no sólo aspiran de modo continuo aire desde el exterior sino que generan una intensa mezcla del mismo con el medio de cultivo. El resultado de su funcionamiento es una alta eficacia en la transferencia de oxígeno desde el aire.

También disponen de un buen sistema de recuperación de volátiles. Si se tiene en cuenta el carácter aerobio del proceso, la necesaria corriente de aire que, de forma continua, ha de circular a través del equipo, podría arrastrar compuestos volátiles que provocaría una disminución importante en el

<sup>226</sup> Véase referencia nº 209 página 51.

<sup>227</sup> Véase referencia nº 31 página 15.

rendimiento del proceso, así como en compuestos importantes desde el punto de vista sensorial. El tema de la prevención de la pérdida de volátiles, puede ser tan importante, especialmente para algunos tipos de productos, que se han propuesto reactores cerrados para eliminar cualquier pérdida, principalmente de compuestos volátiles<sup>228, 229, 230, 231</sup>.

Los reactores Frings funcionan normalmente de modo semi-continuo, realizándose la descarga de un porcentaje del volumen del fermentador y reponiendo el volumen descargado por medio fresco. Además, la actual tecnología del control permite automatizar todo el proceso; esto es de gran importancia desde el punto de vista logístico, contribuyendo de manera significativa a la estabilidad de éste.

En definitiva, de todos los sistemas desarrollados para la fabricación de vinagre, el fermentador Frings, es seguramente el equipo más eficiente que se ha desarrollado, presentando las ventajas siguientes:

- Permite trabajar con un amplio rango de concentraciones, tanto de etanol como de ácido acético, y con todas las materias primas empleadas para realizar el proceso de acetificación.
- Es altamente rentable por presentar un bajo consumo de energía por cada litro de etanol que se transforma.
- Es un equipo muy versátil, permitiendo trabajar tanto de modo semi-continuo como continuo.
- Permite trabajar con diferentes volúmenes, desde un volumen a escala de laboratorio, de 8 L de capacidad efectiva, hasta un volumen a escala industrial (es normal encontrar acetificadores Frings desde 20.000 hasta 100.000 L).
- El éxito del empleo de este fermentador en la industria se basa en su sistema de aireación. La turbina tiene un cuerpo hueco que está conectado con el exterior para permitir la entrada del aire; el giro de

---

<sup>228</sup> Gómez, J.M.; Romero, L.E.; Caro, I. y Cantero, D. (1993). "Optimización de un sistema de fermentación acética con reutilización de aire". *Alimentación, Equipos y Tecnología* 10, 55-59.

<sup>229</sup> Macías, M.; Caro, I. y Cantero, D. (1996). "Optimum operating conditions in closed-system industrial acetifiers (discontinuous operation): a study by computer simulation". *The Chemical Engineering Journal* 62, 183-191.

<sup>230</sup> Véase referencia n° 229 página 54.

<sup>231</sup> Véase referencia n° 208 página 51.

la turbina genera un vacío que succiona aire del exterior. Rodeando la turbina se encuentra una pieza fija denominada estator. Con este diseño se consigue dispersar el aire de forma homogénea por todo el medio en forma de burbujas pequeñas, que hace que la superficie de transferencia del oxígeno sea mayor y, al tener una mayor velocidad de transferencia, se tiene también una mayor velocidad de producción de ácido acético. Con este sistema se consigue una mayor eficacia en la oxigenación y se realiza una mezcla del cultivo, lo cual es muy importante para mantener un medio homogéneo.

Un ejemplo de metodología de trabajo para obtener un vinagre con más de 10 % (m/v) de ácido acético, se realiza siguiendo un modo de trabajo semi-continuo. El ciclo de trabajo comienza con el inicio de la etapa de carga, en la que se realiza el llenado del volumen descargado al final del ciclo anterior; se utiliza un vino con alta graduación alcohólica (10-15 % (v/v) de etanol) y pequeñas concentraciones de ácido acético. Es recomendable que la carga se realice sin producir cambios bruscos de las distintas concentraciones existentes en el medio para no producir una fase lag importante. Para este nuevo ciclo se emplea como inóculo la población de bacterias existentes en el volumen que no se descargó, proveniente del ciclo anterior; una vez concluida la carga se deja evolucionar el sistema. Dado que el consumo de etanol implica la producción de ácido acético, cuando la concentración de etanol alcanza un valor relativamente bajo se realiza una descarga rápida de un determinado volumen del fermentador, volviéndose a iniciar un nuevo ciclo.

### **II.3.5. Métodos de obtención de vinagres artesanales de alta calidad amparados por denominaciones de origen.**

Los vinagres artesanales siguen procedimientos de elaboración específicos regulados por sus propias normativas. Actualmente hay cinco vinagres con denominación de origen y reconocimiento internacional: “Aceto Balsámico Tradizionale” de Módena (Italia), “Aceto Balsámico Tradizionale” de Reggio Emilia (Italia), “Vinagre de Jerez” de Cádiz (España), “Vinagre del Condado de Huelva” de Huelva (España) y “Vinagre de Montilla-Moriles” de Córdoba (España).

### II.3.5.1. Vinagre Balsámico Tradicional de Módena y de Reggio Emilia.

Desde hace casi un milenio se elabora este vinagre, en algunas regiones del norte de Italia, pero fue en el año 1986 cuando el “Vinagre Balsámico Tradicional” de la región de Módena y Reggio Emilia fue reconocido como un producto con Denominación de Origen<sup>232</sup>. Su elaboración está protegida por el Consejo de la Denominación de Origen y sólo permite su producción en las provincias de Reggio Emilia y Módena<sup>233</sup>.

Para la fermentación, se emplea como materia prima mosto de la variedad de uva Trebbiano, que se concentra por calentamiento mediante ebullición suave<sup>234</sup>, con esto se consigue una eliminación de la microbiota espontánea y una concentración del orden del 30-40 % del contenido en azúcares. El mosto concentrado se fermenta con levaduras pertenecientes al género *Zygosaccharomyces* y simultáneamente las bacterias acéticas transforman el etanol a ácido acético. La fermentación se realiza con un proceso lento que emplea barriles de madera de diferentes tipos y tamaños<sup>235</sup>. El proceso de envejecimiento debe de tener una duración de, al menos, doce años<sup>236, 237, 238, 239, 240</sup>.

---

<sup>232</sup> Ley 93/1986. Diario Oficial de la Comunidad Europea, publicado el 3 de abril de 1986, por la que se aprueba la “Denominación de origen del Vinagre de Módena”.

<sup>233</sup> Rangone, U. (2005). “Vinegar in the Este Duchy. A story of Customs, traditions and politics”. In: Book of Abstracts, Internacional Symposium of Vinegars and Acetic Acid Bacteria. Reggio Emilia, Italia.

<sup>234</sup> Muratore, G.; Licciardello, F.; Restuccia, C. y Giudici, P. (2005). “Formation of furfural compounds in heat treated must for Tradicional Balsamic vinegar production”. In: Book of Abstracts, Internacional Symposium of Vinegars and Acetic Acid Bacteria. Reggio Emilia, Italia.

<sup>235</sup> Seidemann, J. (1996). “Balsamessig-ein Essig wie Balsam”. Ind. Obst-Gemüseverwert. 8(3), 88-96.

<sup>236</sup> Antonelli, A.; Chinnici, F. y Masino, F. (2004). “Heat-induced chemical modification of grape must as related to its concentration during the production of traditional balsamic vinegar: a preliminary approach”. Food Chemistry 88, 63-68.

<sup>237</sup> Plessi, M.; Monzani, A. y Coppini, D. (1988). “Determination of the monosaccharide and alcohol content of balsamic and other vinegars by enzymatic methods”. Agric Biol Chem 52(1), 25-30.

<sup>238</sup> Stacchini, A.; Draisci, R. y Lorusso, S. (1990). “Tecnologi e caratterizzazione degli aceti balsamici”. Industrie delle Bevande 19, 107-212.

<sup>239</sup> Turtura, G.C. y Bortolotti, P.P. (1991). “Microbiological and chemical characteristics of natural balsamic vinegar. II. Relation to production techniques”. Annali di Microbiologia ed Enzimologia 41(2), 169-82.

La elaboración del vinagre se consigue mediante la realización de trasvases entre barriles de diferente capacidad y tipo de madera, situados en serie. El primer barril se alimenta con mosto concentrado por cocción y del último se obtiene el “aceto”. La capacidad y tipo de madera de los barriles empleados, en el sentido en el que se producen los trasvases, son los siguientes: 60 L y roble, 50 L y castaño, 40 L y cerezo, 30 L y fresno y, finalmente, 20L y morera. Dado que los volúmenes de los barriles son diferentes y teniendo en cuenta las pérdidas por evaporación, la fracción retirada de cada uno es distinta. Además, la concentración de azúcar se incrementa progresivamente desde el barril de mayor tamaño hasta el menor debido a la evaporación del agua a través de la madera<sup>241</sup>.

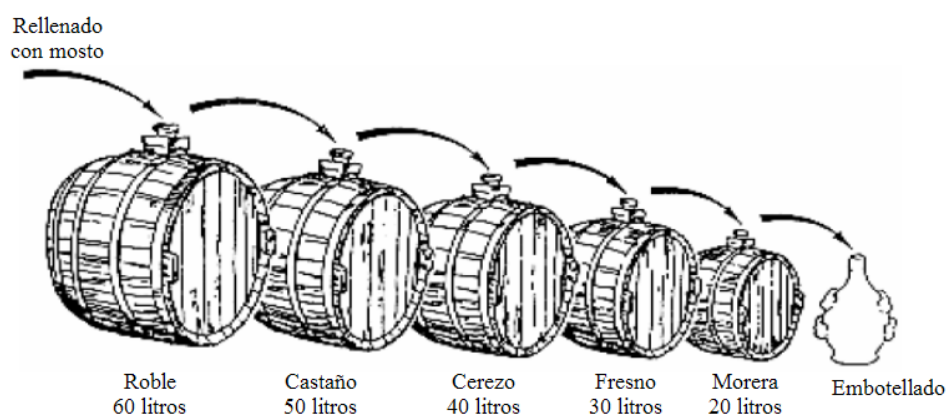


Figura II.3.6. Elaboración de Vinagre Balsámico de Módena (Italia)<sup>242</sup>.

La porosidad de cada tipo de madera y la entrada de oxígeno que permite, influye en el desarrollo de la acetificación, el aroma y el color del vinagre obtenido. El producto que se obtiene es un líquido marrón oscuro, con aspecto de jarabe, un “bouquet” característico y con sabor agridulce<sup>243</sup>.

Comercialmente existen dos categorías de vinagre balsámico en el mercado: “Aceto Balsámico” y “Aceto Balsamico Tradizionale” (doce años de

<sup>240</sup> Giudici, P.; Altieri, C. y Cavalli, R. (1992). “Aceto balsamico tradizionale: preparazione del fermentato di base”. *Industrie delle Bevande XXI*, 478-483.

<sup>241</sup> De Vero, L.; Gullo, M.; Landi, S. y Solieri, L. (2005). “Acetic acid bacteria of traditional balsamic vinegar”. In: *Book of Abstracts, International Symposium of Vinegars and Acetic Acid Bacteria*. Reggio Emilia, Italia.

<sup>242</sup> Véase referencia nº 31 página 15.

<sup>243</sup> Véase referencia nº 233 página 56.



envejecimiento). La diferencia característica del “Aceto Balsamico” con el vinagre de vino es el gran contenido en azúcares que está siempre presente. También existe diferencia en los microorganismos implicados en el proceso: en la producción del “Aceto Balsamico” se produce la fermentación simultánea del azúcar (*Zygosaccharomyces*) y del etanol (*Gluconoacetobacter*)<sup>244</sup>, mientras que en el vinagre de vino se produce primero la fermentación alcohólica (*Saccharomyces*) y, posteriormente, se produce la fermentación acética (*Acetobacter*).

### II.3.5.2. El Vinagre de Jerez.

El Vinagre de Jerez fue reconocido como producto con Denominación de Origen por la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía en el año 2000<sup>245</sup> y se ha realizado su inscripción en el Registro Comunitario de Denominaciones de Origen Protegida<sup>246</sup> por el Consejo Regulador de la Denominación de Origen de “Jerez-Xerez-Sherry” “Manzanilla de Sanlúcar de Barrameda” y “Vinagre de Jerez” como “Vinagre de Jerez”.

La descripción indica que *“El vinagre de Jerez es el producto resultante de la fermentación acética de vinos aptos elaborados a partir de uvas producidas en la Zona de Producción de la Denominación de Origen y producidos y envejecidos en las condiciones y lugares previstos en este Pliego de Condiciones, bajo unas prácticas tradicionales y que reúne las características organolépticas y analíticas que le son propias”*<sup>247</sup>. Con la finalidad de no mostrar incoherencias entre este documento normativo y el Pliego de Condiciones en el cual se emite la decisión favorable en relación con

---

<sup>244</sup> Chiavaro, E.; Caligiani, A. y Palla, G. (1998). Chiral indicators of ageing in balsamic vinegars of Modena. *Ital J Food Sci*, 10(4), 329-337.

<sup>245</sup> Orden de 26 de Diciembre de 2000, por la que se ratifica el Reglamento de la Denominación de Origen “Vinagre de Jerez” y la modificación del Reglamento de las Denominaciones de Origen “Jerez-Xerès-Sherry” y “Manzanilla Sanlúcar de Barrameda” y de su Consejo Regulador. Boletín Oficial del Estado (BOE), nº 313 del 30 de Diciembre de 2000.

<sup>246</sup> Reglamento de ejecución (UE) nº 985/2011 de la comisión de 30 de septiembre de 2011 por el que se inscribe una denominación en el Registro de Denominaciones de Origen Protegidas y de Indicaciones Geográficas Protegidas [Vinagre de Jerez (DOP)]. Diario Oficial de la Unión Europea L260/9.

<sup>247</sup> Resolución de 24 de Marzo de 2008, de la Dirección General de Industrias y Calidad Agroalimentaria, por la que se da publicidad a la solicitud de inscripción de la Denominación de Origen Protegida “Vinagre de Jerez”, en el correspondiente Registro Comunitario. Boletín Oficial del Estado (BOE), nº 100 del 25 de Abril de 2008.

la solicitud de inscripción de la Denominación de Origen protegida “Vinagre de Jerez” se modifica el reglamento de dicha denominación<sup>248</sup>.

Se caracteriza por ser obtenido a partir de vinos procedentes de las variedades de uvas cultivadas en la zona de producción de la Denominación de Origen “Jerez-Xérès-Sherry”, “Manzanilla Sanlúcar de Barrameda”. El vinagre producido se somete a un envejecimiento característico en barricas de roble americano mediante el sistema denominado “Solera y Criadera”, similar al empleado en el envejecimiento de los vinos generosos<sup>249</sup>.

En la citada solicitud de inscripción se describen las materias primas empleadas, los métodos de elaboración y envejecimiento, así como las características analíticas del producto obtenido<sup>250, 251</sup>.

---

<sup>248</sup> Orden de 30 de noviembre de 2011, por la que se modifica la Orden de 13 de mayo de 2010, por la que se aprueba el Reglamento de las Denominaciones de Origen «Jerez-Xérès-Sherry» y «Manzanilla-Sanlúcar de Barrameda», así como sus correspondientes Pliegos de Condiciones. Boletín Oficial de la Junta de Andalucía nº 249 de 22 de diciembre de 2011.

<sup>249</sup> Pascual, J. (2005). “The Solera system for the Vinagre de Jerez”. In: Book of Abstracts, Internacional Symposium of Vinegars and Acetic Acid Bacteria. Reggio Emilia, Italia.

<sup>250</sup> Véase referencia nº 247 página 58.

<sup>251</sup> Orden de 20 de enero de 2009, por la que se modifica la Orden de 22 de febrero de 2000, por la que se aprueba el Reglamento de la Denominación de Origen “Vinagre de Jerez”. BOJA nº 19, 29 de enero de 2009, 24-25.

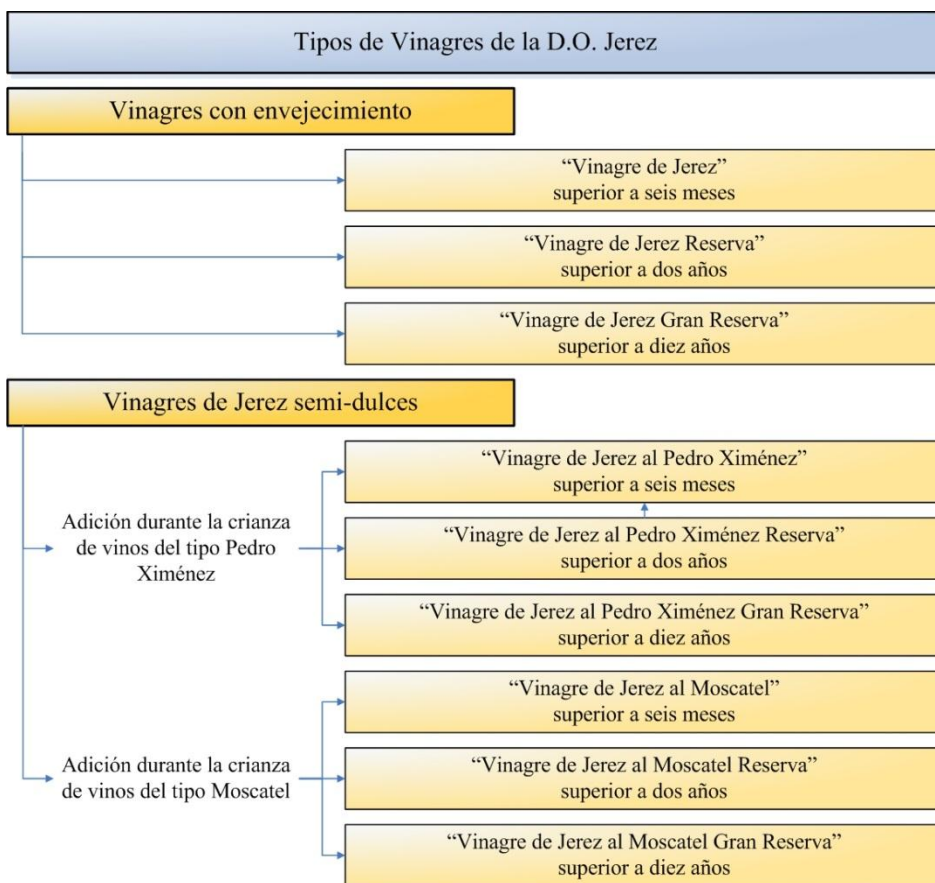


Figura II.3.7. Tipos de vinagres de la Denominación de Origen “Vinagre de Jerez”.

### II.3.5.3. Vinagre del Condado de Huelva.

El Vinagre del Condado de Huelva se obtiene por fermentación acética de vino procedente de la Denominación de Origen del Condado de Huelva. Hay constancia histórica de producción de vinagre del Condado de Huelva exportado a países como Inglaterra y Rusia a mediados del siglo XVIII. Pero fue en el año 2002 cuando fue reconocido como producto con Denominación de Origen<sup>252, 253</sup> por la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía.

<sup>252</sup> Orden de 31 de Julio de 2002, por la que se aprueba el Reglamento de las Denominaciones de Origen Condado de Huelva y Vinagre del Condado de Huelva y de

El Vinagre de Condado de Huelva ha realizado su solicitud de inscripción en el Registro Comunitario de Denominaciones de Origen Protegida por el Consejo Regulador de la Denominación de Origen de “Vinagre de Condado de Huelva”<sup>254</sup> y la Consejería de Agricultura y Pesca emite la decisión favorable en relación con la solicitud de la Denominación de Origen protegida Vinagre de Condado de Huelva<sup>255</sup>. Obteniéndose un resultado favorable en dicha solicitud de inscripción<sup>256</sup>.

Al igual que en el caso anterior, para no mostrar incoherencias entre éste documento normativo y el Pliego de Condiciones en el cual se emite la decisión favorable en relación con la solicitud de inscripción de la Denominación de origen protegida “Vinagre de Condado de Huelva” se modifica el reglamento de dicha denominación<sup>257</sup>.

El Vinagre de Condado de Huelva se caracteriza por ser un producto obtenido por acetificación de vino amparado por la Denominación de Origen Condado de Huelva. La acetificación se produce en un fermentador con un estricto control de la temperatura, entre 28 y 33 °C, y una aireación en forma de burbujas muy pequeñas de forma homogénea. Una vez que se ha elaborado el

---

su Consejo Regulador. Boletín Oficial de la Junta de Andalucía (BOJA), nº 99 del 24 de agosto de 2002.

<sup>253</sup> ORDEN APA/2967/2002, de 11 de noviembre, por la que se ratifica el Reglamento de las Denominaciones de Origen “Condado de Huelva” y “Vinagre del Condado de Huelva” y de su Consejo Regulador. Boletín Oficial del Estado (BOE), nº 282 del 25 de Noviembre de 2002.

<sup>254</sup> Resolución de 26 de Marzo de 2008, de la Dirección General de Industrias y Calidad Agroalimentaria, por la que se da publicidad a la solicitud de inscripción de la Denominación de Origen Protegida “Vinagre de Condado de Huelva”, en el correspondiente Registro Comunitario. Boletín Oficial del Estado (BOE), nº 118 del 15 de Mayo de 2008.

<sup>255</sup> Orden de 5 de septiembre de 2008, por la que se emite decisión favorable en relación con la solicitud de inscripción de la Denominación de Origen protegida Vinagre de Condado de Huelva. BOJA nº 184, 16 de septiembre de 2008, 35-40.

<sup>256</sup> Reglamento de ejecución (UE) nº 984/2011 de la comisión de 30 de septiembre de 2011 por el que se inscribe una denominación en el Registro de Denominaciones de Origen Protegidas y de Indicaciones Geográficas Protegidas [Vinagre del Condado de Huelva (DOP)]. Diario Oficial de la Unión Europea L260/7.

<sup>257</sup> ORDEN de 30 de noviembre de 2011, por la que se aprueba el Reglamento de funcionamiento de las Denominaciones de Origen «Condado de Huelva», «Vinagre del Condado de Huelva» y «Vino Naranja del Condado de Huelva» y su Consejo Regulador, así como los Pliegos de Condiciones de las Denominaciones de Origen «Condado de Huelva» y «Vinagre del Condado de Huelva». Boletín Oficial de la Junta de Andalucía nº 249, 22 de diciembre de 2011, 199-217.

vinagre se descarga aproximadamente un 30-45 % del volumen y se repone con vino destinado para la acetificación. El vinagre obtenido del proceso de acetificación se somete a procesos de clarificación y filtración para estabilizarlo para su posterior vida comercial. El vinagre obtenido puede embotellarse y salir directamente al mercado o puede someterse a un proceso de envejecimiento posterior.

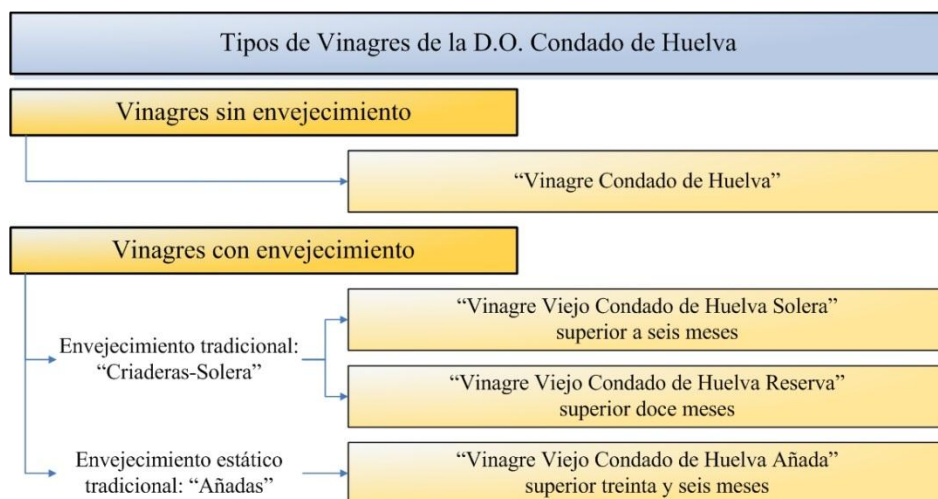


Figura II.3.8. Tipos de vinagres de la Denominación de Origen “Vinagre de Condado de Huelva”.

El vinagre que se somete a procesos de envejecimiento se introduce en botas de roble con una capacidad máxima de 650 L, pudiendo ser enriquecido o no con vino generoso de la Denominación de Origen. Según el método de envejecimiento se obtienen tres tipos de “Vinagres Viejos del Condado de Huelva”, dependiendo del tiempo y del método de envejecimiento. Una vez transcurrido el período de envejecimiento se embotella o envasa el vinagre obtenido y se comercializa.

### II.3.5.4. Vinagre de Montilla-Moriles.

La Consejería de Agricultura y Pesca ha emitido la decisión favorable en relación con la solicitud de inscripción de la Denominación de Origen

Protegida Vinagre de Montilla-Moriles<sup>258</sup>, que había sido previamente solicitada por el Consejo Regulador de la D.O. Montilla-Moriles<sup>259</sup>.

Resolución de 16 de noviembre de 2009, de la Dirección General de Industria y Mercados Alimentarios, por la que se concede la protección nacional transitoria a la Denominación de Origen Protegida «Vinagre de Montilla-Moriles»<sup>260</sup>.

El Pliego de Condiciones en el cual se emite la decisión favorable en relación con la solicitud de inscripción de la Denominación de origen protegida “Vinagre de Montilla-Moriles” y el reglamento de dicha denominación<sup>261</sup>.

A fecha de 2006 había ocho bodegas que elaboraban aproximadamente unos 2 millones de litros de vinagre de calidad en dicha zona de producción<sup>262</sup>.

Al igual que en las otras Denominaciones de Origen de Vinagre se emplea para su producción vinos certificados de la D. O. Montilla-Moriles, de las variedades Fino, Amontillado, Oloroso y Pedro Ximénez.

Los vinagres de Montilla-Moriles se pueden envejecer por el sistema de criaderas y solera o por el sistema de “añadas”, al igual que los vinos amparados por esta denominación.

---

<sup>258</sup> Orden de 19 de septiembre de 2008, por la que se emite decisión favorable en relación con la solicitud de inscripción de la Denominación de Origen Protegida Vinagre de Montilla-Moriles. BOJA nº 198, 3 de octubre de 2008, 42-49.

<sup>259</sup> Resolución de 24 de Marzo de 2008, de la Dirección General de Industrias y Calidad Agroalimentaria, por la que se da publicidad a la solicitud de inscripción de la Denominación de Origen Protegida “Vinagre de Montilla-Moriles”, en el correspondiente Registro Comunitario. Boletín Oficial del Estado (BOE), nº 100 del 25 de Abril de 2008.

<sup>260</sup> Resolución de 16 de noviembre de 2009, de la Dirección General de Industria y Mercados Alimentarios, por la que se concede la protección nacional transitoria a la Denominación de Origen Protegida «Vinagre de MontillaMoriles». Boletín Oficial del Estado nº 310 de 25 de diciembre de 2009, 109885-109898.

<sup>261</sup> Orden de 30 de noviembre de 2011, por la que se aprueba el Reglamento de funcionamiento de las Denominaciones de Origen “Montilla-Moriles” y “Vinagre de Montilla-Moriles”, así como sus correspondientes Pliegos de Condiciones. Boletín Oficial de la Junta de Andalucía nº 249 de 22 de diciembre de 2011.

<sup>262</sup> Merino-Sierra, F.J. y Fernández-Rebollo, R.M. (2006). “Vinagres andaluces con denominación de origen”. Eds: García-García, I. Second Symposium on R+D+I for Vinegar Production, pp. 265-284. Córdoba, España.

Dependiendo del período y tipo de envejecimiento se podrán distinguir diferentes tipos de vinagres.

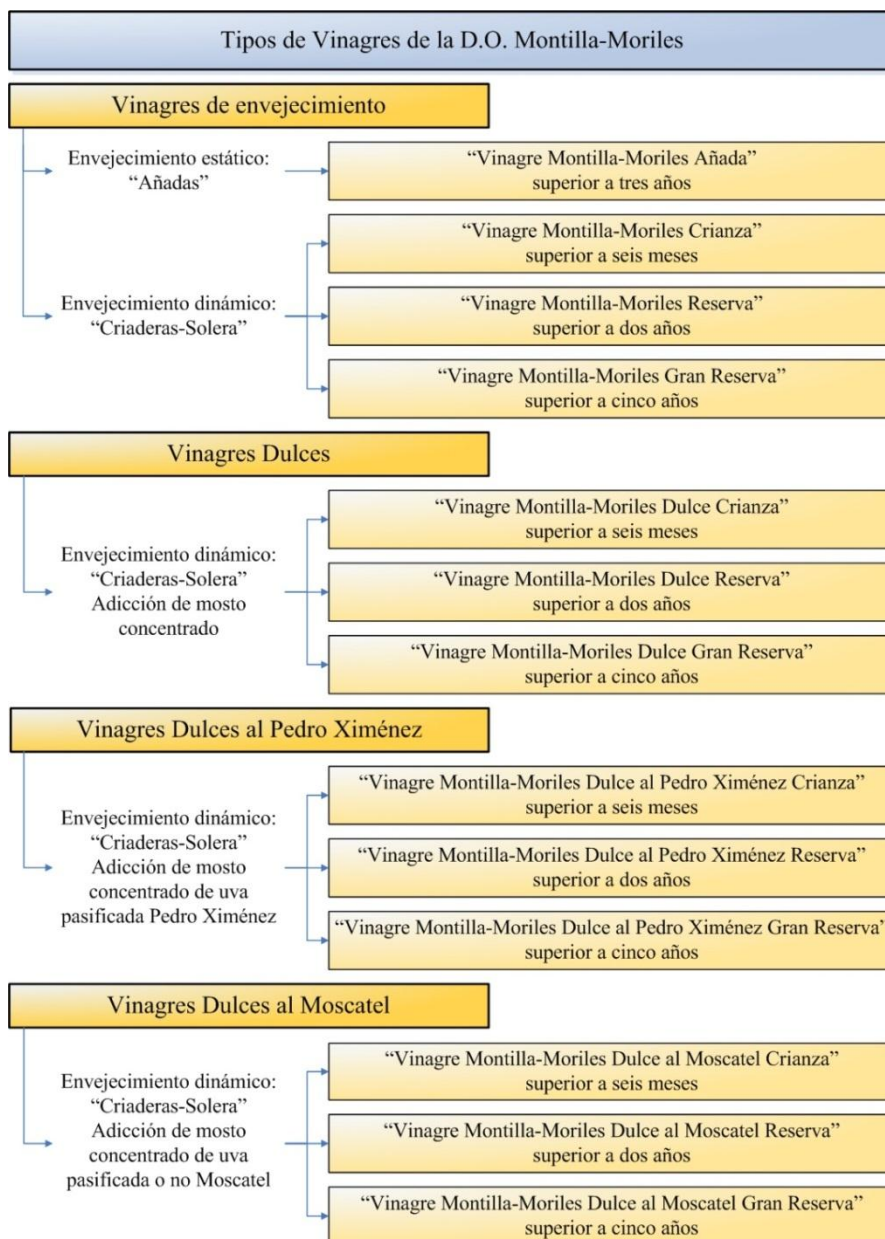


Figura II.3.9. Tipos de vinagres de la Denominación de Origen “Vinagre de Montilla-Moriles”.

## II.4. PROCESO INDUSTRIAL DE ELABORACIÓN DEL VINAGRE.

La industria vinagrera se basa, actualmente en el empleo de la fermentación en cultivo sumergido, ya que es el método más rentable. También hay otras posibilidades de fermentación, el conocido cultivo superficial, pero éste se emplea normalmente en métodos tradicionales o artesanales.

En la siguiente figura se muestra un diagrama de flujo del proceso global. Las operaciones que se han de llevar a cabo son las siguientes: recepción de la materia prima, preparación para la fermentación, fermentación, clarificación, filtración, envejecimiento (dependiendo del tipo de vinagre), estabilización y envasado.

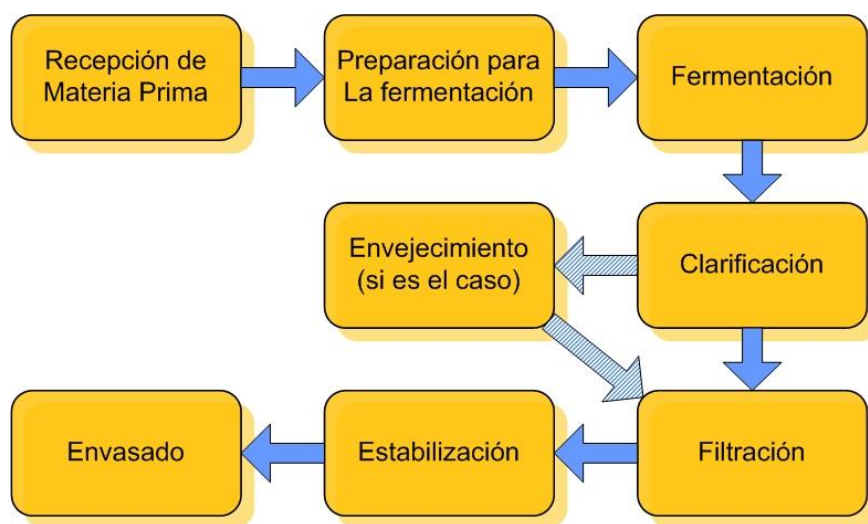


Figura II.4.1. Esquema del proceso de fabricación industrial de vinagre.

Destacamos que es un proceso de elaboración general y dentro de él pueden existir múltiples variaciones.

### II.4.1. Recepción y preparación de la materia prima.

La materia prima utilizada se almacena en unos depósitos especialmente destinados para ello; tanto el material con el que se construyen como las condiciones de almacenamiento deben garantizar su conservación. Los depósitos suelen ser normalmente de madera, poliéster o acero inoxidable.



Normalmente se realiza un tratamiento previo sobre la materia prima, como puede ser un ajuste a un grado alcohólico menor, adición de nutrientes, etc. Todo esto implica la disponibilidad de depósitos para realizar dichas operaciones así como de tanques nodrizas que alimenten a los fermentadores.

Para obtener un buen producto y que la fermentación acética transcurra sin problemas, los vinos empleados como materia prima deben ser:

- Sanos, potables y libres de olores y sabores extraños.
- Estar libres de antifermentos.
- Limpios.
- Secos, sin restos de azúcares para evitar posibles contaminaciones por levaduras.
- Tradicionalmente se utilizaban en la acetificación vinos de baja graduación pero, actualmente, se pueden utilizar vinos con graduación alcohólica de 10-12 % (v/v), o incluso superior.

### **II.4.2. Fermentación.**

Las condiciones de fermentación pueden ser muy variables, dependiendo del tipo de producto.

Por lo general la temperatura de fermentación debe estar comprendida entre 30-31 °C, dado que en este rango las bacterias muestran su máxima actividad. La temperatura es una variable importante por las implicaciones que puede tener en la calidad y rendimiento del producto obtenido; no se debe olvidar la importancia de retener compuestos volátiles, clave en la evaluación final del proceso<sup>263, 264</sup>.

El caudal de aire es también una variable de gran trascendencia teniendo en cuenta que el proceso está controlado por la transferencia de oxígeno de esta fase al medio de cultivo<sup>265</sup>. Se ha de trabajar con un alto caudal

---

<sup>263</sup> Romero, L.E. y Cantero, D. (1998). "Mathematical Model for Liquid-Gas Equilibrium in Acetic Acid Fermentations". *Biootechnology and Bioengineering* 59(3), 310-317.

<sup>264</sup> Romero, L.E. y Cantero, D. (1998). "Evaluation of ethanol evaporation losses in acetic acid fermentations". *Bioprocess Engineering* 18, 289-291.

<sup>265</sup> Véase referencia nº 28 página 14.

de aire pero que no dé lugar a un exceso de oxígeno sin consumir en el medio; además, el dispositivo de aireación debe optimizar la relación entre la masa de oxígeno transferida al medio y el coste de la energía necesaria para ello<sup>266</sup>. Por otra parte, un exceso de aire coadyuvaría las pérdidas de volátiles por arrastre. Si bien el aire no ha de ser estéril, sí debe ser limpio para minimizar el riesgo de contaminaciones que, aunque improbables, no son imposibles.

El pH óptimo para el desarrollo de las bacterias acéticas se encuentra dentro del rango 5-6.5, aunque tienen capacidad de sobrevivir y crecer a pH más ácidos. Trabajar con valores de pH no incluidos en el rango óptimo aumenta la sensibilidad de los microorganismos a otros factores, como la concentración de etanol y ácido acético presentes en el medio. En cualquier caso, esta variable se deja evolucionar libremente a lo largo del ciclo.

La concentración de etanol y de ácido acético afecta a la viabilidad celular; se puede considerar que unos valores aproximados de  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  son los más adecuados para llevar a cabo la reacción<sup>267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274</sup>. Sin embargo, las concentraciones de estos compuestos son variables a lo largo del ciclo y dependientes de las condiciones de operación<sup>275</sup>.

### II.4.3. Clarificación.

Una vez obtenido el vinagre en el fermentador hay que someterlo a una etapa de clarificación para estabilizar el producto durante su vida comercial. El grado de turbidez es mayor si el vinagre se obtiene por cultivo sumergido que si se obtiene por cultivo superficial.

---

<sup>266</sup> García-García, I.; Santos-Dueñas, I.M.; Jiménez-Ot, C.; Jiménez-Hornero, J. y Bonilla-Venceslada, J. (2009). "Chapter 6: Vinegar Engineering". In: *Vinegars of the World*. Solieri, L. y Giudici, P. Eds. Springer-Verlag, Italia, pp. 97-120.

<sup>267</sup> Véase referencia nº 66 página 25.

<sup>268</sup> Véase referencia nº 178 página 37.

<sup>269</sup> Park, Y.S.; Ohtake, H.; Fukaya, M.; Okumura, H.; Kawamura, Y. y Toda, K. (1989). "Effects of dissolved oxygen and acetic acid concentrations on the acetic acid production in continuous culture of *Acetobacter aceti*". *J Ferment Bioeng* 68(2), 96-101.

<sup>270</sup> Romero, L.E., Gómez, J.M., Caro, I. y Cantero, D. (1994). "A kinetic model for growth of *Acetobacter aceti* in submerged culture". *The Chem Eng J* 54, 15-24.

<sup>271</sup> Véase referencia nº 220 página 51.

<sup>272</sup> Véase referencia nº 10 página 4.

<sup>273</sup> Véase referencia nº 11 página 4.

<sup>274</sup> Véase referencia nº 12 página 4.

<sup>275</sup> Véase referencia nº 193 página 42.

Dentro de la etapa de clarificación se pueden realizar diferentes operaciones como son: autoclarificación, floculación mediante agentes químicos, diversos tipos de filtración, etc., dependiendo de la materia prima empleada, turbidez inicial del vinagre, color y conservación de aromas<sup>276, 277</sup>.

#### **II.4.3.1. Autoclarificación.**

La autoclarificación sólo se puede emplear cuando el vinagre que se descarga del fermentador es suficientemente limpio y se dispone de un largo período para que se realice la clarificación, ya que la precipitación espontánea se produce lentamente. La lentitud de este tipo de clarificación supone un incremento en los costes de elaboración ya que implica la necesidad de emplear grandes depósitos.

#### **II.4.3.2. Clarificación físico-química.**

Basada en el empleo de productos clarificantes que forman complejos coloidales con las sustancias insolubles (polifenoles, taninos, proteínas, etc.) de forma que, al aumentar su peso, se favorece su precipitación.

Este sistema de clarificación tiene una serie de etapas: la primera de ellas consiste en realizar una buena mezcla del vinagre con el clarificante, a continuación se produce la coagulación y comienza la etapa de precipitación y, por último, se produce la sedimentación por gravedad.

Los clarificantes pueden presentar naturaleza orgánica o inorgánica, aunque con frecuencia se emplea una mezcla de ambos para conseguir mayor eficacia<sup>278</sup>.

Los clarificantes orgánicos son más eficaces pero alteran la composición del vinagre. Los más utilizados son la gelatina, albúmina de huevo, albúmina de sangre, caseinato potásico, etc.

---

<sup>276</sup> López, F.; Medina, F.; Prodanov, M. y Güell, C. (2003). "Oxidation of activated carbon: application to vinegar decolorization". *J Coll Int Sci* 257, 173-178.

<sup>277</sup> López, F.; Pescador, P.; Güell, C.; Morales, M.L.; García-Parrilla, M.C. y Troncoso, A.M. (2005). "Industrial vinegar clarification by cross-flow microfiltration: effect on colour and polyphenol content". *J Food Eng* 68, 133-136.

<sup>278</sup> Véase referencia nº 31 página 15.

Los clarificantes inorgánicos forman un gel en solución acuosa que atrapa las partículas y favorece la decantación sin alterar la composición del vinagre. Los clarificantes inorgánicos más utilizados son la bentonita y gel de sílice.

#### **II.4.4. Envejecimiento.**

La etapa de envejecimiento es opcional; este período de maduración puede oscilar entre unos meses y varios años y confiere al vinagre unas características organolépticas adicionales a las que poseía al concluir la etapa de fermentación. Los vinagres envejecidos son aquéllos que se han sometido a un proceso de maduración una vez finalizado su proceso de acetificación, clarificación y filtración, adquiriendo así unas características especiales<sup>279, 280</sup>.

Para el envejecimiento del vinagre se suelen emplear botas fabricadas con diversos materiales. De ellas, las más empleadas son las fabricadas a partir de roble americano o francés, ya que presentan una porosidad adecuada para permitir el contacto del vinagre con el oxígeno del aire sin producir demasiadas pérdidas.

Los vinagres que han sufrido un envejecimiento en madera se caracterizan por contener componentes fenólicos que son extraídos de la madera como aldehídos fenólicos y ácidos fenólicos<sup>281, 282</sup>. Además se produce la evaporación de compuestos volátiles del vinagre y reacciones entre los componentes de la madera y el vinagre, así como, procesos químicos de oxidación e hidrólisis<sup>283</sup>. El envejecimiento en madera es un proceso muy complejo y relativamente poco estudiado (a diferencia del vino), en cualquier caso, una parte importante de todos los estudios realizados corresponden al grupo de investigación de la Universidad de Sevilla: AGR-167 “Derivados de la Uva”, a partir de las siguientes referencias<sup>284, 285, 286</sup> así como de la bibliografía allí citada, al lector puede adentrarse en muchos de los aspectos involucrados.

---

<sup>279</sup> Véase referencia nº 31 página 15.

<sup>280</sup> Véase referencia nº 4 página 3.

<sup>281</sup> Véase referencia nº 27 página 14.

<sup>282</sup> Véase referencia nº 29 página 14.

<sup>283</sup> Morales, M.L.; Tesfaye, W.; García-Parrilla, M.C.; Casas, J.A. y Troncoso, A.M. (2001). “Sherry wine vinegar: physicochemical changes during the acetification process”. *J Sci Food Aric* 81, 611-619.

<sup>284</sup> Véase referencia nº 4 página 3.

En cualquier caso existen dos procedimientos de envejecimiento en madera, el denominado como crianza estática y el de crianza dinámica.

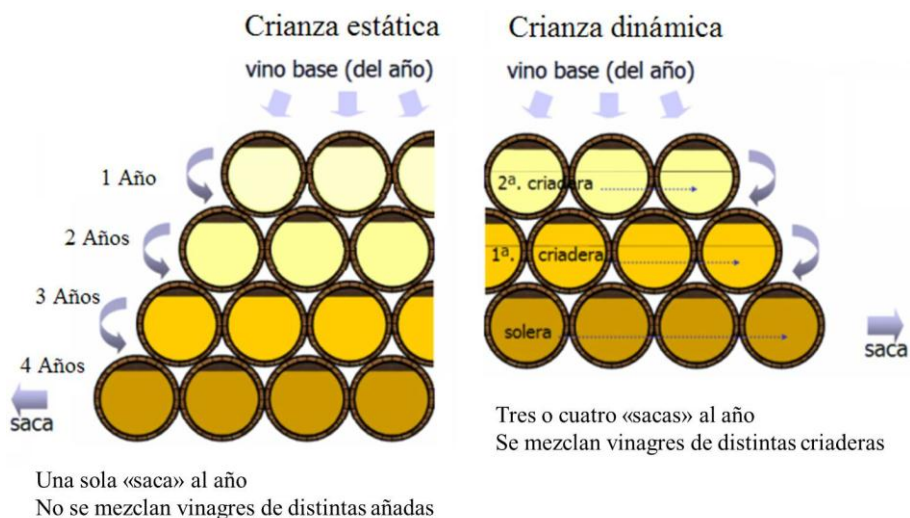


Figura II.4.2. Sistemas de envejecimiento.

El sistema de envejecimiento de “añadas” es el denominado como crianza estática, en el cual se deja el vinagre en la bota hasta que finaliza su proceso de crianza.

El sistema de envejecimiento de criaderas y solera (ver figura II.4.2.) es un sistema dinámico de crianza y está compuesto por una serie indeterminada de botas, normalmente de roble americano, agrupadas en filas horizontales o escalas que, para el caso del envejecimiento del vinagre, puede oscilar entre tres y cinco. La escala que se encuentra a nivel del suelo se denomina “solera”; sobre ésta se encuentra la “primera criadera”, sobre ésta última se sitúa la “segunda criadera”, y así sucesivamente. De cada bota de la solera no se debe sacar más de un tercio de su volumen. El volumen retirado se repone con vinagre procedente de la primera criadera, y así sucesivamente. Los trasvases así realizados se denominan “sacas” y “rocíos”.

<sup>285</sup> Véase referencia nº 28 página 14.

<sup>286</sup> Véase referencia nº 29 página 14.

En primer lugar, se realiza la “saca” de la escala “solera”; en segundo lugar, se realiza la “saca” de la “primera criadera” en un depósito para homogenizar el producto y, posteriormente, se “rocía” la escala de solera; en tercer lugar, se realiza la “saca” de la “segunda criadera”, se homogeniza y se completa el volumen de la “primera criadera”; y así sucesivamente hasta llegar a la criadera superior cuyo volumen se completa con vinagre del año. El vinagre de mayor envejecimiento se encuentra en la solera y la edad del vinagre disminuye conforme se asciende en las filas.

Dependiendo de la bodega, estas operaciones se realizan con una periodicidad diferente. El vinagre que se saca de cada escala se reparte entre las botas de la escala inferior para obtener un producto homogéneo. La aireación que se produce con estas operaciones es mayor que el existente en el método de crianza estática. Mediante este sistema de envejecimiento no se puede determinar la edad exacta de un vinagre y sólo se puede hablar de una edad media.

#### **II.4.5. Filtración.**

La operación de filtración es una etapa de gran importancia para garantizar la calidad y aspecto final del producto<sup>287</sup>.

Hay tres grados de filtración según el diámetro de las partículas retenidas:

- Filtración de desbaste, se separan partículas de diámetro superior a 10 micras.
- Filtración de profundidad o abrillantamiento, se retienen partículas cuyo diámetro se encuentra entre 1 y 10 micras.
- Filtración esterilizante o estabilizante, retiene partículas con un diámetro inferior a 1 micra y es la llamada microfiltración.

El tiempo empleado para la operación de filtración del vinagre depende del tamaño de las partículas en suspensión a retener así como de que se siga un procedimiento de filtración normal o bien una filtración tipo tangencial.

---

<sup>287</sup> Véase referencia nº 1 página 3.

Aunque cada vez menos empleada, en el caso de una filtración normal el flujo de alimentación sigue la misma dirección y sentido que el líquido filtrado; esto obliga al uso de coadyuvantes de filtración, por ejemplo tierra de diatomeas, para evitar el colapso del lecho filtrante.

Por otro lado, en el caso de una filtración tangencial, la suspensión que se alimenta al filtro circula por una cámara totalmente inundada y en contacto, de modo tangencial, a la superficie de la membrana. La existencia de una sobrepresión en dicha cámara, respecto a la existente en el otro lado de ésta, fuerza a que una parte del líquido atraviese la membrana. El tipo de flujo empleado no permite la acumulación de sólidos sobre la membrana, lo que implica que no es necesario el empleo de coadyuvantes de filtración dado que los sólidos son continuamente arrastrados por la corriente que circula a través del sistema. Dependiendo del tamaño de poro de la membrana, se pueden conseguir retener desde células de microorganismos hasta compuestos disueltos como por ejemplo, sales tampón. Las múltiples ventajas que presenta este tipo de filtración<sup>288</sup> hacen que, como ya se ha comentado, se esté imponiendo como procedimiento a emplear.

### **II.4.6. Estabilización.**

La etapa de estabilización se realiza sobre los vinagres para mantener sus características físicas, químicas y organolépticas. Esta etapa se puede realizar por métodos físicos o químicos.

Los métodos físicos no implican ninguna adición de sustancias extrañas al vinagre: son métodos de pasteurización, refrigeración o filtración. Por otro lado, en los métodos químicos se adicionan algunas sustancias que modifican, directa o indirectamente, la calidad del vinagre.

La pasteurización consiste en un tratamiento térmico para destruir las bacterias e inactivar las enzimas que puedan causar alteraciones posteriores en el vinagre. El tratamiento puede ser largo a baja temperatura o corto a alta temperatura; el intervalo de la temperatura oscila entre 50 a 85 °C. El pasteurizador debe estar construido en acero inoxidable resistente a la agresividad del vinagre dado que ésta se potencia con la temperatura.

---

<sup>288</sup> Koch Membrane Systems <http://www.kochmembrane.com>.

La filtración estabilizante se realiza para eliminar las partículas de diámetro inferior a 1 micra porque proporciona riesgo de inestabilidad en el producto. Esta operación necesita del empleo de membranas cuyo poro puede ser de hasta 0.45 micras.

El único método químico autorizado para la estabilización del vinagre es la adición de anhídrido sulfuroso, cuya dosis máxima permitida por la reglamentación es  $170 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>289</sup> expresado como anhídrido sulfuroso total. A pesar de que la acción antiséptica es eficaz con concentraciones del orden de  $5\text{-}10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , normalmente se dosifica del orden de  $100\text{-}150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  debido a la transformación del anhídrido sulfuroso durante el periodo de maduración del vinagre. El anhídrido sulfuroso se puede añadir en estado gaseoso o bajo la forma de metabisulfito potásico.

La reglamentación también autoriza la adición de ácido cítrico como antioxidante, la dosis máxima es de  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

### **II.4.7. Envasado.**

El envasado también es muy importante para mantener las características del vinagre, ya que hay que mantener la calidad hasta que llegue al consumidor.

El envase de vidrio ofrece ventajas para la presentación del vinagre, pero se ha extendido el uso de botellas fabricadas de material plástico.

---

<sup>289</sup> Real Decreto 2070/1993, de 26 de noviembre, BOE 8 de diciembre 1993, núm. 293, pág. 34764. Ministerio de la Presidencia; “Vinagre. Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración y comercialización”.



## II.5. IMPORTANCIA DE LA INDUSTRIA DE FABRICACIÓN DE VINAGRE.

La importancia de la industria española de fabricación de vinagre podemos apreciarla a partir de la información que sigue, suministrada por la Asociación de Fabricación de Vinagre de España. Cabe destacar, que a pesar de que la mayor parte de la producción mundial de vinagres no procede del vino, dada la larga y sólida tradición vitivinícola de nuestro país, el vinagre de vino es el mayoritariamente producido en España.

España es el segundo miembro de la Unión Europea en relación a la producción y comercialización de vinagre de vino, sólo precedido por Italia. A notable distancia, se encuentran Francia, Alemania y, aún más alejados, Portugal, Polonia y Finlandia.

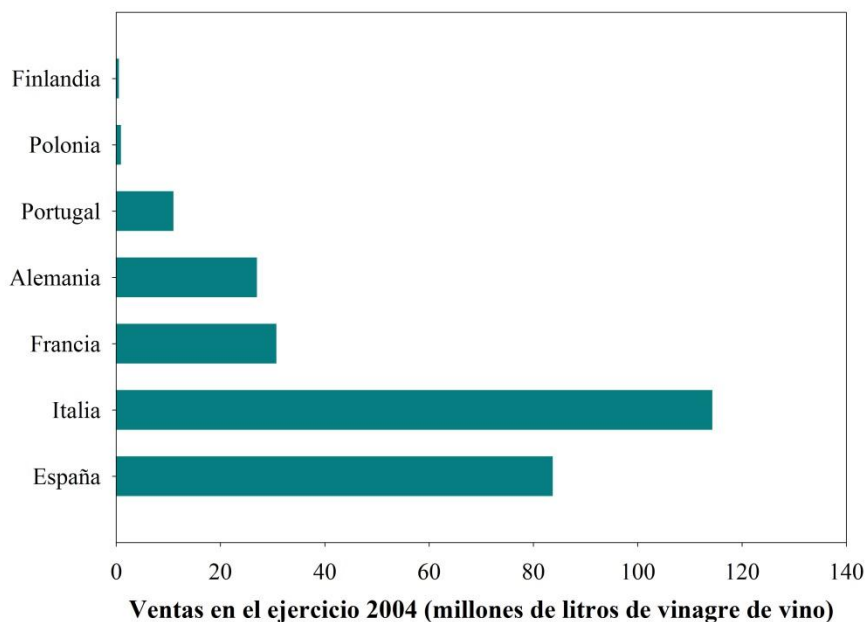


Figura II.5.1. Ventas de Vinagre de vino en la Unión Europea en el año 2004.

En el año 2004, se exportaron desde España un total de veinte millones de litros de vinagre, cifra muy similar a la existente en el año 2003. La Unión

Europea exportó dicho año un total de 40 millones de litros, lo que sitúa a España como responsable del 50 % del total exportado.

Si se analiza la evolución de ventas, datos hasta final de noviembre de 2005, se observa un aumento de casi un 15 % en volumen de exportación<sup>290</sup>.

Tabla II.5.1. Comercialización de “vinagres de vino” en el ejercicio 2004.

PAIS	VENTAS	IMPORTACIÓN	EXPORTACIÓN
Italia	114.335.000 L	36.274.000 L	46.674.000 L
España	83.705.000 L	3.685.000 L	17.162.000 L
Francia	30.736.000 L	8.484.000 L	8.674.000 L
Alemania	26.992.000 L	12.487.000 L	1.870.000 L
Portugal	10.906.000 L	825.000 L	1.945.000 L
Polonia	937.000 L	1.226.000 L	8.000 L
Finlandia	516.000 L	403.000 L	7.000 L
Dinamarca		99.622.000 L	38.000 L
Reino Unido		5.966.000 L	244.000 L
Austria		3.752.000 L	210.000 L
Holanda		2.831.00.0 L	256.000 L
Bélgica		1.213.000 L	1.506.000 L
Hungría		41.000 L	
Total U. E. (25 Estados)	286.302.000 L (Estimación)	768.000 L (Procedente de Terceros Países)	39.529.000 L (Con destino a Terceros Países)
Datos elaborados por la “Asociación española del vinagre”. Fuente: Eurostat.			

La Federación Española del Vino publica todos los años desde 1996 un anuario en el cual se indica, entre otros datos, el volumen total de producción de vino en los viñedos y el volumen dedicado exclusivamente para la elaboración de vinagre de vino. Véanse las figuras siguientes:

<sup>290</sup> Puyó, R. (2006). “La comercialización de los vinagres españoles: versatilidad y posibilidades del gremio del millón de hectolitros”. Eds: García-García, I. Second Symposium on R+D+I for Vinegar Production, pp. 285-295. Córdoba, España.

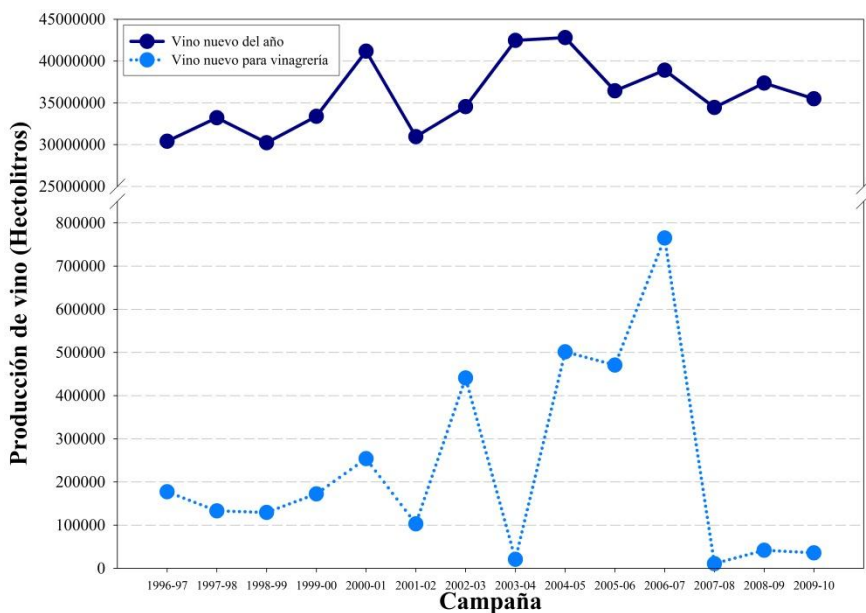


Figura II.5.2. Producción de vino nuevo y dedicación para vinagería en España (Datos obtenidos a partir de los “Anuarios de la Federación española del vino”).

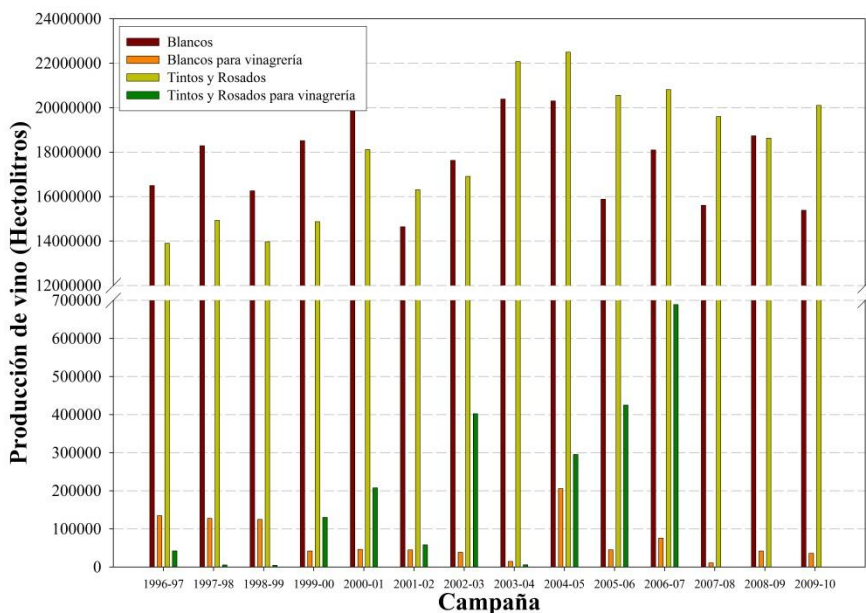


Figura II.5.3. Producción en España de vinos blancos, tintos y rosados y su dedicación para vinagería (Datos obtenidos a partir de los “Anuarios de la Federación española del vino”).

Se observa como el porcentaje de vino nuevo del año dedicado para la industria vinagrera ha aumentado en las diversas campañas, siendo superior el aumento en vino tinto y rosado frente al vino blanco. Si bien, es importante observar como esta tendencia ha variado durante las últimas campañas debido a la situación económica existente.

Un aspecto muy importante a destacar es la evolución de la importancia económica de los vinagres con denominación de origen, tal y como se muestra en la figura siguiente.

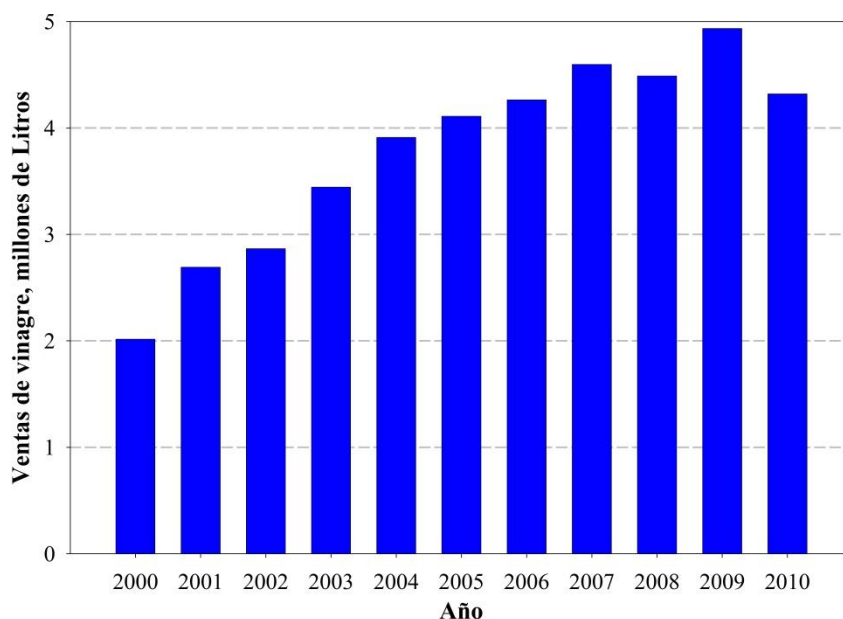
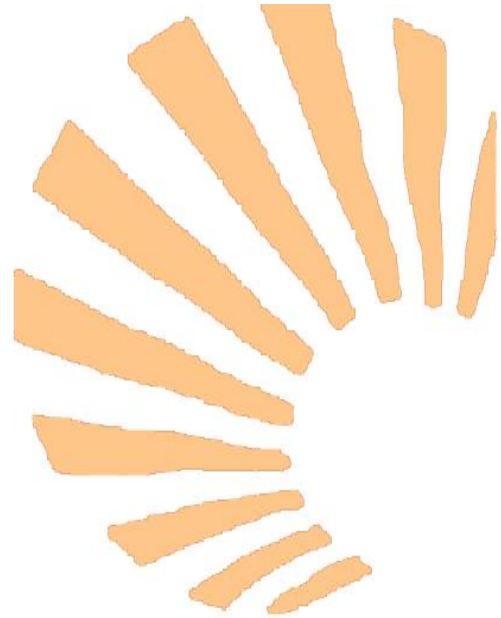


Figura II.5.4. Ventas de vinagre con denominación de origen de Jerez (Datos obtenidos a partir del Consejo regulador).

Por suerte, las ventas de vinagre de dicha denominación de origen reconocida se han duplicado en la última década, aunque también se observa un estancamiento en su volumen de ventas en los últimos años.





## **CAPÍTULO III**

# **HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y CONCLUSIONES – CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS**



## **MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS ACÉTICAS VIABLES Y NO VIABLES.**

### **III.1. Introducción.**

El problema de la cuantificación de microorganismos ha sido y es objeto continuo de estudio dada su importancia en diferentes contextos como, fundamentalmente, son los de tecnología de la fermentación, práctica médica y evaluación medioambiental. En concreto, la determinación de la concentración celular es una variable clave para evaluar velocidades y rendimientos en cualquier bioproceso. Se han desarrollado numerosos métodos dependiendo de que se consideren las propiedades ópticas, electroquímicas, bioquímicas o físicas de los microorganismos. En la tabla III.1.1. se presenta una síntesis de los principales métodos que se han considerado.

En Hobson y col. (1996)<sup>291</sup> se puede encontrar un resumen de los fundamentos de cada método y de sus ventajas e inconvenientes.

Es difícil encontrar un método totalmente satisfactorio para evaluar el contenido microbiano de un medio dada la variedad de entornos en los que podemos encontrarlos así como por las diferencias existentes entre los propios microorganismos en sí. Así por ejemplo, la medida del peso seco no puede emplearse cuando no es posible conseguir, previamente, una separación completa de las células del resto de componentes que constituyen el medio de cultivo.

En general, entre algunos de los principales inconvenientes que se suelen encontrar, dependiendo del método, están los largos tiempos de respuesta, la falta de sensibilidad, los altos costos instrumentales y operativos, y la alta especialización necesaria en algunos casos. En cualquier caso, aunque los métodos clásicos, basados en la medida de la masa o número de células siguen vigentes, cada día son más importantes los métodos basados en la medida de componentes celulares tales como, por ejemplo, el ADN. En este sentido, las técnicas de PCR, a pesar de ser caras y necesitar de personal especializado, han demostrado su alta sensibilidad y potencialidad para este fin.

---

<sup>291</sup> Hobson N.S.; Tothill, I. y Turner, A.P.F. (1996). "Microbial detection". *Biosensors & Bioelectronics* 11(5), 455-477.



Tabla III.1.1. Clasificación de diferentes métodos para la determinación de la concentración celular.

Métodos no bioelectroquímicos	Métodos convencionales
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peso seco</li> <li>• Conteo de viables</li> <li>• Turbidez</li> </ul>
	Técnicas especiales
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Microcalorimetría</li> <li>• Filtración-Epifluorescencia</li> <li>• Anticuerpos fluorescentes</li> <li>• Radiometría</li> <li>• Bioluminiscencia</li> <li>• Coulter counter</li> <li>• Análisis electrónico de partículas</li> <li>• Membrana piezoeléctrica</li> <li>• Densitometría de resonancia acústica</li> <li>• Micro-Elisa</li> <li>• Microscopía electrónica</li> <li>• Nefelometría</li> <li>• Espectroscopía</li> </ul>
Métodos bioelectroquímicos	Detección de componentes celulares
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ácidos nucleicos</li> <li>• Proteínas</li> <li>• Lípidos y sus derivados</li> <li>• Carbono celular y fosfato</li> <li>• Enzimas metabólicas</li> </ul>
Métodos bioelectroquímicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Impedancia y conductividad</li> <li>• Potenciometría</li> <li>• Célula de combustible</li> <li>• Voltametría cíclica</li> <li>• Amperometría</li> </ul>

### III.2. Objetivo.

Pues bien, en el contexto del estudio del proceso de elaboración de vinagre, y además, con vistas a su modelización, es fundamental disponer de una medida de la concentración de células totales y viables. El método a emplear debería ser un método rápido, que pueda ser sistematizado en el contexto de un trabajo de laboratorio y aplicado por personas de diversas especialidades y para diferentes objetivos.

Tras evaluar las diversas alternativas, se decidió estudiar la posibilidad de integrar dos técnicas como son la del conteo directo al microscopio,

empleando una cámara de Neubauer de profundidad especial (0.02 mm), junto con el uso de fluorocromos que permitan discernir entre células viables y no viables.

Este tipo de cámaras de conteo para el microscopio, por su baja profundidad, permite la determinación directa de bacterias al estar éstas situadas en un único campo de visión. Si, además, se dispone de un microscopio de fluorescencia, se podría evaluar simultáneamente no sólo las células totales, sino también las viables y no viables. Pues bien, esta alternativa no había sido descrita previamente.

### III.3. Fundamentos.

Como se sabe, los ensayos de conteo directo para evaluar la viabilidad de bacterias o bien se basan en aspectos metabólicos o bien dependen de la integridad de la membrana celular. Mientras que los métodos basados en los primeros sólo funcionan para un limitado subgrupo de bacterias<sup>292</sup>, los métodos relacionados con la integridad de la membrana suelen ser más habituales y tienen un mayor nivel de fluorescencia. En cualquier caso, ambos métodos son muy sensibles a las condiciones de crecimiento y de tinción.

El procedimiento empleado en este trabajo emplea el kit “The LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits” de Molecular Probes®<sup>293</sup>. La aplicación de este kit permite diferenciar la viabilidad de una población de bacterias en base a la integridad de la membrana celular. En concreto, células que tengan dañada la membrana, y que de este modo se consideran muertas, emiten fluorescencia roja, mientras que las que no, lo hacen en verde<sup>294, 295</sup>.

El ensayo posee una serie de ventajas entre las que se cabe destacar las siguientes:

- Fácil aplicación. Tras algunos minutos después de la mezcla de los reactivos con la suspensión bacteriana se puede realizar el análisis.

---

<sup>292</sup> LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits. L-7012 for microscopy and quantitative assays. Molecular Probes. Link a fecha 23/11/2012: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes.html>.

<sup>293</sup> Véase referencia nº 292 página 83.

<sup>294</sup> Lloyd, D. y Hayes, A.J. (1995). “Vigour, Vitality and Viability of Microorganisms”. FEMS Microbiol Lett 133, 1-7.

<sup>295</sup> Millard, P.J., Roth, B.L. y Kim, C.H. (1997). “Fluorescence-Based Methods for Microbiol Characterization and Viability Assessment”. Biotechnol Intl 1, 273-279.

- Especificidad. Las bacterias emiten fluorescencia en diferente color en función de que estén vivas o muertas, incluso si se está evaluando una mezcla de diversas bacterias.
- Reproducibilidad. Suministra resultados reproducibles.
- Validez. Normalmente, los resultados obtenidos son consistentes con los obtenidos por otros métodos.
- Versatilidad. Las bacterias pueden ser teñidas tanto en suspensión como inmovilizadas sobre membranas.

El método implica el uso de dos sustancias que se unen a los ácidos nucleicos y que emiten la fluorescencia referida. Los compuestos son el SYTO 9<sup>®</sup> e ioduro de propidio. Una proporción adecuada de ambos reactivos permite la “tinción” de, prácticamente, todas las bacterias dejando el fondo sin fluorescencia, de este modo se pueden diferenciar con relativa facilidad a éstas.

El método se basa en la propiedad de ciertos compuestos de emitir fluorescencia cuando contactan con determinadas biomoléculas de las células y son adecuadamente excitados. En el caso que nos ocupa, las biomoléculas hacia las que están dirigidos estos marcadores son los ácidos nucleicos, en concreto el ADN.

En este caso, como se ha indicado previamente, se usan dos compuestos: SYTO9 e ioduro de propidio. Si el compuesto SYTO9 se une al ADN emitiría una fluorescencia verde mientras que si lo hiciera el ioduro de propidio, ésta sería roja.

Pues bien, células con su membrana plasmática intacta impiden que el ioduro de propidio pase al interior de la célula, y de esta forma, que se emita una fluorescencia roja cuando se unieran al ADN. Sin embargo, la permeabilidad de la membrana al compuesto SYTO9, no impide, aunque ésta esté intacta, que éste llegue a las moléculas de ADN y, así, obtener una fluorescencia verde si se lleva a cabo la excitación adecuada.

Aunque la cuestión es bastante compleja y puede implicar muchos aspectos relativos a lo que se entiende por célula viva o muerta<sup>296</sup>, la suposición básica es que aquellas células que tienen alterada su membrana, de forma que

---

<sup>296</sup> Roszak, D.B. y Colwell, R.R. (1987). “Survival Strategies of Bacteria in the Natural Environment”. *Microbiological Reviews* 51(3), 365-379.

sean incapaces de impedir el paso del yoduro de propidio, se consideran definitivamente muertas<sup>297</sup>.

El yoduro de propidio posee dos cargas positivas que impiden que la molécula penetre en el interior de células con membrana intacta<sup>298</sup>. En la siguiente figura se puede observar la estructura de esta molécula

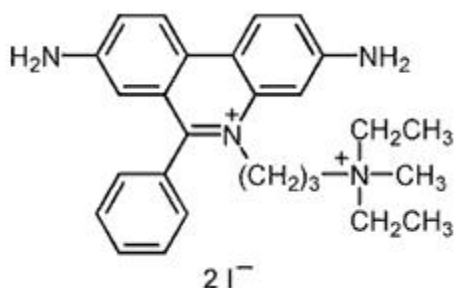


Figura III.3.1. Estructura de la molécula de yoduro de propidio.

Igualmente, en la siguiente figura se puede ver su espectro de absorción y emisión de fluorescencia

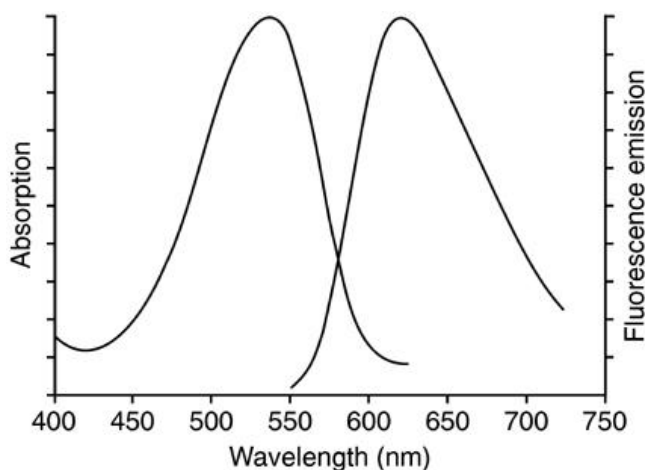


Figura III.3.2. Espectro de absorción y de emisión de la molécula de yoduro de propidio.

<sup>297</sup> King, M.A. (2000). "Detection of dead cells and measurement of cell killing by flow cytometry". *Journal of Immunological Methods* 243, 155-166.

<sup>298</sup> Shapiro, H.M. (1995). "Parameters and probes". In: "Practical Flow Cytometry", 3rd Edition. Wiley, New York, p. 229.

Por otro lado, el compuesto SYTO9 pertenece al grupo de los colorantes sintéticos denominados, de forma no sistemática, como cianinas. En concreto, la denominación SYTO9 corresponde a un compuesto registrado por Molecular Probes<sup>299</sup>. En la siguiente figura se puede observar su espectro de excitación-emisión:

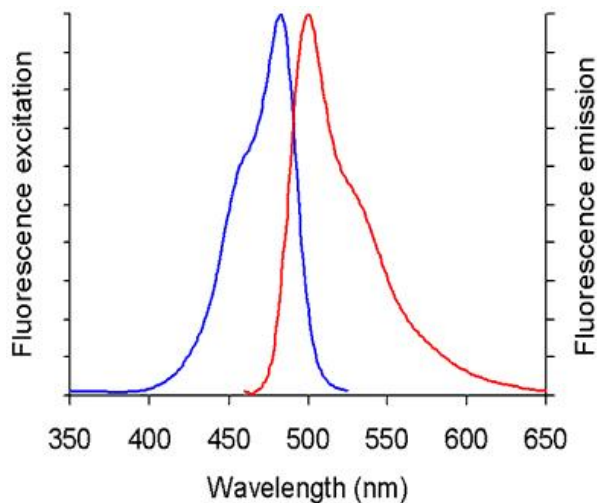


Figura III.3.3. Espectro de absorción y de emisión de la molécula de SYTO9.

Tatikolov<sup>300</sup>, ha realizado una excelente revisión sobre el uso de estos compuestos como sondas fluorescentes cuando interactúan con biomacromoléculas.

De estructuras complejas, en las siguientes figuras, sólo a modo de ejemplo, se pueden observar algunas de las más importantes:

---

<sup>299</sup> <http://www.lifetechnologies.com/global/en/home.html>.

<sup>300</sup> Tatikolov, A. S. (2012). "Polymethine dyes as spectral-fluorescent probes for biomacromolecules". *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 13(1), 55-90.

a) Cianinas simétricas:

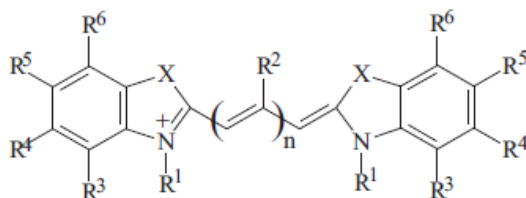


Figura III.3.4. Estructura de cianina compleja.

b) Tricarboxicianinas con sustituyentes en la cadena metínica:

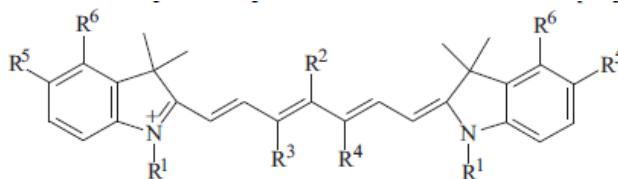


Figura III.3.5. Estructura de tricarboxicianinas con sustituyentes en la cadena metínica.

c) Cianinas asimétricas:

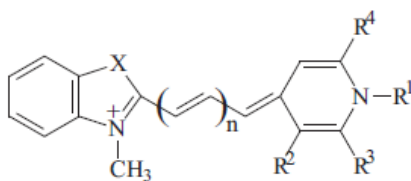


Figura III.3.6. Estructura de cianina asimétrica.

Dependiendo de la naturaleza de los grupos sustituyentes, se llega a una amplia gama de compuestos que, basándose en sus propiedades foto-físicas y foto-químicas encuentran diversas aplicaciones en ciencia y tecnología<sup>301</sup>. Presentan unos valores altos de coeficientes molares de absorción dentro de un amplio espectro de longitudes de onda, desde 400 hasta 800 nm. Su fluorescencia aumenta, entre otras situaciones, cuando están en presencia de biomoléculas. La interacción con los biocompuestos puede ser mediante el

<sup>301</sup> Mishra, A., Behera, R.K., Behera, P.K., Mishra, B.K. y Behera, G.B. (2000). "Cyanines during the 1990s: A Review". Chem Rev 100(6), 1973-2012.

establecimiento de enlaces covalentes y no covalentes. Mientras que los primeros se buscan cuando se desea realizar el seguimiento de biomoléculas específicas dentro de sistemas biológicos, los segundos se usan para analizar y detectar biomoléculas en dichos sistemas. En el contexto en el que nos encontramos, se busca una interacción electrostática con la biomolécula más que un enlace químico fuerte como sería el covalente.

La interacción no covalente de estos colorantes con moléculas de ADN ha sido estudiada en muchos trabajos<sup>302</sup>. La carga negativa que poseen las moléculas de ADN debido a los grupos fosfato interaccionan con las cargas positivas que tienen las cianinas. De este modo, son posibles dos tipos de unión: intercalación entre pares de bases (Figura III.3.7a) y unión en las ranuras menores de la hélice del ADN (Figura III.3.7b).

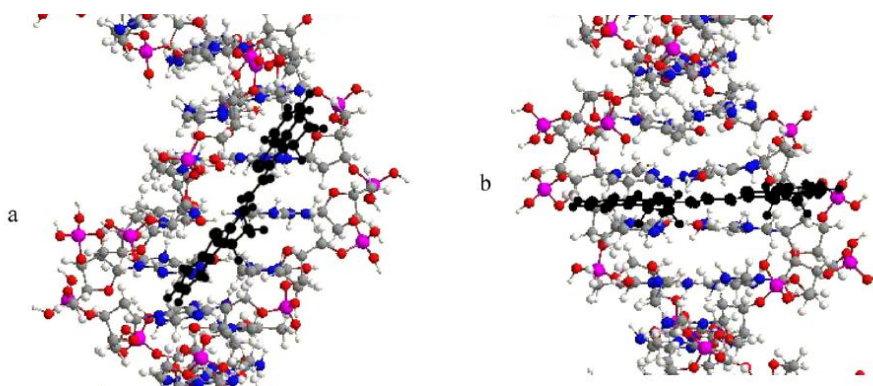


Figura III.3.7. Esquemas de unión covalente de ADN: (a) unión entre pares de bases de una molécula de ADN y (b) unión en las ranuras menores de la hélice de ADN, tomando como ejemplo una molécula de color negro.

Finalmente y como se ha referido más arriba, se ha de indicar que para estudios muy focalizados hacia aspectos microbiológicos y bioquímicos básicos, se han de tener muy presentes los inconvenientes del método<sup>303</sup>. En concreto, es posible que bacterias con su membrana dañada pudieran recuperarse y reproducirse, estas bacterias habrían sido consideradas como no viables por el método. Por otro lado, bacterias con su membrana intacta podrían ser incapaces de reproducirse y el método las contabilizaría como viables. Por lo tanto, para estudios básicos sobre microbiología y bioquímica en los que estos inconvenientes no fueran asumibles, el método debería complementarse con otros procedimientos, por ejemplo de medida de actividad enzimática, potenciales redox, etc. En general, cuando se requiere un alto nivel de seguridad

---

<sup>302</sup> Véase referencia nº 302 página 86.

<sup>303</sup> Véase referencia nº 296 página 84.

sobre las conclusiones acerca de la viabilidad o no de microorganismos, no debe emplearse una única técnica para su evaluación.

En resumen, mediante el empleo de la técnica de conteo directo al microscopio, usando una cámara de Neubauer de profundidad especial, junto con el uso de fluorocromos, se pretende desarrollar un método que permita una determinación rápida de la concentración de bacterias viables y no viables en el contexto de la acetificación de vino para la elaboración de vinagre.

#### III.4. Metodología.

Para la aplicación del método es necesario el siguiente material:

- Microscopio de contraste de fases con un objetivo de inmersión (ver Figura III.4.1.).
- Cámara de Neubauer de 0.02 mm de profundidad y una superficie de conteo de 0.0025 mm<sup>2</sup> (véase Figura III.4.2.).
- Cubreobjetos.
- Aceite de inmersión.
- Tubos de 10 mL.
- Microtubos de 1 mL.
- Pipeta semiautomática de volumen variable de 10 µL.
- Pipeta semiautomática de volumen variable de 1000 µL.
- Kit de viabilidad LIVE/DEAD<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup> (L-7012)<sup>304</sup>.
- Disolución de ácido clorhídrico 0.1 N.
- Agua destilada.

Por otro lado, son necesarios los fluorocromos. Tal como se ha indicado previamente, se utiliza el kit “LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits” de Molecular Probes<sup>®</sup><sup>305</sup>.

---

<sup>304</sup> Véase referencia nº 292 página 83.

<sup>305</sup> Véase referencia nº 292 página 83.



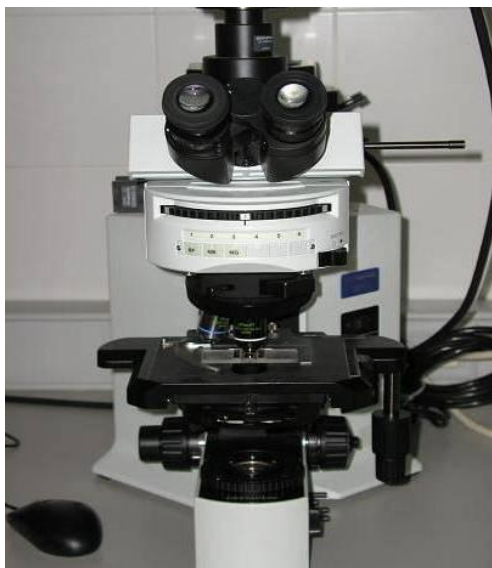


Figura III.4.1. Fotografía del microscopio óptico empleado.

El microscopio óptico, utilizado para la observación de las muestras, es de la firma OLYMPUS (modelo BX51/BX52) (ver Figura III.4.1.) con una cámara digital (modelo C-4040ZOOM) acoplada al microscopio.



Figura III.4.2. Cámara de Neubauer empleada para realizar el recuento de células y cuadrado grande central de la cámara de Neubauer.

La cámara de Neubauer es una cámara de recuento que se utiliza para determinar el número de partículas por unidad de volumen en una suspensión microbiana. Las partículas se cuentan visualmente con un microscopio.

La placa base en vidrio óptico especial tiene el tamaño de un portaobjetos. En el campo central están grabadas dos cuadrículas de recuento separadas una de otra por una ranura. La cámara que se usa tiene una profundidad especial de 0.02 mm. El fondo de la cámara actúa de espejo por el

recubrimiento con rodio. La cuadrícula está grabada en la capa de rodio y aparece clara con ajuste normal del microscopio.

Como se observa en la figura anterior, el cuadrado grande central está dividido en 25 cuadrados medianos con lados de 0.2 mm. El volumen total correspondiente a estos 25 cuadrados es de 0.00002 ml. Normalmente, se cuentan los 5 cuadrados de la diagonal, se calcula la media ( $X$ ) de células por cuadrado, se multiplica por 25 cuadrados y finalmente se divide por el volumen total. De este modo se tiene la concentración de células por ml de medio:

$$X \text{ cel} \cdot (25/ 0.00002 \text{ ml}) = X \cdot 125 \cdot 10^4 \text{ cel/ml}$$

### III.5. Resultados y conclusiones.

Para la determinación de bacterias totales es necesaria una dilución previa de la muestra. Para ello se emplea una disolución de HCl en agua (60 % agua destilada y un 40 % de disolución de HCl 0.1 N) con el objetivo de reducir la movilidad de las bacterias. Se agita el tubo y se deja en reposo durante 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se vuelve a agitar y se disponen una muestra de esta suspensión sobre la cámara de Neubauer, se tapa la muestra con un cubre y se realiza el recuento en el microscopio con el objetivo 100X empleando luz visible. A modo de ejemplo, en la Figura III.5.1. se muestra una imagen de los resultados que se obtienen.

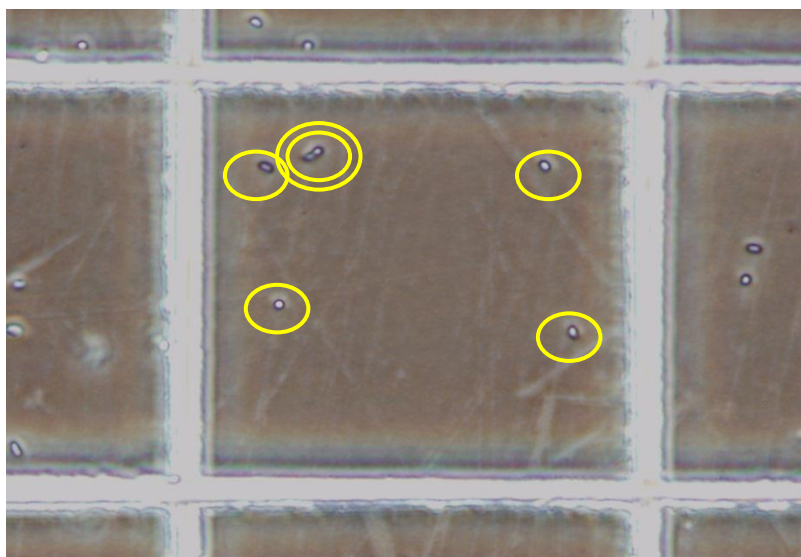


Figura III.5.1. Fotografía de un mini-cuadrado visto en el microscopio óptico.

Para la determinación de la concentración de bacterias viables, se diluye 1 mL de muestra con 5 mL de agua destilada. De esta dilución se toma 1 mL y se añade 1.5  $\mu\text{L}$  de cada uno de los reactivos del Kit de viabilidad LIVE/DEAD<sup>®</sup>, se mezcla bien y se deja en reposo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos para que se realice la tinción. Pasado dicho tiempo se cuenta en la cámara de Neubauer. En este caso, el conteo se tiene que repetir para cada uno de los dos filtros correspondientes: U-MNB2 y U-MNG2. Las bacterias teñidas de verde se consideran como viables y las bacterias teñidas de rojo como no viables. En la Figura III.5.2. se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos

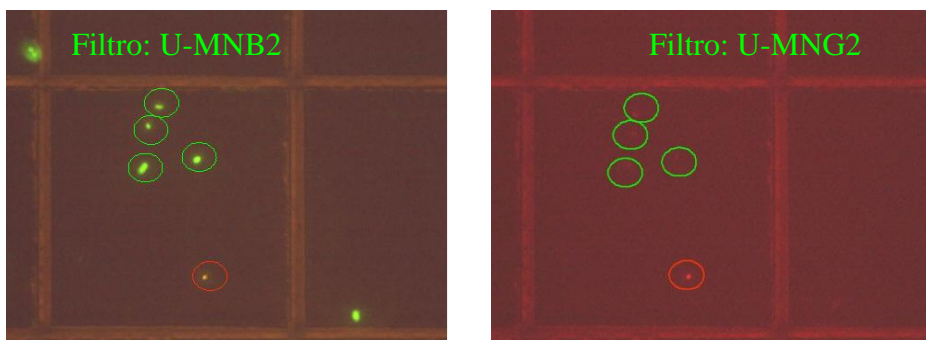


Figura III.5.2. Fotografía de un mini-cuadrado visto en el microscopio óptico con los filtros U-MNB2 y U-MNG2.

Por otro lado, se han realizado diferentes diluciones de la muestra para determinar el factor de dilución más adecuado, así como, la reproducibilidad de las mismas para la cuantificación de la concentración de bacterias totales.

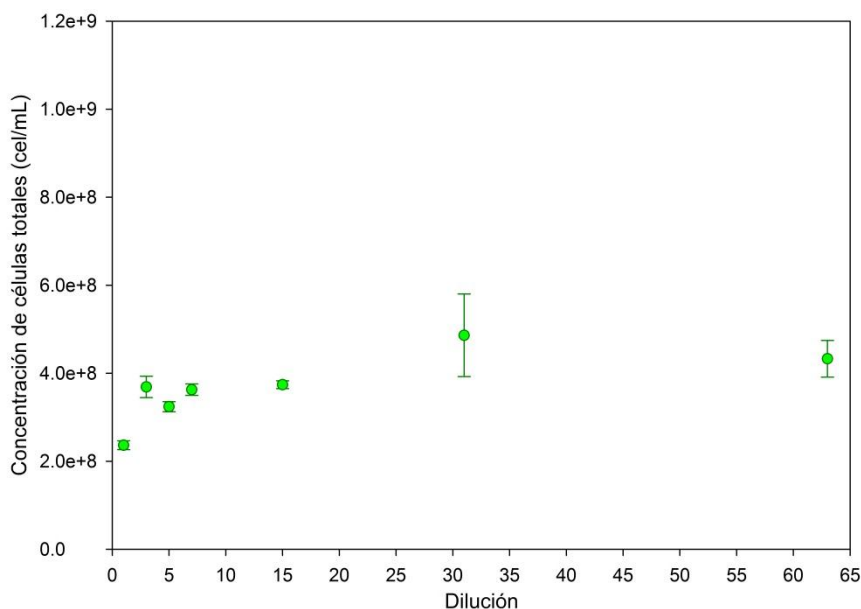


Figura III.5.3. Desviación estándar de la concentración de células totales empleando diferentes diluciones de una misma muestra mediante el método propuesto.

En la figura III.5.3. se muestra la influencia de la dilución sobre la concentración total de células. Las muestras se prepararon añadiendo varias cantidades de H<sub>2</sub>O/HCl 3/2 a 1 mL de medio del biorreactor hasta el volumen total mostrado en el eje horizontal. Cada muestra ha sido repetida cuatro veces; el error estándar se muestra sobre cada una de las diluciones estudiadas. Tal y como se puede observar, los errores no son significativos hasta valores de dilución de 64; mayores valores de dilución implican errores más altos. Basados en estos resultados se estima adecuada una dilución 1:5 para la determinación de la concentración de células totales.

El cálculo de la concentración de células totales (células·mL<sup>-1</sup>) se realiza según la siguiente expresión:

$$\text{Concentración de células totales} = \frac{\text{Bacterias contadas (células)}}{\text{Superficie (mm}^2\text{)} \cdot \text{Profundidad (mm)}} \cdot \text{Factor de dilución}$$

[Ec. III.5.1.]

Teniendo en cuenta que la superficie, la profundidad y el factor de dilución son valores conocidos y constantes, se puede resumir la expresión anterior como:

$$\text{Concentración de células totales (células}\cdot\text{mL}^{-1}\text{)} = \text{Bacterias contadas}\cdot 1.25\cdot 10^6$$

[Ec. III.5.2.]

El cálculo de la concentración de células viables (células viables $\cdot$ mL<sup>-1</sup>) se realiza de forma similar según la siguiente expresión:

$$\text{Concentración de células viables} = \frac{\text{Bacterias viables contadas (células)}}{\text{Superficie (mm}^2\text{)}\cdot\text{Profundidad (mm)}} \cdot \text{Factor de dilución}$$

[Ec. III.5.3.]

$$\text{Concentración de células viables (células viables}\cdot\text{mL}^{-1}\text{)} = \text{Bacterias viables contadas}\cdot 1.25\cdot 10^6$$

[Ec. III.5.4.]

Con el objetivo de comparar los resultados del método con los que se obtendrían con otros métodos, se ha realizado, inicialmente, una comparación con los obtenidos mediante el empleo de Citometría de Flujo (CMF).

Como se sabe, la Citometría de Flujo (CMF) es una técnica de análisis celular multiparamétrico en la que se hace pasar una suspensión de partículas alineadas (generalmente células) por delante de un haz de láser focalizado. La interacción de cada célula con el rayo de luz genera perturbaciones en éste que, adecuadamente medidas, suministran información sobre las partículas.

En nuestro caso, el citómetro se emplea para contar el número de eventos (bacterias acéticas) que pasan por el detector y discriminar cuáles de las mismas presentan coloración verde o roja. Aunque no podemos obtener la concentración de las mismas si se pueden emplear los resultados obtenidos para evaluar el porcentaje de bacterias viables presentes en el medio.

Se ha empleado un citómetro de flujo Beckman Coulter equipado con un láser de argón. En la emisión de fluorescencia se emplean dos filtros: FL1 a 525nm para el SYTO 9® y FL3 a 620 nm para el yoduro de propidio. Se trabaja a velocidad de flujo bajo.

El instrumento se ajustó para medir las siguientes señales, con amplificación logarítmica: dispersión frontal de luz láser (Log FS), como medida del tamaño de partícula y dispersión lateral de luz láser (Log SS), como medida del aspecto granular de las partículas.

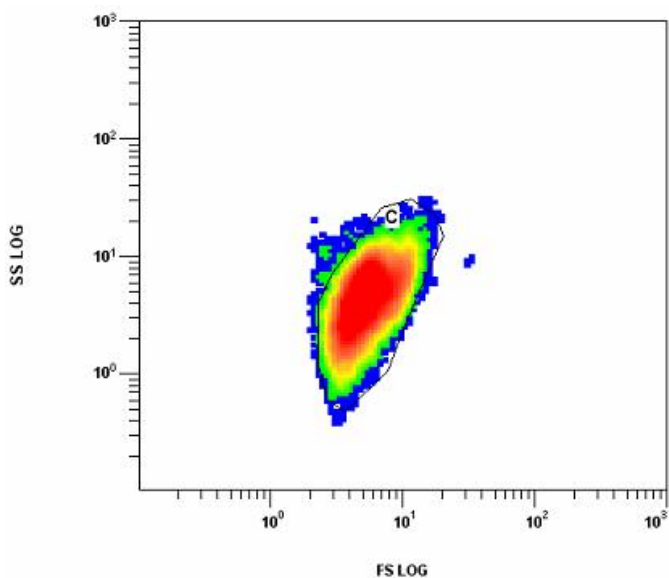


Figura III.5.4. Dispersión de los tamaños y granulometrías de las bacterias acéticas mediante citometría de flujo.

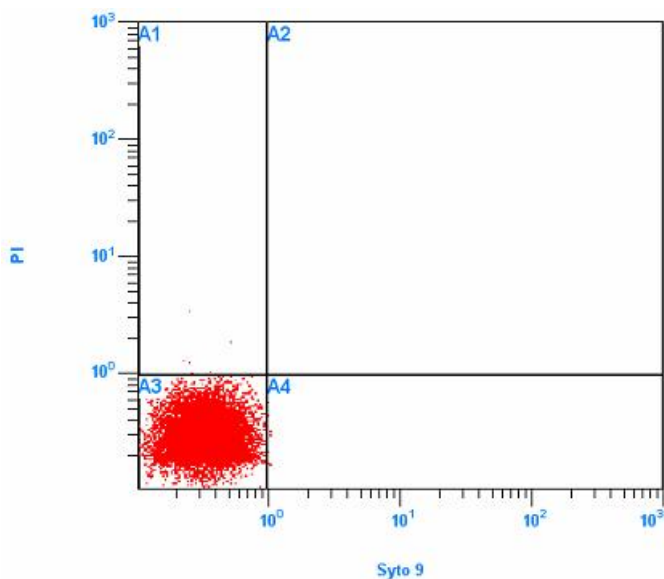


Figura III.5.5. Dispersión de las bacterias acéticas coloreadas con el kit LIVE/DEAD BackLight® mediante citometría de flujo.

Se han analizado 12 muestras por ambos métodos para realizar su comparación:

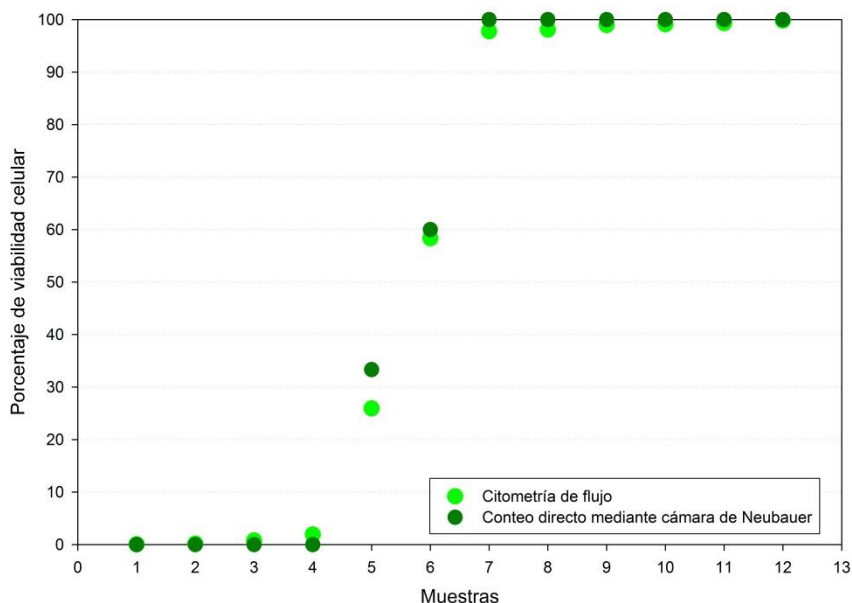


Figura III.5.6. Comparación entre el porcentaje de viabilidad determinado mediante el método propuesto con conteo directo empleando cámara de Neubauer y citometría de flujo.

Tal y como se muestra en la figura anterior, los porcentajes de viabilidad que se obtienen por ambos métodos son similares. La correlación lineal de los resultados, véase Figura III.5.7., presenta un coeficiente de regresión de 0.997. Por lo tanto, el método propuesto de conteo directo en cámara Neubauer, proporciona resultados fiables si se compara con otro método más automatizado y para el que se necesita un equipamiento costoso, como es la citometría de flujo.

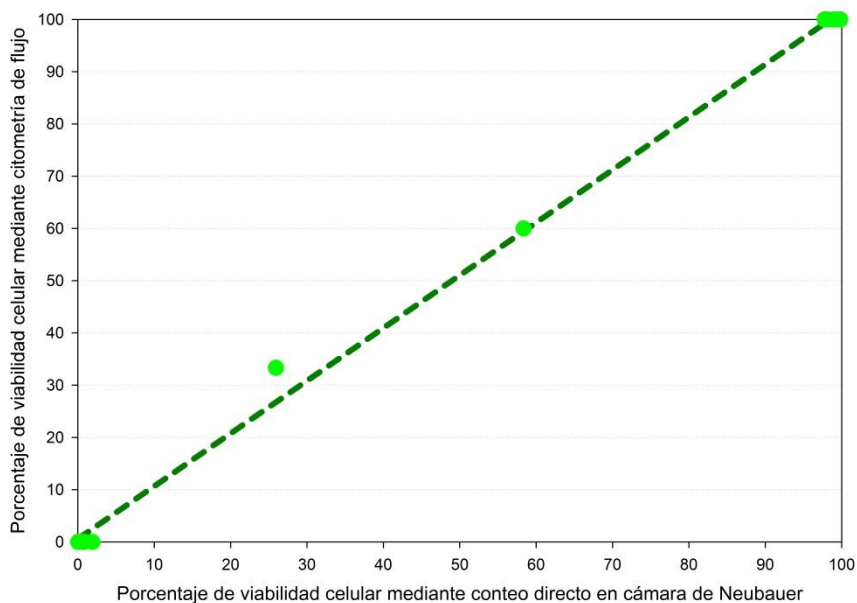


Figura III.5.7. Regresión de los datos obtenidos para el porcentaje de viabilidad determinado mediante el método propuesto con conteo directo empleando cámara de Neubauer y citometría de flujo.

También se ha realizado un estudio de cuantificación en placas que ha puesto de manifiesto, una vez más, las dificultades que se encuentran en el crecimiento de estos microorganismos sobre medios sólidos de cultivo.

Las bacterias acéticas han sido aisladas y cuantificadas en placas empleando 100  $\mu\text{L}$  de varias muestras a diferentes diluciones tomadas en distintas etapas del proceso empleando como medio sólido M10 (0.5 % extracto de levadura, 0.3 % peptona, 2.5 % manitol y 2 % agar), véase Figura III.5.8. Las placas son incubadas a 30 °C entre 2-7 días.



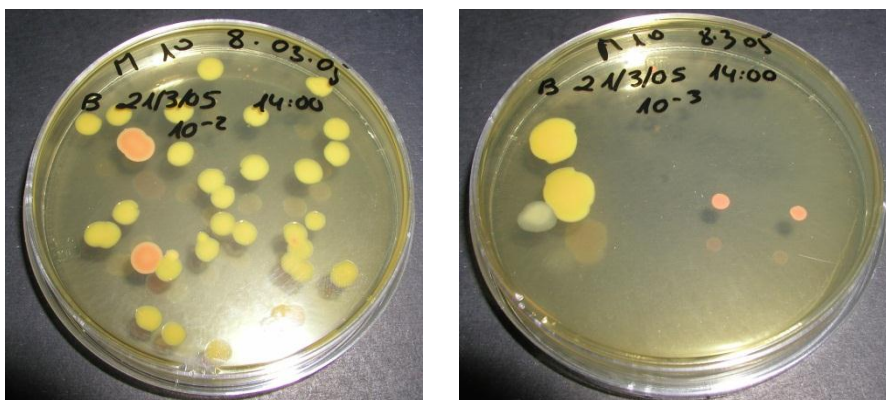


Figura III.5.8. Fotografía de colonias de bacterias acéticas sembradas en placas.

Se han tomado 16 muestras en unas condiciones de fermentación similares (aproximadamente a una concentración de ácido acético en torno a 5 % (m/v)), para todas ellas se han analizado la concentración de células totales mediante conteo directo en el microscopio utilizando el método propuesto en este trabajo y se ha realizado un cultivo en placa (empleando el medio M10) de las mismas para comparar los resultados obtenidos.

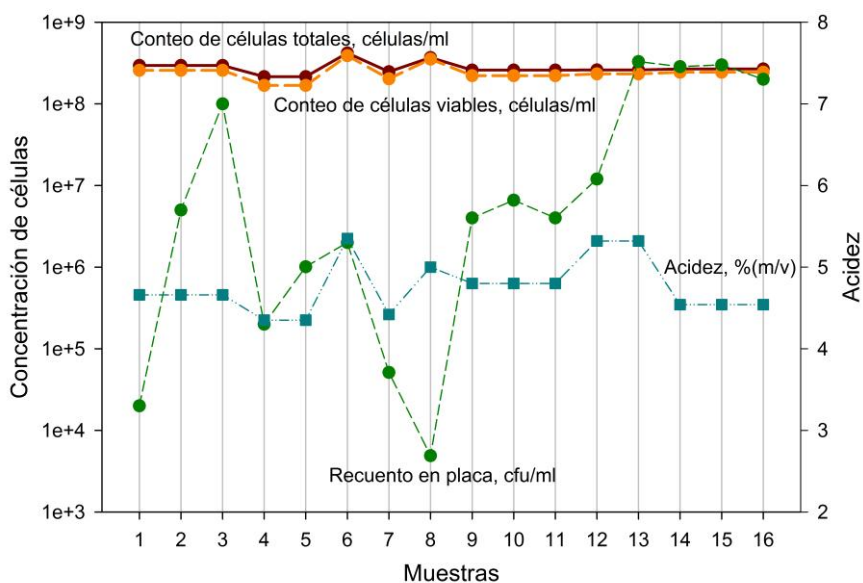


Figura III.5.9. Comparación entre recuento en placa y conteo directo en microscopio en la cámara de Neubauer.

Tal y como se observa en la gráfica anterior en algunos casos se obtienen resultados similares (muestras 13, 14, 15 y 16) aunque en el resto de las muestras en general se obtiene una diferencia de varios ordenes de magnitud en los resultados.

Finalmente, se ha aplicado el método propuesto para el seguimiento de la concentración de células totales y viables en un ciclo típico de acetificación de vino para evaluar su aparente consistencia.

Siguiendo un procedimiento operativo general, que se describe con más detalle en otras partes de esta memoria (capítulos V, VI, VII y VIII), se han realizado varios ciclos repetidos de acetificación de vino con las siguientes condiciones:

- Volumen descargado de 6 L (75 % del volumen total).
- Velocidad de carga de vino a  $2 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ .
- Concentración de etanol en la descarga de 2 % (v/v).
- Concentración de etanol del vino de alimentación de 12 % (v/v).
- Flujo de aire de alimentación  $7.5 \text{ L de aire}\cdot(\text{L medio}\cdot\text{h})^{-1}$ .

Se han tomado muestras a diferentes valores de tiempo para analizar tanto la acidez como la concentración de células viables en las condiciones empleadas.

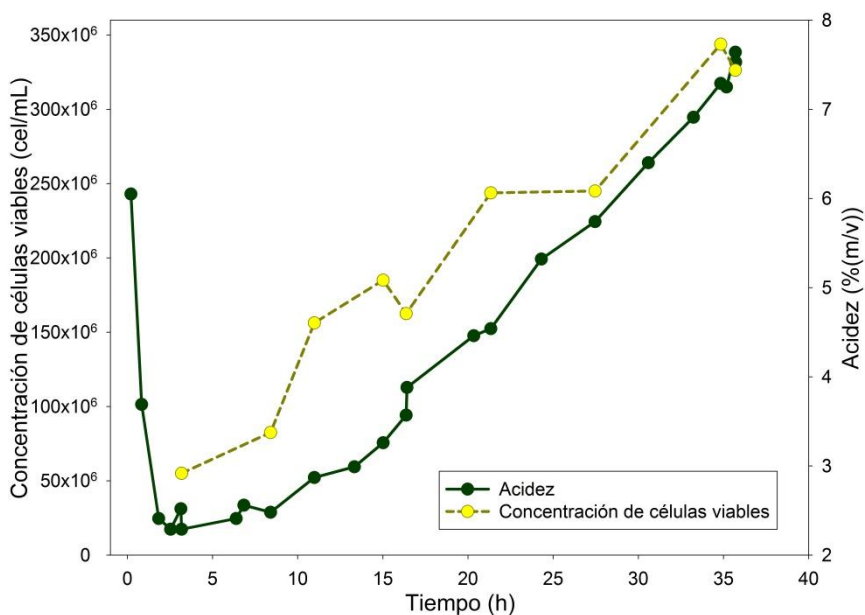


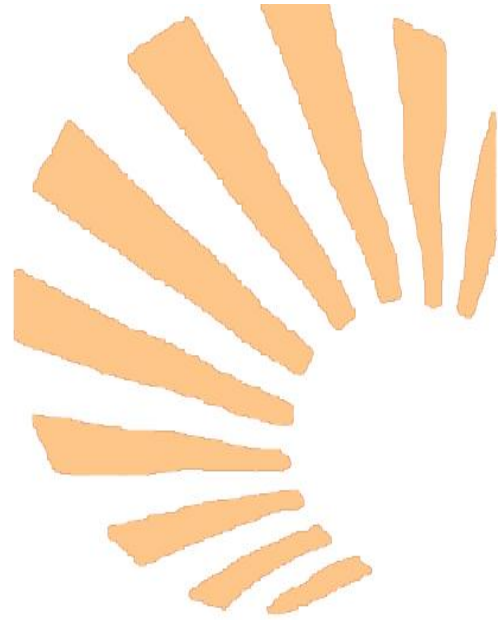
Figura III.5.10. Evolución de la acidez y concentración de células viables con respecto al tiempo para un ciclo de acetificación de vino.

La figura anterior muestra la evolución de la concentración de células viables medidas con el método propuesto y la concentración de ácido acético, a tiempo cero corresponde al inicio del periodo de carga.

Las células viables decrecen durante la etapa de carga debido al efecto de la dilución. Por otro lado, durante el ciclo se produce un crecimiento paulatino de las mismas como consecuencia de la renovación realizada del medio de cultivo. Como era de esperar, el aumento en la concentración de ácido acético sigue un patrón similar al de la concentración de células viables.

En definitiva, el método propuesto para evaluar y seguir la evolución de la concentración de bacterias totales y viables durante los ciclos de elaboración de vinagre tiene varias ventajas:

- Es fiable, rápido, fácil de aplicar y conduce simultáneamente a la determinación de tanto células totales como viables.
- Las muestras, además de la facilidad para su preparación, permiten una clara diferenciación entre los colores que discriminan a las células viables de las que, en principio, no lo son.
- El kit utilizado no produce fluorescencia del fondo, lo que ayuda a la diferenciación de las células.



## **CAPÍTULO IV**

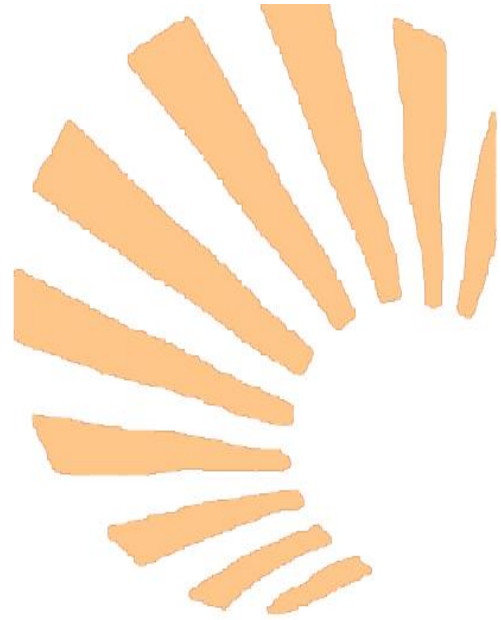
# **PUBLICACIÓN – CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS**



**IV.1. Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process.**

Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I.M., Cantero-Moreno, D., Barja, F., García-García, I. (2006). RAPID METHOD FOR TOTAL, VIABLE AND NON-VIABLE ACETIC ACID BACTERIA DETERMINATION DURING ACETIFICATION PROCESS. *Process Biochemistry*, 41, 1160-1164. ELSEVIER. ISSN: 1359-5113.





## **CAPÍTULO V**

# **HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y CONCLUSIONES – ESTIMACIÓN DE VELOCIDAD MEDIA**





## V.1. Introducción.

El proceso industrial de fabricación de vinagre de vino, suele seguir un modo semi-continuo de trabajo (ver Figura V.1.1) en el que, periódicamente, se descarga una fracción del volumen total de un cultivo sumergido<sup>306, 307, 308, 309, 310, 311</sup>, el volumen restante actúa de inóculo para el siguiente ciclo, añadiéndose poco a poco vino fresco hasta alcanzar el volumen final de trabajo. Este modo de trabajo implica una variación con el tiempo de las propiedades del medio de cultivo en el que se desarrolla la población de bacterias acéticas.

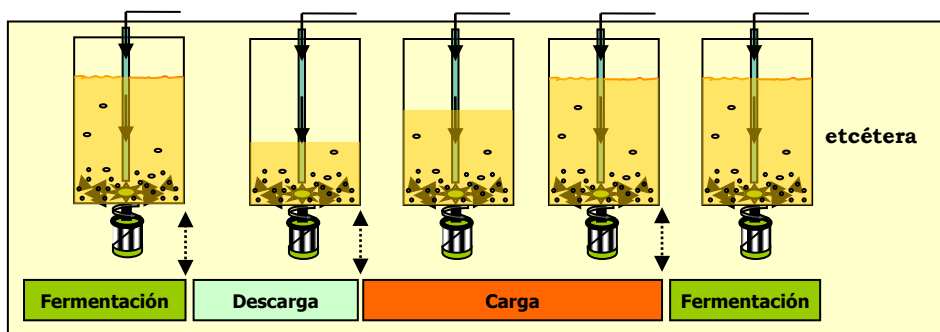


Figura V.1.1. Diagrama de las diferentes etapas en un modo de trabajo semi-continuo.

Normalmente, teniendo en cuenta la alta demanda de oxígeno, se emplea un reactor con una turbina autoaspirante que consigue una alta eficacia en la transferencia de oxígeno con un bajo consumo energético por litro de etanol transformado<sup>312</sup>.

Es posible llevar a cabo las operaciones anteriores de formas muy diferentes en función de diversas variables. Por ejemplo, dependiendo del momento en el que se haga la descarga, el volumen que se descargue y el modo en el que se haga la carga, entre otras variables, se producen cambios más o menos bruscos en el medio que pueden afectar a la concentración y actividad de la población bacteriana del medio. Para optimizar el funcionamiento del proceso es necesario investigar la influencia de estos modos alternativos de trabajo en el comportamiento del sistema. Todo ello implica un gran esfuerzo

<sup>306</sup> Véase referencia nº 13 página 6.

<sup>307</sup> Véase referencia nº 224 página 52.

<sup>308</sup> Véase referencia nº 221 página 52.

<sup>309</sup> Véase referencia nº 31 página 15.

<sup>310</sup> Véase referencia nº 223 página 52.

<sup>311</sup> Véase referencia nº 4 página 3.

<sup>312</sup> Véase referencia nº 60 página 23.

experimental<sup>313</sup> dado el número de variables implicadas y las dificultades típicas presentes en la realización de experimentos con reacciones microbianas.

En este contexto, en cada ciclo semi-continuo de trabajo es necesario realizar una evaluación correcta de la velocidad global de acetificación y poder comparar este resultado con los obtenidos en condiciones experimentales diferentes. La velocidad global de acetificación se suele determinar a partir de la información relativa a la acidez final del medio justo antes de la descarga, volumen que se descarga y tiempo global del ciclo de fermentación. Sin embargo, esta evaluación se puede y se debe realizar también a partir de información sobre la evolución de la concentración de etanol a lo largo del ciclo. En términos prácticos, hoy día se dispone de dispositivos para la medida continua de etanol en el medio de cultivo (sonda Alkosens, Frings).

Para una buena optimización de la producción de vinagres, es recomendable evaluar la velocidad de acetificación de ambas formas. La evaluación a partir de los datos de etanol permite conocer cómo va evolucionando la velocidad de oxidación biológica a lo largo del ciclo y esto es especialmente interesante para evaluar la influencia de las variables operacionales sobre las diferentes etapas del ciclo y poder, de esta forma, facilitar las propuestas de mejora que se estimen convenientes. Por otro lado, la comparación con la velocidad de acetificación determinada a partir de los datos de acidez final, permite tener una medida adicional de las pérdidas de sustrato por evaporación, debido a la aireación, producida en el ciclo.

En este apartado se indica un método sencillo para evaluar la velocidad de acetificación a partir de la concentración de etanol a lo largo de un ciclo típico de acetificación de vino.

## **V.2. Condiciones de fermentación.**

Se utilizó un fermentador Frings de 8 L de capacidad efectiva y un modo de trabajo similar al seguido en muchas plantas industriales:

- Temperatura constante de 31 °C.
- Se deja que la reacción transcurra hasta que la concentración de etanol alcance un valor de aproximadamente 1.5 % (v/v).
- Se descarga rápidamente el 50 % del medio (4 L).

---

<sup>313</sup> Véase referencia nº 5 página 3.

- Se carga lentamente hasta alcanzar el volumen final de trabajo sin que se supere, en ningún momento, una concentración determinada de etanol, por ejemplo, 5 %(v/v). Esto implica dos fases diferenciadas durante la carga: una primera fase en la que la carga es continua hasta que la concentración de etanol alcanza el valor de 5 %(v/v) y a partir de este momento la adición de vino es semicontinua hasta alcanzar el volumen final de trabajo (8 L) sin que en ningún momento se supere la referida concentración de etanol.
- El caudal de aire empleado fue de 7.5 L de aire h<sup>-1</sup>L<sup>-1</sup> de medio.

El biorreactor dispone de todo el equipamiento necesario para poder funcionar de forma automatizada. La carga, descarga, control y monitorización se realiza de manera autónoma previa programación en el ordenador correspondiente.

Este modo de trabajo implica una variación con el tiempo de diversas variables: volumen, concentración de etanol, acidez, concentración celular, etc.

### **V.3. Método propuesto.**

La figura V.3.1. muestra los resultados obtenidos para un ciclo típico, trabajando en la forma citada anteriormente.

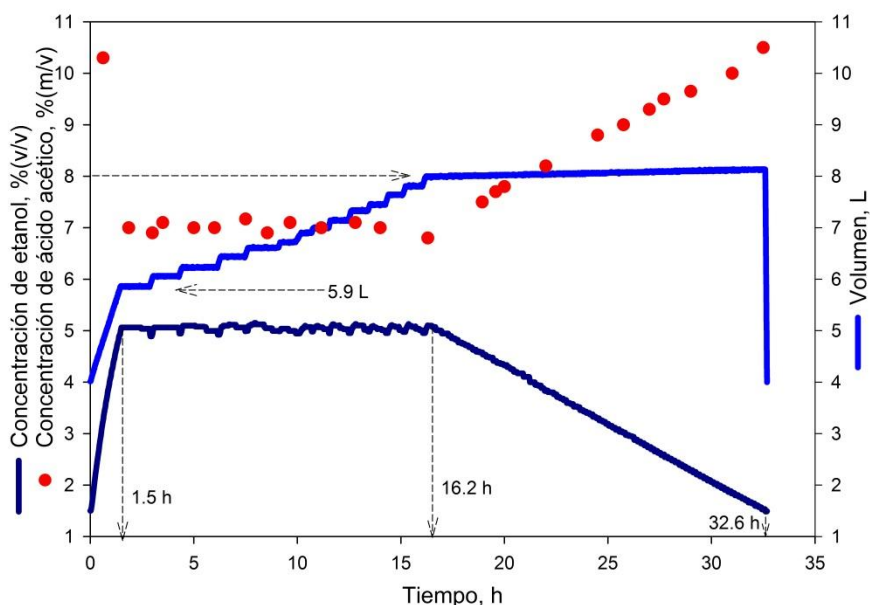


Figura V.3.1. Evolución del volumen y de la concentración de etanol en un ciclo típico de acetificación de vino.

Como se puede observar en la figura anterior, existen tres zonas claramente diferenciadas:

- Una primera zona (etapa de carga rápida), que dura 1.5 h, en la que se produce una carga continua a una velocidad de  $1.2 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$  hasta que se alcanza la concentración de etanol de 5.0 % (v/v). Esta carga produce una dilución del medio que conlleva una disminución de la concentración de ácido acético, tal y como se observa en la figura V.3.1., por el contrario, como el vino de alimentación tiene una concentración de etanol de 12.0 % (v/v) se produce un aumento en el sustrato.
- A continuación le sigue una segunda zona (etapa de carga lenta), que se extiende desde las 1.5 h hasta las 16.2 h, en la que se mantiene constante la concentración de etanol en 5 % (v/v), con pequeñas oscilaciones. Esto se consigue mediante la adición semi-continua del vino necesario para reponer el etanol que se va consumiendo por las bacterias y alcanzar el volumen máximo de trabajo (8 L).
- Finalmente, alcanzado el volumen máximo establecido para el medio de cultivo, se pasa a una tercera fase (etapa de agotamiento), que se extiende hasta las 32.6 h, en la que se

produce una disminución de la concentración de etanol de forma constante hasta un valor de 1.5 % (v/v) y comienza la descarga del 50 % del volumen del medio (4 L).

A continuación, se procede a analizar la evolución de la concentración de etanol en cada una de las etapas.

### V.3.1. Análisis de la velocidad media de desaparición de etanol.

- Etapas de carga rápida.

En la figura V.3.2. se puede observar, para la etapa de carga rápida, la evolución de la concentración de etanol y el volumen en la primera zona. Igualmente se muestra la estimación de la evolución de etanol (línea roja) mediante un balance de materia en el que no se ha tenido en cuenta el consumo por parte de las bacterias. Es evidente que la desviación de la línea experimental respecto a esta última representaría una medida del etanol consumido y/o del etanol arrastrado por el aire que circula a través del reactor. Las diferencias, como se observan, son muy pequeñas.

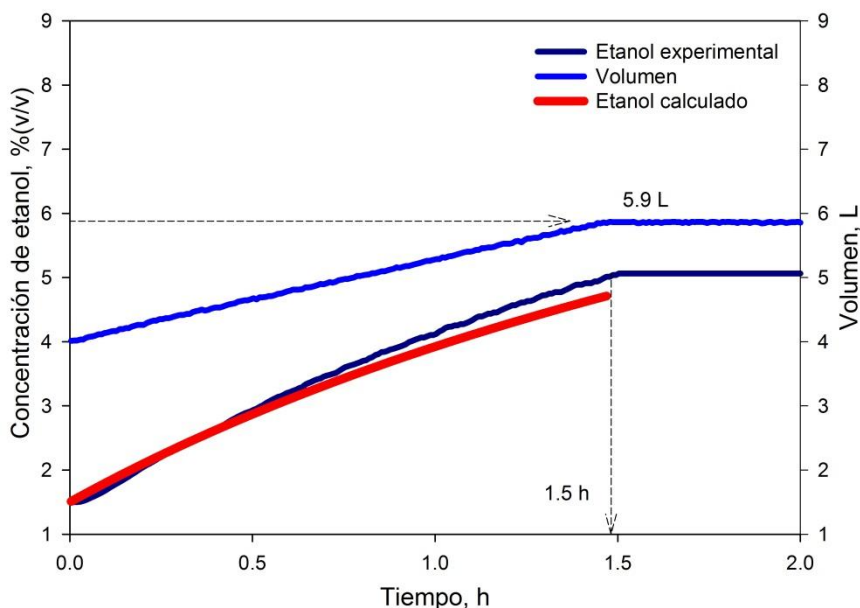


Figura V.3.2. Evolución de la concentración de etanol experimental y estimada, así como, el volumen durante la primera etapa de carga rápida.

El balance de materia realizado, asumiendo que los volúmenes de vino de alimentación y medio de cultivo son aditivos, se detalla a continuación:

$$V = V_0 + q_0 \cdot t \quad [\text{Ec. V.3.1.}]$$

$$X = X_0 + q_0 \cdot C_i \cdot t \quad [\text{Ec. V.3.2.}]$$

$$E_{\text{calculado}} = 100 \cdot \frac{X}{V} = 100 \cdot \frac{X_0 + q_0 \cdot C_i \cdot t}{V_0 + q_0 \cdot t} \quad [\text{Ec. V.3.3.}]$$

siendo:

V: volumen de medio de fermentación en un instante dado durante la carga, [L].

V<sub>0</sub>: volumen de medio de fermentación al comienzo de la carga, [L].

q<sub>0</sub>: caudal de alimentación de vino, [L·h<sup>-1</sup>].

t: tiempo, [h].

C<sub>i</sub>: concentración de etanol en la alimentación, [L·L<sup>-1</sup>].

X: volumen de etanol en el fermentador en un instante dado durante la carga, [L].

X<sub>0</sub>: volumen de etanol en el fermentador al comienzo de la carga, [L].

E<sub>calculado</sub>: concentración de etanol calculada en un instante dado, [% (v/v)].

En el balance de materia realizado se desprecia el consumo de etanol en el metabolismo de las bacterias. Obviamente, la diferencia entre la curva experimental y teórica de etanol proporciona una medida de la cantidad de etanol consumida durante dicha etapa pues el modo de trabajo seguido minimiza las pérdidas de etanol por arrastre, hasta el extremo de ser prácticamente despreciables, tal y como se puede ver en la figura V.3.2. las diferencias entre ambas curvas son despreciables.

La diferencia entre los valores medios, para todo el tiempo de la etapa, de las derivadas de las líneas representadas en la figura V.3.2. daría una estimación de la velocidad media de oxidación durante esta etapa para el intervalo de tiempo durante el cual transcurre la etapa de carga rápida. Para la situación mostrada, esta velocidad se expresa de la siguiente forma:

$$(-r_E)_{\text{CR}} = \text{valor medio de} \left( \frac{dE_{\text{calculado}}}{dt} - \frac{dE_{\text{experimental}}}{dt} \right) \quad [\text{Ecuación V.3.4.}]$$

siendo:

$(-r_E)_{CR}$  : velocidad media de desaparición de etanol durante la etapa de carga rápida [% (v/v) · h<sup>-1</sup>].

$E_{\text{experimental}}$  : concentración de etanol experimental en el medio, [% (v/v)].

$$(-r_E)_{CR} = 0.00 \text{ \% (v/v) · h}^{-1}$$

Aunque el consumo de etanol por parte de las bacterias se produce durante todas las etapas del ciclo, durante la primera etapa de carga rápida es prácticamente nula debido al efecto de la dilución del medio, así como a los cambios bruscos sufridos en el medio por la adicción del vino. Así mismo, se trata de una etapa que ocupa una pequeña fracción del ciclo completo, por lo que su influencia sobre la velocidad media global de desaparición de etanol en el ciclo será muy pequeña.

- Etapa de carga lenta.

Durante la segunda etapa, en la que permanece constante la concentración de etanol, es el valor del volumen en función del tiempo el que nos puede suministrar una medida de la velocidad de fermentación. La figura V.3.3. muestra la variación experimentada por el volumen del medio a fin de mantener constante la concentración de etanol.



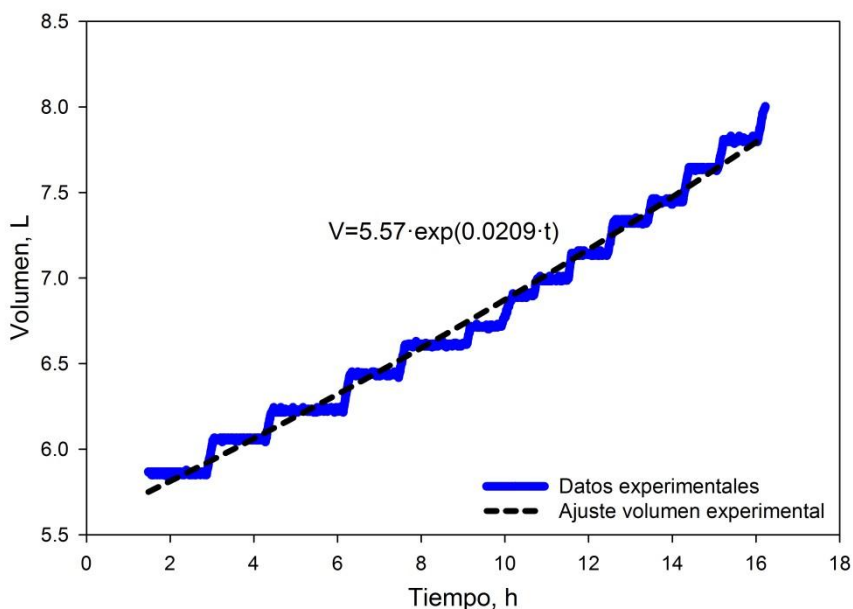


Figura V.3.3. Evolución del volumen experimental y su ajuste durante la segunda fase de carga lenta.

La estimación de la velocidad de fermentación durante esta etapa puede realizarse de la siguiente forma:

1º.- Los datos experimentales pueden ajustarse a la función

$$V=a \cdot e^{-b \cdot t} \quad \text{[Ecuación V.3.5.]}$$

siendo:

a : constante [L].

b : constante [ $h^{-1}$ ].

2º.- La variación del volumen con el tiempo estará directamente relacionada con la velocidad de consumo de etanol por parte de las bacterias

$$\frac{dV}{dt} = b \cdot a \cdot e^{-b \cdot t} = b \cdot V \quad \text{[Ecuación V.3.6.]}$$

$$\frac{1}{V} \frac{dV}{dt} = b \quad \text{[Ecuación V.3.7.]}$$

Dado que la velocidad específica de cambio de volumen es constante, la velocidad de oxidación biológica durante esta etapa también permanecerá constante.

Para determinar esta velocidad se puede realizar un balance de etanol en el medio. La velocidad de consumo de etanol por transformación en ácido acético será igual a la diferencia entre el etanol añadido por cada hora y litro de medio de cultivo y el aumento de etanol existente en el reactor por cada hora y litro de medio de cultivo, es decir:

- Etanol añadido por cada hora y litro de medio

$$\frac{1}{V} \frac{dV}{dt} \cdot E_e \quad \text{[Ecuación V.3.8.]}$$

siendo:

$E_e$  : concentración de etanol en el vino de entrada [% (v/v)].

- Aumento de etanol existente en el reactor por cada hora y litro de medio de cultivo

$$\frac{1}{V} \frac{dV}{dt} \cdot E_m \quad \text{[Ecuación V.3.9.]}$$

siendo:

$E_m$  : Concentración de etanol en el medio [% (v/v)], que como sabemos, en este caso se mantiene constante e igual a 5 % (v/v).

- Por lo tanto, la velocidad de consumo de etanol será

$$(-r_E)_{CL} = \frac{1}{V} \frac{dV}{dt} \cdot E_e - \frac{1}{V} \frac{dV}{dt} \cdot E_m \quad \text{[Ecuación V.3.10.]}$$

$$(-r_E)_{CL} = (E_e - E_m) \cdot \frac{1}{V} \frac{dV}{dt} \quad \text{[Ecuación V.3.11.]}$$

$$(-r_E)_{CL} = (E_e - E_m) \cdot b \quad \text{[Ecuación V.3.12.]}$$

siendo:

$(-r_E)_{CL}$  : velocidad media de desaparición de etanol durante la etapa de carga lenta [% (v/v) · h<sup>-1</sup>].

En el caso que se estudia, la velocidad de consumo de etanol durante esta etapa de carga lenta resulta ser la siguiente:

$$(-r_E)_{CL} = (12-5) \cdot 0.0209 = 0.15 \text{ \% (v/v) \cdot h}^{-1}$$

$$(-r_E)_{CL} = 0.15 \text{ \% (v/v) \cdot h}^{-1}$$

- Etapa de agotamiento.

Finalmente, en esta tercera etapa, que se prolonga desde el final de la carga hasta el momento inmediato justo antes de la descarga, la velocidad de oxidación se puede evaluar directamente de la pendiente de la línea recta que representa la evolución de la concentración de etanol durante el tiempo. La figura V.3.4., representa los resultados experimentales referidos:

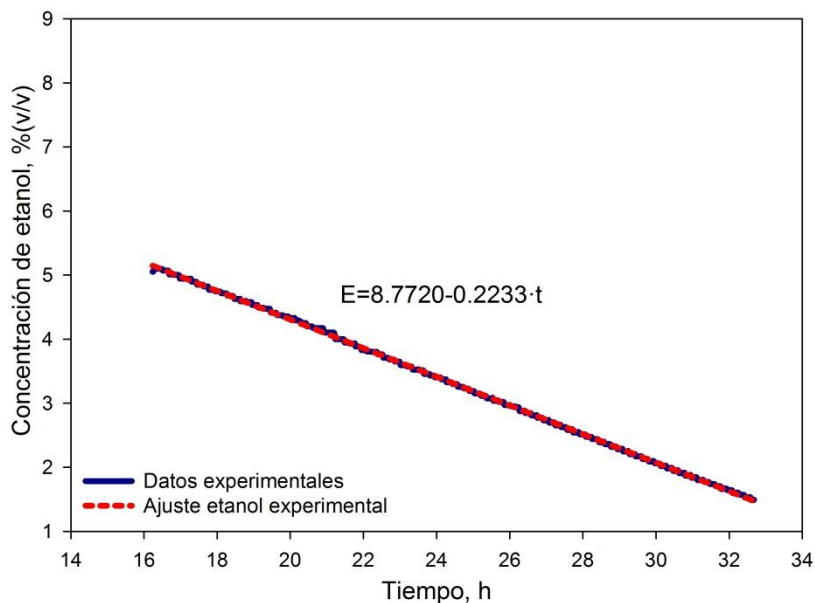


Figura V.3.4. Evolución de la concentración de etanol experimental durante la etapa de agotamiento.

El valor de la pendiente indica la velocidad de oxidación durante esta etapa:  $0.22 \text{ \% (v/v) \cdot h}^{-1}$ .

$$(-r_E)_A = 0.22 \text{ \% (v/v) \cdot h}^{-1}$$

siendo:

$(-r_E)_A$ : velocidad media de desaparición de etanol durante la etapa de agotamiento [ $\text{\% (v/v) \cdot h}^{-1}$ ].

Pues bien, a partir de toda esta información se puede estimar la velocidad global media de consumo de etanol en el ciclo. Para ello se ha de realizar una media ponderada en función de la fracción de tiempo que supone cada fase respecto al tiempo total del ciclo (véase figura V.3.1.).

Para la etapa de carga rápida:

$$T_{CR} = \frac{t_{CR}}{t_T} \quad [\text{Ec. V.3.13.}]$$

siendo:

$t_{CR}$ : duración de la etapa de carga rápida [h].

$t_T$ : duración total del ciclo [h].

$T_{CR}$ : duración de la etapa de carga rápida con respecto a la del ciclo.

$$T_{CR} = \frac{1.5}{32.6} = 0.046$$

$$T_{CR} = 0.046$$

Para la etapa de carga lenta:

$$T_{CL} = \frac{t_{CL}}{t_T} \quad [\text{Ec. V.3.14.}]$$

siendo:

$t_{CL}$ : duración de la etapa de carga lenta [h].

$T_{CL}$ : duración de la etapa de carga lenta con respecto a la del ciclo.

$$T_{CL} = \frac{14.7}{32.6} = 0.451$$

$$T_{CL} = 0.451$$

Para la etapa de agotamiento:

$$T_A = \frac{t_A}{t_T} \quad [\text{Ec. V.3.15.}]$$

siendo:

$t_A$  : duración de la etapa de agotamiento [h].

$T_A$  : duración de la etapa de agotamiento con respecto a la del ciclo.

$$T_A = \frac{16.4}{32.6} = 0.503$$

$$T_A = 0.503$$

Finalmente, se puede concluir que la primera fase de carga rápida ocupa el 4.6 % del tiempo total; la segunda, etapa de carga lenta, el 45.1 %; y la tercera, etapa de agotamiento, el 50.3 %. Conocida la duración de las distintas etapas del ciclo, es posible calcular la velocidad media global de consumo de etanol:

$$(-r_E)_{\text{global}} = T_{CR} \cdot (-r_E)_{CR} + T_{CL} \cdot (-r_E)_{CL} + T_A \cdot (-r_E)_A \quad [\text{Ec. V.3.16.}]$$

siendo:

$(-r_E)_{\text{global}}$  : velocidad media global de desaparición de etanol durante el ciclo [% (v/v) · h<sup>-1</sup>].

sustituyendo los valores de velocidad de consumo de etanol:

$$(-r_E)_{\text{global}} = (0.046 \cdot 0) + (0.451 \cdot 0.15) + (0.503 \cdot 0.22)$$

$$(-r_E)_{\text{global}} = 0.18 \text{ \% (v/v) } \cdot \text{h}^{-1}$$

### V.3.2. Análisis de la velocidad media de formación de ácido acético.

Para evaluar la velocidad media de reacción, en términos del ácido acético, se emplea la siguiente fórmula:

$$(r_A)_{\text{global}} = \frac{\text{HAc}_{\text{final}} \cdot V_{\text{desc}}}{t_T \cdot V_{\text{medio}}} \quad [\text{Ec. V.3.17.}]$$

siendo:

$(r_A)_{\text{global}}$ : velocidad media de formación de ácido acético  $[\%(\text{m/v}) \cdot \text{h}^{-1}]$ .

$\text{HAc}_{\text{final}}$ : concentración final de ácido acético en la descarga  $[\%(\text{m/v})]$ .

$V_{\text{desc}}$ : volumen de medio de fermentación descargado [L].

$V_{\text{medio}}$ : valor medio del volumen en el fermentador durante el ciclo [L].

A continuación, y previa a la aplicación de la ecuación V.3.17. es necesario conocer el valor medio del volumen en el fermentador durante el ciclo a partir del volumen medio de cada etapa y su fracción de tiempo:

Para la etapa de carga rápida:

$$\bar{V}_{\text{CR}} = \frac{v_{\text{CR}} + V_0}{2} \quad [\text{Ec. V.3.18.}]$$

siendo:

$V_0$ : volumen inicial [L].

$v_{\text{CR}}$ : volumen al final de la etapa de carga rápida [L].

$\bar{V}_{\text{CR}}$ : volumen medio durante la etapa de carga rápida [L].

$$\bar{V}_{\text{CR}} = \frac{5.9 + 4.0}{2} = 5.0 \text{ L}$$

$$\bar{V}_{\text{CR}} = 5.0 \text{ L}$$

Para la etapa de carga lenta:

El volumen medio para esta etapa corresponde con la media aritmética de todos los puntos representados en la figura V.3.3.

$$\bar{V}_{CL} = 6.7 \text{ L}$$

siendo:

$\bar{V}_{CL}$  : volumen medio durante la etapa de carga lenta [L].

Para la etapa de agotamiento:

$$\bar{V}_A = \frac{v_A + v_{CL}}{2} \quad [\text{Ec. V.3.19.}]$$

siendo:

$v_A$  : volumen al final de la etapa de agotamiento [L].

$v_{CL}$  : volumen al final de la etapa de carga lenta [L].

$\bar{V}_A$  : volumen medio durante la etapa de agotamiento [L].

$$\bar{V}_{FA} = \frac{8.0 + 8.0}{2} = 8.0 \text{ L}$$

$$\bar{V}_{FA} = 8.0 \text{ L}$$

Una vez obtenidos los volúmenes medios para cada etapa, es posible calcular el valor promedio para el ciclo teniendo en cuenta la fracción de tiempo correspondiente a cada una de las etapas:

$$V_{\text{medio}} = T_{CR} \cdot \bar{V}_{CR} + T_{CL} \cdot \bar{V}_{CL} + T_A \cdot \bar{V}_A \quad [\text{Ec. V.3.20.}]$$

sustituyendo los valores de velocidad de consumo de etanol:

$$V_{\text{medio}} = 0.046 \cdot 5.0 + 0.451 \cdot 6.7 + 0.503 \cdot 8.0 = 7.4 \text{ L}$$

$$V_{\text{medio}} = 7.3 \text{ L}$$

Una vez obtenido el valor promedio del volumen en el fermentador durante el ciclo ya se puede proceder a calcular la velocidad media de formación de ácido acético a partir de la acidez final determinada en el momento de la descarga empleando las ecuaciones V.3.17. y V.3.21.:

- acidez en la descarga, 10.5 % (m/v).
- volumen de descarga, 4.0 L.

- tiempo de ciclo, 32.6 h.
- volumen medio total de fermentación, 7.4 L.

$$(r_A)_{\text{global}} = \frac{10.5 \cdot 4}{32.6 \cdot 7.3} = 0.18 \text{ \% (m/v) \cdot h}^{-1}$$

$$(r_A)_{\text{global}} = 0.18 \text{ \% (m/v) \cdot h}^{-1}$$

La figura V.3.5. muestra la comparación de los valores de las velocidades medias de fermentación calculadas por los dos procedimientos que se acaban de detallar. En este sentido, es importante destacar que se observan unas diferencias entre ambos valores inferiores al seis por ciento.

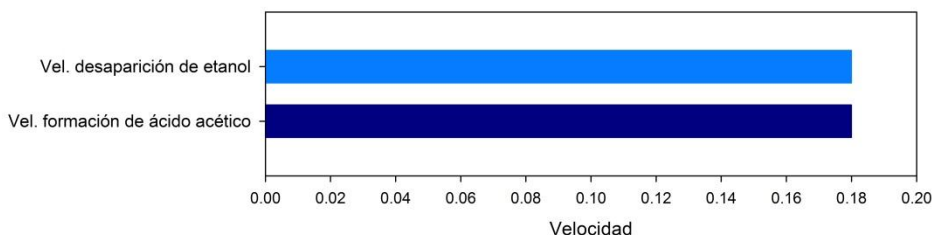


Figura V.3.5. Velocidad global de desaparición de etanol y de formación de ácido acético en el ciclo.

### V.3.3. Análisis de la producción global de ácido acético.

Desde el punto de vista industrial es interesante evaluar la producción global de ácido acético. Su determinación se estima a partir de la siguiente ecuación:

$$P_{A \text{ global}} = \frac{10 \cdot \text{HAc}_{\text{final}} \cdot V_{\text{desc}}}{t_T} \quad [\text{Ec. V.3.21.}]$$

siendo:

$P_{A \text{ global}}$  : Producción global de ácido acético [g ácido acético·h<sup>-1</sup>].

$$P_{A \text{ global}} = \frac{10 \cdot 10.5 \cdot 4}{32.6} = 12.5 \text{ g acético} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$P_{A \text{ global}} = 12.5 \text{ g acético} \cdot \text{h}^{-1}$$



#### **V.4. MÉTODO PARA LA ESTIMACIÓN DE LAS VELOCIDADES MEDIAS EN UN CONJUNTO DE CICLOS DE ACETIFICACIÓN DE VINO.**

Si bien cualquier investigación científica exige la repetición de los experimentos para validar estadísticamente a éstos, cuando se trabaja en el contexto de la Ingeniería de la Reacción Bioquímica esta exigencia es aún mayor si cabe. La complejidad que acompaña cualquier investigación basada en el uso de reactores biológicos y las múltiples variables que pueden afectar a los resultados, hace necesaria la realización de sucesivas réplicas del ciclo de fermentación, fundamentalmente para la estabilización del sistema hasta alcanzar el estado estacionario, la calibración y verificación de los parámetros determinados mediante el empleo de distintos equipos de medida utilizados en el sistema, así como, la determinación manual de otros parámetros que no se encuentran automatizados (por ejemplo la concentración de ácido acético).

Para cada una de las condiciones realizadas en el sistema se va a obtener una serie de ciclos, por lo que la estimación de la velocidad media de acetificación, bien a partir del consumo de etanol, o bien a partir de formación de ácido acético, así como, la estimación de la producción del ácido acético no van a poder realizarse siguiendo la metodología descrita en el apartado V.3. pues en vez de tener valores absolutos para cada variable se han de emplear valores promedio de dichas variables estudiadas con su correspondientes desviaciones estándar, lo cual hace necesario ampliar dicha metodología.

En resumen, en este apartado se describe con todo detalle el método empleado para la determinación de las velocidades y la producción cuando se emplean como datos experimentales los correspondientes a un conjunto de ciclos de ciclos repetidos.

La figura V.4.1. muestra los resultados experimentales obtenidos en ocho ciclos repetidos, trabajando en la forma citada anteriormente.

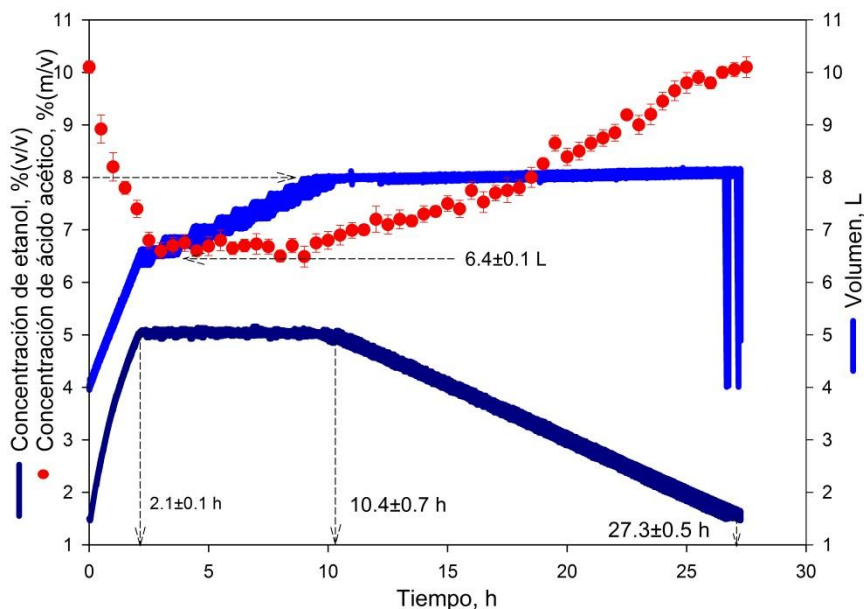


Figura V.4.1. Evolución del volumen y de la concentración de etanol en ocho ciclos repetidos de acetificación de vino.

Como se puede observar en la figura anterior, se muestra un perfil similar de evolución del sistema al obtenido en el apartado anterior cuando se analizaba un sólo ciclo, se distinguen nuevamente tres zonas claramente diferenciadas:

- Una primera zona (etapa de carga rápida), que dura  $2.1 \pm 0.1$  h, en la que se produce una carga continua a una velocidad de  $1.1 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$  hasta que se alcanza la concentración de etanol de  $5.0 \text{ \% (v/v)}$ . Esta carga produce una dilución del medio que conlleva una disminución de la concentración de ácido acético y se produce un aumento en el sustrato.
- A continuación le sigue una segunda zona (etapa de carga lenta), que se extiende desde las  $2.1 \pm 0.1$  h hasta las  $10.4 \pm 0.7$  h, en la que se mantiene constante la concentración de etanol en  $5 \text{ \% (v/v)}$ , con pequeñas oscilaciones, mediante la adición semi-continua del vino necesario para reponer el etanol que se va consumiendo por las bacterias y alcanzar el volumen máximo de trabajo (8 L).
- Finalmente, alcanzado el volumen máximo establecido para el medio de cultivo, se pasa a una tercera fase (etapa de agotamiento), que se extiende hasta las  $27.3 \pm 0.5$  h, en la que se

produce una disminución de la concentración de etanol de forma constante hasta un valor de 1.5 %(v/v) y comienza la descarga del 50 % del volumen del medio (4 L).

#### V.4.1. Análisis de la velocidad media de desaparición de etanol.

- Etapa de carga rápida.

La figura V.4.2. se muestra la evolución de la concentración de etanol y el volumen en la etapa de carga rápida para las ocho repeticiones realizadas. Además, también se representa la estimación de la evolución de la concentración de etanol mediante el balance de materia descrito en el apartado anterior.

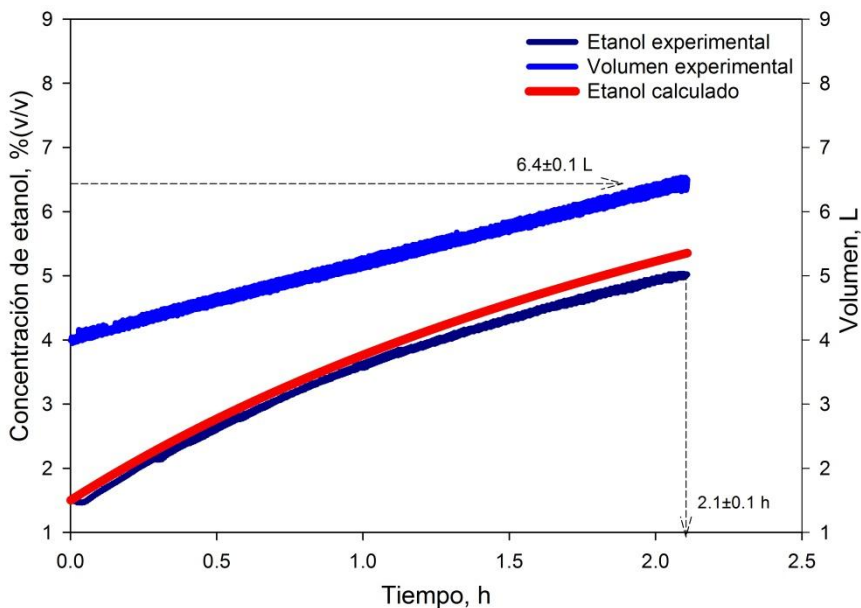


Figura V.4.2. Evolución de la concentración de etanol experimental y estimada, así como, el volumen durante la primera etapa de carga rápida en ocho ciclos repetidos.

El citado balance de materia ha de ser completado con las ecuaciones correspondientes al cálculo de errores:

$$V = V_0 + q_0 \cdot t \quad [\text{Ec. V.3.1.}]$$

$$\sigma_V = \sqrt{\sigma_{V_0}^2 + (q_0 \cdot t)^2 \cdot \left[ \left( \frac{\sigma_{q_0}}{q_0} \right)^2 + \left( \frac{\sigma_t}{t} \right)^2 \right]} \quad [\text{Ec. V.4.1.}]$$

$$X = X_0 + q_0 \cdot C_i \cdot t \quad [\text{Ec. V.3.2.}]$$

$$\sigma_X = \sqrt{\sigma_{X_0}^2 + (q_0 \cdot C_i \cdot t)^2 \cdot \left[ \left( \frac{\sigma_{q_0}}{q_0} \right)^2 + \left( \frac{\sigma_{C_i}}{C_i} \right)^2 + \left( \frac{\sigma_t}{t} \right)^2 \right]} \quad [\text{Ec. V.4.2.}]$$

$$E_{\text{calculado}} = 100 \cdot \frac{X}{V} = 100 \cdot \frac{X_0 + q_0 \cdot C_i \cdot t}{V_0 + q_0 \cdot t} \quad [\text{Ec. V.3.3.}]$$

$$\sigma_{E_{\text{calculado}}} = \sigma_{\frac{X}{V}} = 100 \cdot \frac{X}{V} \cdot \sqrt{\left( \frac{\sigma_X}{X} \right)^2 + \left( \frac{\sigma_V}{V} \right)^2} \quad [\text{Ec. V.4.3.}]$$

siendo:

$\sigma_V$ : error del volumen de medio de fermentación en un instante dado durante la carga, [L].

$\sigma_{V_0}$ : error del volumen de medio de fermentación al comienzo de la carga, [L].

$\sigma_{q_0}$ : error del caudal de alimentación de vino, [L·h<sup>-1</sup>].

$\sigma_t$ : error del tiempo, [h].

$\sigma_{C_i}$ : error de la concentración de etanol en la alimentación, [L·L<sup>-1</sup>].

$\sigma_X$ : error del volumen de etanol en el fermentador en un instante dado durante la carga, [L].

$\sigma_{X_0}$ : error del volumen de etanol en el fermentador al comienzo de la carga, [L].

$\sigma_{E_{\text{calculado}}}$ : error de la concentración de etanol calculada en un instante dado, [% (v/v)].

De forma similar a cuando se analiza un solo ciclo la cantidad de etanol consumida por las bacterias es la diferencia entre la curva experimental y calculada para esta etapa de carga rápida.

La diferencia entre los valores medios, para todo el tiempo de la etapa, de las derivadas de las líneas representadas en la figura V.4.2. proporciona una estimación de la velocidad media de oxidación durante esta etapa de carga rápida. En el caso mostrado, el resultado sería:

$$(-r_E)_{CR} = \text{valor medio de} \left( \frac{dE_{\text{calculado}}}{dt} - \frac{dE_{\text{experimental}}}{dt} \right) \quad [\text{Ecuación V.3.4.}]$$

$$(-r_E)_{CR} = 0.23 \pm 0.24 \text{ \%}(v/v) \cdot h^{-1}$$

Aunque el consumo de etanol por parte de las bacterias se produce durante todas las etapas del ciclo, a la etapa de carga rápida le corresponde una pequeña fracción del ciclo completo, implicando una pequeña influencia sobre la velocidad media global de desaparición de etanol en el ciclo.

- Etapa de carga lenta.

Durante la segunda etapa del ciclo, véase la figura V.4.1., se mantiene constante la concentración de etanol mediante pequeñas adicciones de vino, por lo tanto, el valor del volumen en función del tiempo nos puede suministrar una medida de la velocidad de fermentación. La figura V.4.3. muestra la variación del volumen realizada para mantener constante la concentración de etanol.

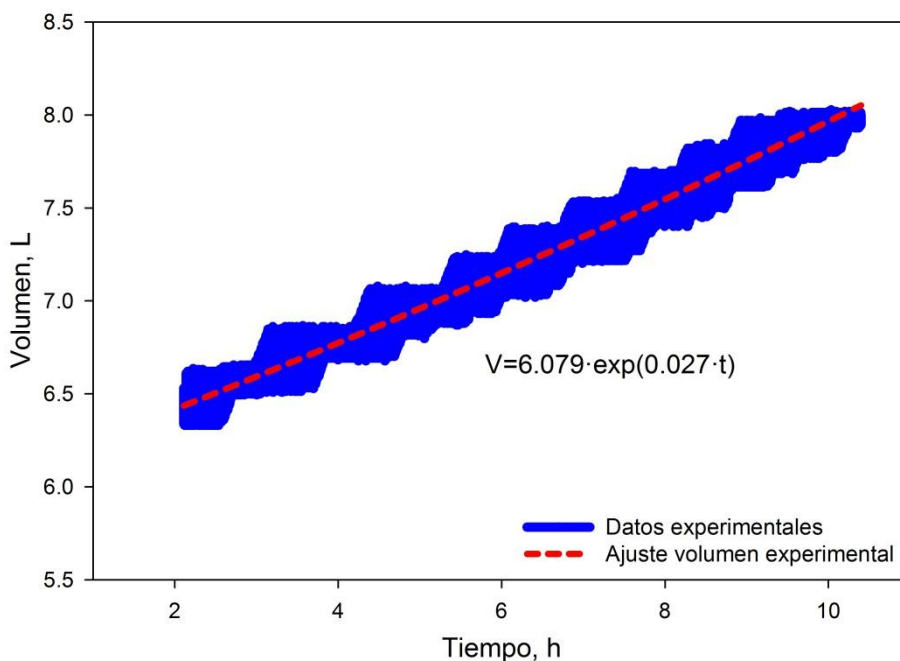


Figura V.4.3. Evolución del volumen experimental y su ajuste durante la fase de carga lenta en ocho ciclos repetidos.

La estimación de la velocidad de fermentación durante esta etapa se hace de forma similar a cuando se trata de un solo ciclo:

$$(-r_E)_{CL} = (E_e - E_m) \cdot b \quad [\text{Ec. V.3.12.}]$$

$$\sigma_{(-r_E)_{CL}} = (-r_E)_{CL} \cdot \sqrt{\left(\frac{\sqrt{\sigma_{E_e}^2 + \sigma_{E_m}^2}}{E_e - E_m}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_b}{b}\right)^2} \quad [\text{Ec. V.4.4.}]$$

siendo:

$\sigma_{(-r_E)_{CL}}$  : error de la velocidad media de desaparición de etanol durante la etapa de carga lenta [% (v/v) · h<sup>-1</sup>].

$\sigma_{E_e}$  : error de la concentración de etanol en el vino de entrada [% (v/v)].

$\sigma_{E_m}$  : error de la concentración de etanol en el medio [% (v/v)].

$\sigma_b$  : error de la constante [h<sup>-1</sup>].

En este caso la velocidad de consumo de etanol durante esta etapa de carga sería, por tanto:

$$(-r_E)_{CL} = (12-5) \cdot 0.027 = 0.19 \text{ \% (v/v) } \cdot \text{h}^{-1}$$

$$(-r_E)_{CL} = 0.19 \pm 0.01 \text{ \% (v/v) } \cdot \text{h}^{-1}$$

- Etapas de agotamiento.

Finalmente, durante la última etapa del ciclo, la velocidad de oxidación se puede evaluar, de manera similar a cuando se analiza un solo ciclo, directamente de la pendiente de la línea recta que representa la evolución de la concentración de etanol durante el tiempo. La figura V.4.4., recoge los resultados experimentales referidos:

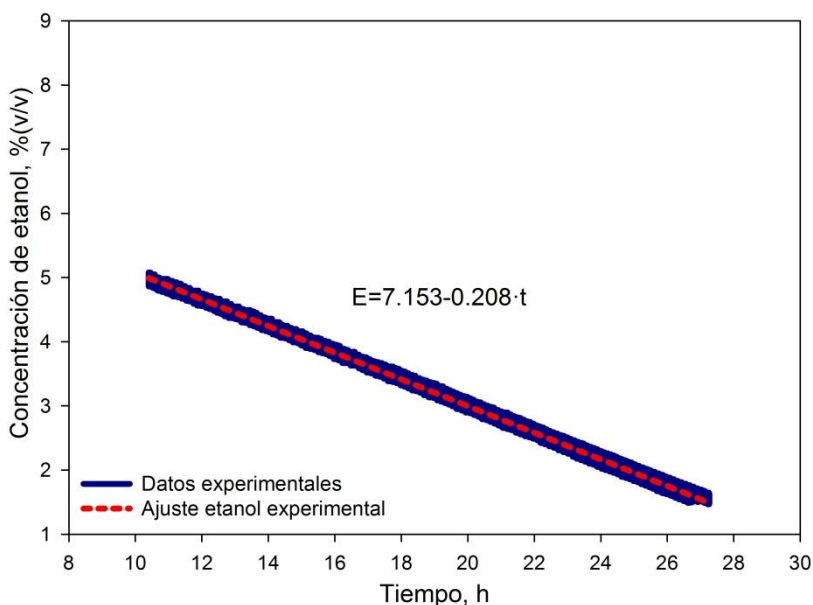


Figura V.4.4. Evolución de la concentración de etanol experimental durante la etapa de agotamiento.

El valor de la pendiente indica la velocidad de oxidación durante esta etapa:  $0.21 \text{ \%}(v/v)\cdot\text{h}^{-1}$ .

$$(-r_E)_A = 0.21 \pm 0.01 \text{ \%}(v/v)\cdot\text{h}^{-1}$$

A continuación, para estimar la velocidad global media de desaparición de etanol en el ciclo es necesario, además de conocer la velocidad de desaparición en cada una de las etapas, calcular la fracción de tiempo que supone cada fase respecto al tiempo total del ciclo (véase figura V.4.1.).

Para la etapa de carga rápida:

$$T_{CR} = \frac{t_{CR}}{t_T} \quad [\text{Ec. V.3.13.}]$$

$$\sigma_{T_{CR}} = T_{CR} \cdot \sqrt{\left(\frac{\sigma_{t_{CR}}}{t_{CR}}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{t_T}}{t_T}\right)^2} \quad [\text{Ec. V.4.5.}]$$

siendo:

$\sigma_{t_{CR}}$  : error de la duración de la etapa de carga rápida [h].

$\sigma_{t_T}$  : error de la duración total del ciclo [h].

$\sigma_{T_{CR}}$  : error de la duración de la etapa de carga rápida con respecto al ciclo.

$$T_{CR} = \frac{2.1}{27.3} = 0.077$$

$$T_{CR} = 0.077 \pm 0.004$$

Para la etapa de carga lenta:

$$T_{CL} = \frac{t_{CL}}{t_T} \quad [\text{Ec. V.3.14.}]$$

$$\sigma_{T_{CL}} = T_{CL} \cdot \sqrt{\left(\frac{\sigma_{t_{CL}}}{t_{CL}}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{t_T}}{t_T}\right)^2} \quad [\text{Ec. V.4.6.}]$$

siendo:

$\sigma_{t_{CL}}$  : error de la duración de la etapa de carga lenta [h].

$\sigma_{T_{CL}}$  : error de la duración de la etapa de carga lenta con respecto al ciclo.

$$T_{CL} = \frac{8.3}{27.3} = 0.304$$

$$T_{CL} = 0.304 \pm 0.027$$

Para la etapa de agotamiento:

$$T_A = \frac{t_A}{t_T} \quad [\text{Ec. V.3.15.}]$$



$$\sigma_{T_A} = T_A \cdot \sqrt{\left(\frac{\sigma_{t_A}}{t_A}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{t_T}}{t_T}\right)^2} \quad [\text{Ec. V.4.7.}]$$

siendo:

$\sigma_{t_A}$  : error de la duración de la etapa de agotamiento [h].

$\sigma_{T_A}$  : error de la duración de la etapa de agotamiento con respecto al ciclo.

$$T_A = \frac{16.9}{27.3} = 0.619$$

$$T_A = 0.619 \pm 0.034$$

Por lo tanto, la fase primera ocupa un 7.7 % del tiempo total, la segunda un 30.4 % y la tercera un 61.9 %. Una vez calculada la duración de cada una de las etapas con respecto a la del ciclo se calcula la velocidad media global de consumo de etanol:

$$(-r_E)_{\text{global}} = T_{\text{CR}} \cdot (-r_E)_{\text{CR}} + T_{\text{CL}} \cdot (-r_E)_{\text{CL}} + T_A \cdot (-r_E)_A \quad [\text{Ec. V.3.16.}]$$

$$\sigma_{(-r_E)_{\text{global}}} = \left( \left( T_{\text{CR}} \cdot (-r_E)_{\text{CR}} \cdot \sqrt{\left(\frac{\sigma_{T_{\text{CR}}}}{T_{\text{CR}}}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{(-r_E)_{\text{CR}}}}{(-r_E)_{\text{CR}}}\right)^2} \right)^2 + \left( T_{\text{CL}} \cdot (-r_E)_{\text{CL}} \cdot \sqrt{\left(\frac{\sigma_{T_{\text{CL}}}}{T_{\text{CL}}}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{(-r_E)_{\text{CL}}}}{(-r_E)_{\text{CL}}}\right)^2} \right)^2 + \left( T_A \cdot (-r_E)_A \cdot \sqrt{\left(\frac{\sigma_{T_A}}{T_A}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{(-r_E)_A}}{(-r_E)_A}\right)^2} \right)^2 \right)^{0.5} \quad [\text{Ec. V.4.8.}]$$

siendo:

$\sigma_{(-r_E)_{\text{global}}}$  : error de la velocidad media global de desaparición de etanol del ciclo [% (v/v) · h<sup>-1</sup>].

sustituyendo los valores de velocidad de consumo de etanol:

$$(-r_E)_{\text{global}} = (0.077 \cdot 0.23) + (0.304 \cdot 0.19) + (0.619 \cdot 0.21)$$

$$(-r_E)_{\text{global}} = 0.21 \pm 0.02 \text{ \% (v/v) \cdot h}^{-1}$$

#### V.4.2. Análisis de la velocidad media de formación de ácido acético.

Para evaluar la velocidad media de reacción, en términos del ácido acético, se emplean las siguientes fórmulas:

$$(r_A)_{\text{global}} = \frac{\text{HAc}_{\text{final}} \cdot V_{\text{desc}}}{t_T \cdot V_{\text{medio}}} \quad [\text{Ec. V.3.17.}]$$

$$\sigma_{(r_A)_{\text{global}}} = (r_A)_{\text{global}} \cdot \sqrt{\left(\frac{\sigma_{\text{HAc}_{\text{final}}}}{\text{HAc}_{\text{final}}}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{V_{\text{desc}}}}{V_{\text{desc}}}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{t_T}}{t_T}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{V_{\text{medio}}}}{V_{\text{medio}}}\right)^2} \quad [\text{Ec. V.4.9.}]$$

siendo:

$\sigma_{(r_A)_{\text{global}}}$  : error de la velocidad media de formación de ácido acético [% (m/v) · h<sup>-1</sup>].

$\sigma_{\text{HAc}_{\text{final}}}$  : error de la concentración final de ácido acético en la descarga [% (m/v)].

$\sigma_{V_{\text{desc}}}$  : error del volumen de medio de fermentación descargado [L].

$\sigma_{V_{\text{medio}}}$  : error del valor medio del volumen en el fermentador durante el ciclo [L].

A continuación, y previa a la aplicación de las ecuaciones V.3.17. y V.4.9. es necesario conocer el valor medio del volumen en el fermentador durante el ciclo a partir del volumen medio de cada etapa y su fracción de tiempo:

Para la etapa de carga rápida:

$$\bar{V}_{\text{CR}} = \frac{V_{\text{CR}} + V_0}{2} \quad [\text{Ec. V.3.18.}]$$

$$\sigma_{\bar{V}_{CR}} = \frac{1}{2} \cdot \sqrt{\sigma_{V_{CR}}^2 + \sigma_{V_0}^2} \quad [\text{Ec. V.4.10.}]$$

siendo:

$\sigma_{V_0}$  : error del volumen inicial [L].

$\sigma_{V_{CR}}$  : error del volumen al final de la etapa de carga rápida [L].

$\sigma_{\bar{V}_{CR}}$  : error del volumen medio durante la etapa de carga rápida [L].

$$\bar{V}_{CR} = \frac{6.4 + 4.0}{2} = 5.2 \text{ L}$$

$$\bar{V}_{CR} = 5.2 \pm 0.1 \text{ L}$$

Para la etapa de carga lenta:

Como valor medio del volumen durante esta etapa se toma la media aritmética de todos los puntos representados en la figura V.4.3. En concreto, en este caso, se obtiene un valor de 7.2 L.

La estimación del error correspondiente al resultado anterior, se realiza mediante la siguiente expresión:

$$\sigma_{\bar{V}_{CL}} = \frac{1}{2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^n \sigma_{V_{CLi}}^2} \quad [\text{Ec. V.4.11.}]$$

siendo:

$\sigma_{V_{CLi}}$  : error de los datos de volumen en cada tiempo durante la etapa de carga lenta [L].

$\sigma_{\bar{V}_{CL}}$  : error del volumen medio durante la etapa de carga lenta [L].

$$\bar{V}_{CL} = 7.2 \pm 0.1 \text{ L}$$

Para la etapa de agotamiento:

$$\bar{V}_A = \frac{V_A + V_{CL}}{2} \quad [\text{Ec. V.3.19.}]$$

$$\sigma_{\bar{V}_A} = \frac{1}{2} \cdot \sqrt{\sigma_{V_A}^2 + \sigma_{V_{CL}}^2} \quad [\text{Ec. V.4.12.}]$$

siendo:

$\sigma_{V_A}$  : error del volumen al final de la etapa de agotamiento [L].

$\sigma_{V_{CL}}$  : error del volumen al final de la etapa de carga lenta [L].

$\sigma_{\bar{V}_A}$  : error del volumen medio durante la etapa de agotamiento [L].

$$\bar{V}_{FA} = \frac{8.0 + 8.0}{2} = 8.0 \text{ L}$$

$$\bar{V}_{FA} = 8.0 \pm 0.1 \text{ L}$$

Una vez obtenidos los volúmenes medios para cada etapa se puede obtener el valor medio del ciclo teniendo en cuenta la fracción de tiempo de cada una de las etapas:

$$V_{\text{medio}} = T_{CR} \cdot \bar{V}_{CR} + T_{CL} \cdot \bar{V}_{CL} + T_A \cdot \bar{V}_A \quad [\text{Ec. V.3.20.}]$$

$$\sigma_{V_{\text{medio}}} = \left( \left( T_{CR} \cdot \bar{V}_{CR} \cdot \sqrt{\left( \frac{\sigma_{T_{CR}}}{T_{CR}} \right)^2 + \left( \frac{\sigma_{\bar{V}_{CR}}}{\bar{V}_{CR}} \right)^2} \right)^2 + \left( T_{CL} \cdot \bar{V}_{CL} \cdot \sqrt{\left( \frac{\sigma_{T_{CL}}}{T_{CL}} \right)^2 + \left( \frac{\sigma_{\bar{V}_{CL}}}{\bar{V}_{CL}} \right)^2} \right)^2 + \left( T_A \cdot \bar{V}_A \cdot \sqrt{\left( \frac{\sigma_{T_A}}{T_A} \right)^2 + \left( \frac{\sigma_{\bar{V}_A}}{\bar{V}_A} \right)^2} \right)^2 \right)^{0.5} \quad [\text{Ec. V.4.13.}]$$

sustituyendo los valores de velocidad de consumo de etanol:

$$V_{\text{medio}} = 0.077 \cdot 5.2 + 0.304 \cdot 7.2 + 0.319 \cdot 8.0 = 7.6 \text{ L}$$

$$V_{\text{medio}} = 7.6 \pm 0.1 \text{ L}$$

Calculado el valor promedio del volumen en el fermentador durante el ciclo se puede proceder a calcular la velocidad media de formación de ácido acético a partir de la acidez final conseguida en el momento de la descarga empleando las ecuaciones V.3.17. y V.4.9.:

- acidez en la descarga,  $10.1 \pm 0.1 \text{ \% (m/v)}$ .
- volumen de descarga,  $4.0 \pm 0.1 \text{ L}$ .
- tiempo de ciclo,  $27.3 \pm 0.5 \text{ h}$ .
- volumen medio total de fermentación,  $7.6 \pm 0.1 \text{ L}$ .

$$(r_A)_{\text{global}} = \frac{10.1 \cdot 4}{27.3 \cdot 7.6} = 0.20 \text{ \% (m/v) \cdot h}^{-1}$$

$$(r_A)_{\text{global}} = 0.20 \pm 0.01 \text{ \% (m/v) \cdot h}^{-1}$$

La figura V.4.5. compara los valores de velocidad media de fermentación obtenidos a partir de los dos procedimientos que se acaban de detallar. Cabe destacar que no se aprecian diferencias significativas entre ambos valores.

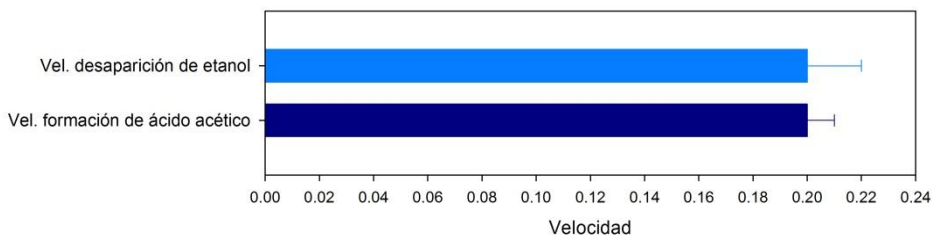


Figura V.4.5. Velocidad global de desaparición de etanol y de formación de ácido acético en el ciclo.

### V.4.3. Análisis de la producción global de ácido acético.

Por último, desde el punto de vista industrial es interesante evaluar la producción global de ácido acético. Su determinación se estima a partir de las siguientes ecuaciones:

$$P_{A \text{ global}} = \frac{10 \cdot \text{HAc}_{\text{final}} \cdot V_{\text{desc}}}{t_T} \quad [\text{Ec. V.3.21.}]$$

$$\sigma_{P_{A \text{ global}}} = P_{A \text{ global}} \cdot \sqrt{\left(\frac{\sigma_{\text{HAc}_{\text{final}}}}{\text{HAc}_{\text{final}}}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{V_{\text{desc}}}}{V_{\text{desc}}}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{t_T}}{t_T}\right)^2} \quad [\text{Ec. V.4.14.}]$$

siendo:

$\sigma_{P_{A \text{ global}}}$  : Error de la producción global de ácido acético [g ácido acético·h<sup>-1</sup>].

$$P_{A \text{ global}} = \frac{10 \cdot 10.1 \cdot 4}{27.3} = 14.8 \text{ g acético} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$P_{A \text{ global}} = 14.8 \pm 0.4 \text{ g acético} \cdot \text{h}^{-1}$$

Con el objetivo de asegurar y acelerar los cálculos necesarios, el método descrito puede ser programado fácilmente en una hoja de cálculo. A continuación, y a modo de ejemplo, se muestra una captura de dicha hoja en la que se han introducido los valores obtenidos en los experimentos mostrados en el apartado V.4.

<b>Graduación vino:</b>	<b>12</b>				Valor medio	Desv. St	
<b>Carga:</b>	<b>et-0.02</b>						
<b>Volumen descargado:</b>	<b>50%</b>						
<b>Etanol en descarga:</b>	<b>1.5</b>						
					TIEMPO:		
					Porc Tiempo fase 1	0.077	0.004
	Valor medio	Desv. St			Porc Tiempo fase 2	0.304	0.026
Tiempo fase 1	2.1	0.1			Porc Tiempo fase 3	0.619	0.033
Tiempo fase 2	10.4	0.7					
Tiempo fase 3	27.3	0.5			FASE 1:		
FASE 1:					Etanol estimado	5.6	1.6
Etanol final (°GL)	1.5	0.1			Vel desap etanol 1	0.23	0.24
Volumen inicial (L)	4.0	0.1					
Caudal carga (L/h)	1.20	0.05			FASE 2:		
Conc. Etanol vino (°GL)	12.0	0.1					
					Vel desap etanol 2	0.19	0.01
Etanol experimental (°GL)	5.0	0.1					
					FASE 3:		
FASE 2:							
					Vel desap etanol 3	0.21	0.01
Variación tpo vs volumen	0.0270	0.0001					
Etanol (°GL)	5.0	0.1			GLOBAL:		
FASE 3:					Vel desap etanol	0.21	0.02
Variación tpo vs etanol	0.208	0.010			ACIDEZ:		
					Volumen fase 1	5.2	0.1
ACIDEZ:					Volumen fase 2	7.2	0.1
					Volumen fase 3	8.0	0.1
Volumen final fase 1	6.4	0.1			Volumen medio	7.6	0.1
Volumen final fase 2	8.0	0.1					
Volumen final fase 3	8.0	0.1			<b>Vel apar acidez</b>	<b>0.20</b>	<b>0.01</b>
Volumen descargado	4.0	0.1			<b>Producción acidez</b>	<b>14.8</b>	<b>0.4</b>
Acidez final	10.2	0.1					

Figura V.4.6. Captura de pantalla de la hoja de cálculo realizada para la obtención de los valores de las velocidades y la producción del sistema.

El valor de la velocidad media global debe coincidir, siempre que no haya pérdidas de etanol por arrastre, con el valor de la velocidad estimada a partir de la acidez final del medio justo antes de la descarga, tal y como se muestra en la figura V.4.5.

## V.5. Conclusiones.

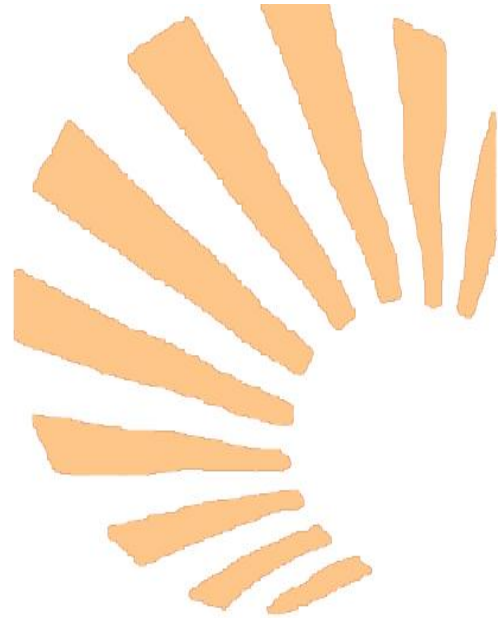
El método seguido es rápido y sencillo para estimar la velocidad media de acetificación en un ciclo típico semicontinuo de fabricación de vinagre.

Basándose en la evolución de etanol a lo largo del ciclo, medida que se obtiene on-line y, por lo tanto, de la que se dispone de una gran información, es posible evaluar la velocidad media de oxidación biológica en cada una de las diferentes fases por las que pasa el ciclo.

La disponibilidad de esta información permite cuantificar perfectamente la actividad de las bacterias a lo largo del ciclo y cómo se ve afectada ésta al variar las condiciones de trabajo. En este sentido, y en el contexto de un estudio de optimización de las variables operacionales del proceso, esta información permite analizar qué fase es la más sensible ante los posibles cambios inherentes a diferentes valores de las variables operacionales.







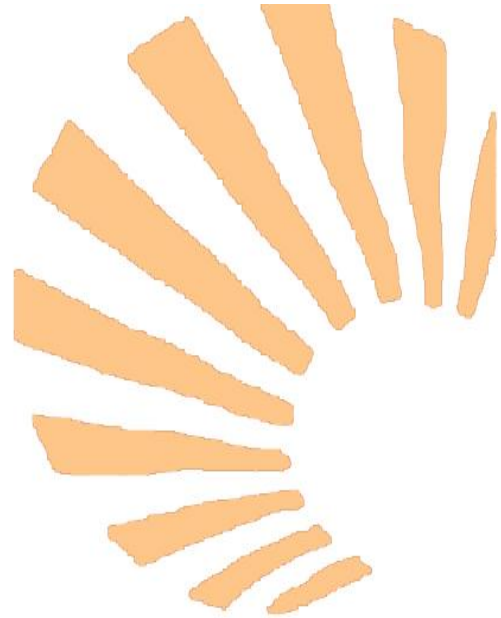
## **CAPÍTULO VI**

# **PUBLICACIÓN – ESTIMACIÓN DE VELOCIDAD MEDIA**

---

**VI.1. Estimating the mean acetification rate via on-line monitored changes in ethanol during a semi-continuous vinegar production cycle.**

García-García, I., Cantero-Moreno, D., Jiménez-Ot, C., Baena-Ruano, S., Jiménez-Hornero, J.E., Santos-Dueñas, I.M., Bonilla-Venceslada, J.L., Barja, F. (2007). ESTIMATING THE MEAN ACETIFICATION RATE VIA ON-LINE MONITORED CHANGES IN ETHANOL DURING A SEMI-CONTINUOUS VINEGAR PRODUCTION CYCLE. *Journal of Food Engineering* 80, 460-464. ELSEVIER. ISSN: 0260-8774.



## **CAPÍTULO VII**

# **HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y CONCLUSIONES - EJEMPLOS**



Con la metodología desarrollada, se pueden abordar, tal y como se ha referido previamente, diversos tipos de investigaciones sobre el proceso de elaboración de vinagre de vino y otros tipos de procesos de acetificación.

A modo de ejemplo, a continuación se hará referencia a dos trabajos desarrollados por el grupo en el contexto de un estudio amplio sobre la elaboración de vinagre de vino que tiene, como último objetivo, optimizar dicho proceso. En concreto, en primer lugar nos referiremos al estudio:

“Relationship between changes in total concentration of acetic acid bacteria and major volatile compounds during the acetic acid fermentation of white wine” *J Sci Food Agric* 2010; 90:2675-2681.

### **VII.1.1. Resumen.**

En este trabajo se realiza, por primera vez, un estudio detallado de la evolución a lo largo del ciclo de algunos de los principales compuestos volátiles que se detectan durante el ciclo de elaboración de vinagre de vino. Esta información puede ayudar a comprender mejor el complejo proceso de bio-oxidación que llevan a cabo estas bacterias. Además, la determinación simultánea de la evolución de la concentración de células, permitió detectar por primera vez también, que al final de los ciclos se producen unas oscilaciones en la concentración de éstas que podrían ser debidas a mecanismos celulares de supervivencia dadas las condiciones extremas que existen en dichos momentos del ciclo de acetificación: escasez de nutrientes y elevada acidez. También, es de especial interés, indicar que las oscilaciones celulares referidas son coincidentes con oscilaciones similares en la mayoría de los compuestos volátiles analizados, lo que sugiere una relación entre ambos hechos.

### **VII.1.2. Introducción.**

El vinagre de vino es un producto cada vez más valorado debido a su calidad y riqueza sensorial. De hecho, en zonas productoras de vinos, donde tradicionalmente fue considerado como un subproducto de la elaboración de éstos, hoy día se le considera al mismo nivel que los productos comercializados tradicionalmente<sup>314</sup> y, en este sentido, se exigen rigurosos métodos de análisis y

---

<sup>314</sup> Durán-Guerrero E. (2008). “Control de los procesos de elaboración, calidad y trazabilidad del Vinagre de Jerez”. Tesis Doctoral. Puerto Real, Cádiz, Spain.

de control de los procesos de elaboración que mejoren la calidad del producto final y permitan describir y discriminar el producto<sup>315, 316</sup>.

Uno de los aspectos claves que define las propiedades sensoriales de este producto es su aroma, siendo éste el resultado del efecto conjunto de múltiples compuestos volátiles<sup>317, 318, 319, 320</sup>. La composición final de estos compuestos depende de la materia prima empleada, de los procedimientos seguidos para llevar a cabo la fermentación alcohólica y posterior oxidación biológica, así como del proceso de envejecimiento final si lo hubiere. En muchos casos, incluso en vinagres sujetos a denominación de origen, la etapa de oxidación biológica se lleva a cabo en modernos fermentadores industriales en los que se aplica una aireación importante al medio de cultivo. A pesar de la eficacia con la que se puede llevar a cabo el proceso de aireación, el riesgo de arrastre de compuestos volátiles es evidente, pudiendo afectar de esta forma a la calidad final del producto. No obstante, la existencia de condensadores de volátiles en la salida de gases del sistema, así como, la posibilidad de llevar a cabo la aireación buscando un óptimo aprovechamiento del oxígeno introducido en el fermentador, pueden conseguir una importante disminución en el arrastre de volátiles.

Aunque, como se ha comentado, la composición puede ser muy variable, en general, suelen ser mayoritarios los alcoholes superiores, ésteres y algunos aldehidos y cetonas. En concreto, y sin pretender ser exhaustivo se pueden citar: acetoina (3-hidroxi-2-butanona), acetaldehido, lactato de etilo,

---

<sup>315</sup> Callejon, R.M.; Morales, M.L.; Troncoso, A.M. y Ferreira, A.C.S. (2008). “Targeting key aromatic substances on the typical aroma of Sherry vinegar”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(15), 6631-6639.

<sup>316</sup> Tesfaye, W.; Morales, M.L.; García-Parrilla, M.C. y Troncoso, A.M. (2009). “Improvement of Wine Vinegar Elaboration and Quality Analysis: Instrumental and Human Sensory Evaluation”. *Food Reviews International* 25(2), 142-156.

<sup>317</sup> Blanch, G.P.; Tabera, J.; Sanz, J.; Herraiz, M. y Reglero, G. (1992). “Volatile composition of vinegars - simultaneous distillation extraction and gas-chromatographic mass-spectrometric analysis”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40(6), 1046-1049.

<sup>318</sup> Tesfaye, W.; Morales, M.L.; García-Parrilla, M.C. y Troncoso, A.M. (2009) “Jerez Vinegar”. In: *Vinegars of the World*, Solieri L and Giudici P Eds. Springer-Verlag Italia S.r.l.: Milan, Italy, 180-195.

<sup>319</sup> Troncoso, A.M. (2006). “Evaluación fisicoquímica y sensorial de vinagres”. In: *Second Symposium on R+D+I for Vinegar Production*, García-García I Ed. Servicio Publicaciones de la Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain, 195-199.

<sup>320</sup> Duran-Guerrero, E.; Marin, R.N.; Mejias, R.C. y Barroso, C.G. (2007). “Stir bar sorptive extraction of volatile compounds in vinegar: Validation study and comparison with solid phase microextraction”. *Journal of Chromatography A* 1167, 18-26.



2,3-butanodiol, alcoholes isoamílicos (3-metil-1-butanol y 2-metil-1-butanol), acetato de etilo, metanol, 2-feniletanol, etc<sup>321</sup>.

Así por ejemplo, el acetaldehído, es un compuesto intermedio del catabolismo de los substratos carbonados utilizados por las bacterias acéticas<sup>322</sup>. En concreto, se obtiene tanto por oxidación del etanol como a partir del piruvato, el cual, a su vez, se puede generar a partir de azúcares (si los hubiere) por la vía de Entner-Doudoroff o bien a partir de lactato, especialmente cuando el contenido en etanol es bajo<sup>323</sup>.

Por otro lado, la acetoina es un producto que se genera de forma importante durante la acetificación, de hecho, se la suele considerar como un indicativo del origen biológico del vinagre debido a la interrelación existente entre su síntesis y el metabolismo celular<sup>324</sup>.

Otros compuestos importantes son los alcoholes. Entre éstos, los isoamílicos, suelen experimentar un consumo a medida que se produce la acetificación de vinos<sup>325</sup>. Por el contrario, otros tales como el 2,3-butanodiol (en sus formas levo y meso), a pesar de que en vinos parece posible su oxidación a acetoina<sup>326</sup>, en este trabajo no se ha observado variación significativa respecto al vino de partida.

Otros compuestos importantes en cuanto a la concentración en la que se pueden encontrar así como en la influencia que suelen ejercer sobre el aroma, son los ésteres. En vinagre de vino, suele destacar la presencia de algunos de ellos entre los que, a modo de ejemplo, se pueden citar los siguientes: lactato de etilo, succinato de dietilo, acetato de etilo, acetato de metilo, acetato de

---

<sup>321</sup> Callejon, R.M.; Torija, M.J.; Mas, A.; Morales, M.L. y Troncoso, A.M. (2010). "Changes of volatile compounds in wine vinegars during their elaboration in barrels made from different woods". *Food Chemistry* 120(2), 561-571.

<sup>322</sup> Bidan, P.; Divies, C. y Cachon, R. (2000). "Microorganismos de alteración de los vinos". In: *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*, Flanzky C Ed. A Madrid Vicente Ediciones and Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, Spain, 344-356.

<sup>323</sup> Morales, M.L.; Gonzalez, G.A.; Casas, J.A. y Troncoso, A.M. (2001). "Multivariate analysis of commercial and laboratory produced Sherry wine vinegars: influence of acetification and aging". *European Food Research and Technology* 212(6), 676-682.

<sup>324</sup> Polo, M.C. y SánchezLuengo, A.A. (1991). "Las bacterias acéticas". In: *El vinagre de vino*, Llaguna, C. y Polo, M.C. Eds. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain, 25-47.

<sup>325</sup> Nieto, J.; González-Viñas, M.A.; Barba, P.; Martín-Álvarez, P.J.; Aldave, L.; García-Romero, E. y Cabezudo, M.D. (1993). "Recent progress in wine vinegar R&D and some indicators for the future", In: *Food Flavour, Ingredients and Composition*, Charalombous G, Ed. Elsevier Science, New York, 469-499.

<sup>326</sup> Véase referencia nº 318 página 154.

isoamilo, etc<sup>327</sup>. Además, algunos de ellos, en concreto, el acetato de isoamilo y el acetato de etilo, están entre los compuestos con mayor valor de la actividad aromática (OAV)<sup>328</sup>.

Aunque existe una amplia bibliografía sobre composición de compuestos volátiles en vinagres, sólo en un caso (hasta donde tenemos conocimiento)<sup>329</sup>, se ha realizado algún estudio relacionado con su evolución a lo largo del proceso de acetificación biológica. Aunque la referencia indicada recoge un amplio e interesante trabajo, sólo se tomaron muestras al principio, a mitad y al final del ciclo, no se presentan datos que permitan obtener información, de una forma más continua, sobre la evolución de los diferentes compuestos a lo largo de ciclo y, poder así, detectar posibles alteraciones en la evolución aparente que presentan. Recientemente, han investigado los cambios producidos en compuestos volátiles de vinagres de vino tinto y balsámicos en barriles de madera y botellas, pero muestran los resultados del principio y del final<sup>330</sup>.

Por otro lado, en ningún trabajo previo se ha estudiado la relación de estos compuestos con la evolución de los microorganismos a lo largo del ciclo. La existencia o no de relación entre ambos podría ayudar a dilucidar el grado de relación entre la síntesis y evolución de estos compuestos con la actividad biológica y química que se produce en el sistema.

### **VII.1.3. Objetivo.**

Así pues, en este trabajo se ha abordado el estudio de la evolución de algunos de los compuestos volátiles más importantes en el vinagre de vino y se ha estudiado su posible relación con la evolución de la concentración de células totales a lo largo del ciclo.

### **VII.1.4. Resultados y conclusiones.**

Los materiales y métodos utilizados pueden encontrarse en el artículo publicado que se adjunta. A continuación se comentarán los principales aspectos de los resultados obtenidos.

---

<sup>327</sup> Véase referencia nº 283 página 69.

<sup>328</sup> Callejon, R.M.; Morales, M.L.; Ferreira, A.C.S. y Troncoso, A.M. (2008). “Defining the typical aroma of Sherry vinegar: Sensory and chemical approach”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(17), 8086-8095.

<sup>329</sup> Véase referencia nº 283 página 69.

<sup>330</sup> Callejon, R.M.; Tesfaye, W.; Torija, M.J.; Mas, A. Troncoso, A.M. y Morales, M.L. (2009). “Volatile compounds in red wine vinegars obtained by submerged and surface acetification in different woods”. *Food Chemistry* 113(4), 1252-1259.

La Figura VII.1. muestra la variación a lo largo del ciclo de las principales variables del sistema.

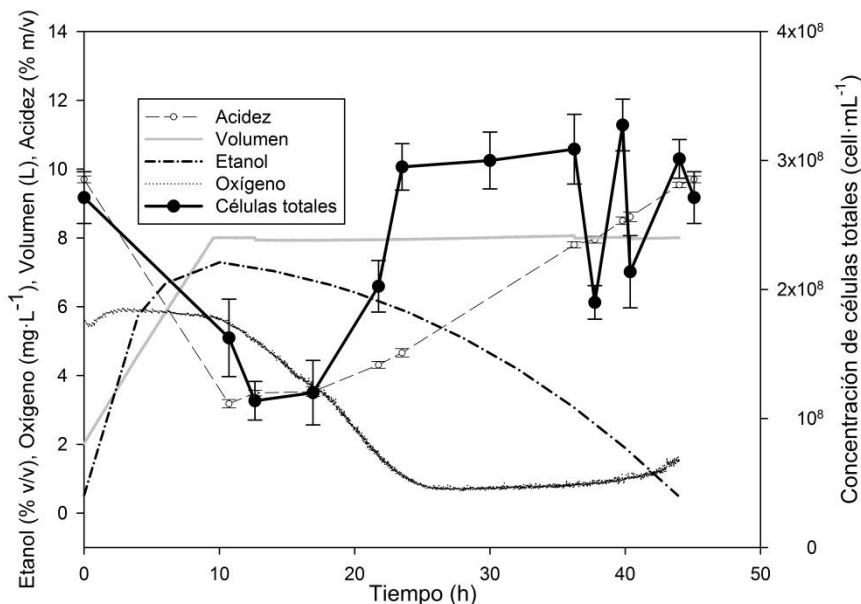


Figura VII.1. Evolución de la concentración de etanol, ácido acético, oxígeno disuelto y células totales, así como del volumen del medio durante el ciclo de acetificación.

Durante la fase de carga, que se extiende hasta las primeras 10 horas aproximadamente, se puede apreciar el aumento del volumen y de la concentración de etanol, por el contrario, debido al efecto de dilución que se produce, tanto la concentración celular como la acidez del medio experimentan una clara disminución. Igualmente, durante esta fase, las células de las bacterias acéticas han sido sometidas a un gran estrés debido al cambio brusco de las condiciones ambientales lo que provoca que, una vez finalizada la carga, aparezca una fase de adaptación lag que dura hasta las 18 horas de comenzada la carga. A partir de este momento, comienza la fase exponencial de crecimiento que dura unas 4 horas. La parte final del ciclo, es especialmente interesante desde el punto de vista de los cambios experimentados por las células. En efecto, en un trabajo previo<sup>331</sup> en el que se estudió la evolución de los aminoácidos a lo largo del ciclo productivo, estos cambios en la concentración celular se justificaron por fenómenos de lisis celular. Cuando se producía una disminución puntual en la concentración de células, aparecía simultáneamente, un aumento puntual en la concentración de muchos de los aminoácidos

<sup>331</sup> Maestre, O.; Santos-Duenas, I.; Peinado, R.; Jimenez-Ot, C.; Garcia-Garcia, I. y Mauricio, J.C. (2008). "Changes in amino acid composition during wine vinegar production in a fully automatic pilot acetator". *Process Biochemistry* 43, 803-807.

presentes en el sistema; este aumento se asociaba con la liberación de aminoácidos a través de mecanismos de autólisis. Igualmente, el fenómeno contrario también era evidente (aumento de la concentración de células y disminución de la concentración de aminoácidos). Estos hechos, podían indicar, o ser prueba, de una compleja respuesta celular ante condiciones de estrés para asegurar la supervivencia de la población: Muerte Celular Programada. De esta manera, la muerte de las células, contribuye a la supervivencia de otras gracias al aporte de nutrientes que liberan tras la lisis celular.

En el presente trabajo, se estudia el comportamiento experimentado por algunos compuestos de gran importancia para las propiedades sensoriales del vinagre<sup>332</sup>. En la Figura VII.2. se muestran estos compuestos así como sus concentraciones en el vino de partida y en el vinagre obtenido al final del ciclo.

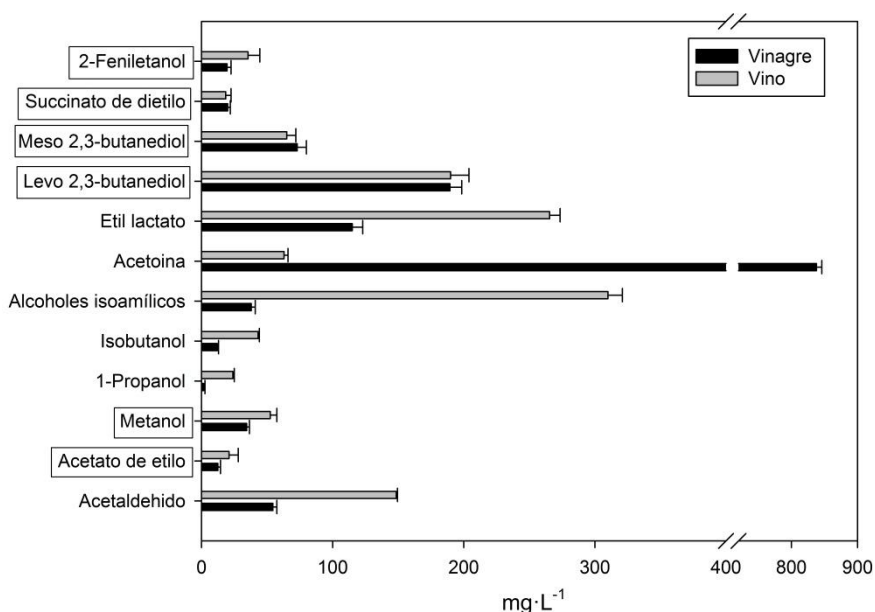


Figura VII.2. Contenido en compuestos volátiles del vino de partida y del vinagre obtenido.

Mientras que en los casos indicados con un recuadro no se encuentran cambios significativos, en los demás, salvo en el caso de la acetoina, se producen importantes consumos relativos respecto al vino de partida.

Como se sabe, la acetoina es un producto característico de la oxidación biológica del etanol por parte de las bacterias acéticas. Prácticamente se la

<sup>332</sup> Véase referencia nº 318 página 154.

puede encontrar en todos los tipos de vinagres, si bien su concentración puede ser muy variable. Por ejemplo, en vinagre de piña su contenido puede estar alrededor de  $2 \text{ mg L}^{-1}$ <sup>333</sup>, mientras que en vinagres tradicionales de vino, tipo Jerez<sup>334</sup>, o en algunos vinagres de sidra<sup>335</sup>, pueden estar alrededor de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  o, incluso, con valores superiores. Este compuesto se puede formar a través de diversos mecanismos<sup>336, 337</sup> como son: la condensación de dos moléculas de acetaldehído, a partir de piruvato y acetaldehído, y mediante la oxidación de 2-3-butanodiól.

En la Figura VII.3. se muestra, junto a la evolución celular, la variación de la concentración de acetoina.

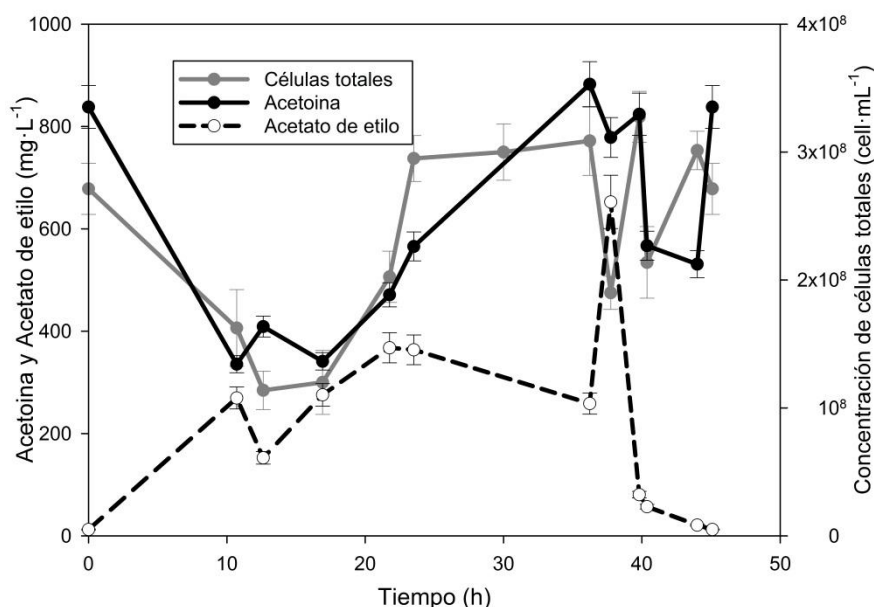


Figura VII.3. Variación de las concentraciones de acetoina, acetato de etilo y células totales a lo largo del ciclo de acetificación.

<sup>333</sup> Ou, A.S.M. y Chang, R.C. (2009). “Taiwan fruit vinegar”. En: *Vinegars of the World*, Solieri L and Giudici P Eds. Springer-Verlag Italia S.r.l.: Milan, Italy, 223-242.

<sup>334</sup> Morales, M.L.; Tesfaye, W.; Garcia-Parrilla, M.C.; Casas, J.A. y Troncoso, A.M. (2002). “Evolution of the aroma profile of sherry wine vinegars during an experimental aging in wood”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(11), 3173-3178.

<sup>335</sup> Llaguno, C. (1991). “Definición y tipos de vinagre”. En: *El vinagre de vino*, Llaguno C and Polo MC Eds. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain, 133-145.

<sup>336</sup> Véase referencia nº 318 página 154.

<sup>337</sup> Véase referencia nº 324 página 155.

Como se puede observar, siguen un comportamiento paralelo, prácticamente, en todo momento. Durante la fase de carga, y debido a su baja concentración en el vino de partida, se observa una disminución como consecuencia del efecto de dilución que implica esta fase. Por otro lado, resulta de especial interés las oscilaciones encontradas en la parte final del ciclo, estos cambios son coincidentes con los experimentados por la concentración de células totales y que, como se ha comentado previamente, se pueden deber a fenómenos de lisis celular por la disminución de nutrientes y aumento de la acidez del medio. La coincidencia entre ambas oscilaciones es una evidencia más del grado de relación entre la síntesis y evolución de este compuesto con la actividad biológica del sistema.

También, en la Figura VII.3., se muestra la evolución del acetato de etilo. Si bien la composición final de este compuesto en el vinagre final no presenta ninguna variación aparente respecto a la existente en el vino inicial, esto no significa que no haya experimentado algún cambio a lo largo del ciclo. En efecto, en la figura se puede observar la importante variación experimentada a lo largo de éste, la evolución inicial es diferente a la observada para el caso de la acetoina. En este caso, debido a la alta concentración de ácido acético así como del etanol en el medio, la formación de este compuesto puede ser, más probablemente, el resultado de una reacción química de esterificación externa a las células. A medida que se va añadiendo vino fresco durante la fase de carga, se aporta etanol al medio que reacciona con el ácido acético acumulado dando lugar a la citada reacción. Una vez finalizada la carga y cuando comienza a disminuir de forma significativa la concentración de etanol por el consumo de las bacterias acéticas, se va imponiendo la reacción inversa (hidrólisis del éster), esto implica el descenso de la concentración de acetato de etilo. Sin embargo, y aun siendo una reacción externa a las células, el comienzo de las oscilaciones en la concentración de éstas tiene un efecto importante en la concentración de acetato de etilo (por ejemplo, la liberación de acetato al medio debido a la ruptura de células, puede desplazar los equilibrios correspondientes hacia la formación del éster). Sin embargo, a pesar de las oscilaciones posteriores de la concentración celular, la escasez, cada vez mayor, de etanol en el medio, hace que la reacción de esterificación se vea más limitada y no se produzcan más aumentos en la concentración del éster asociados a la lisis celular.

En cuanto a los tres alcoholes representados en la Figura VII.4.:

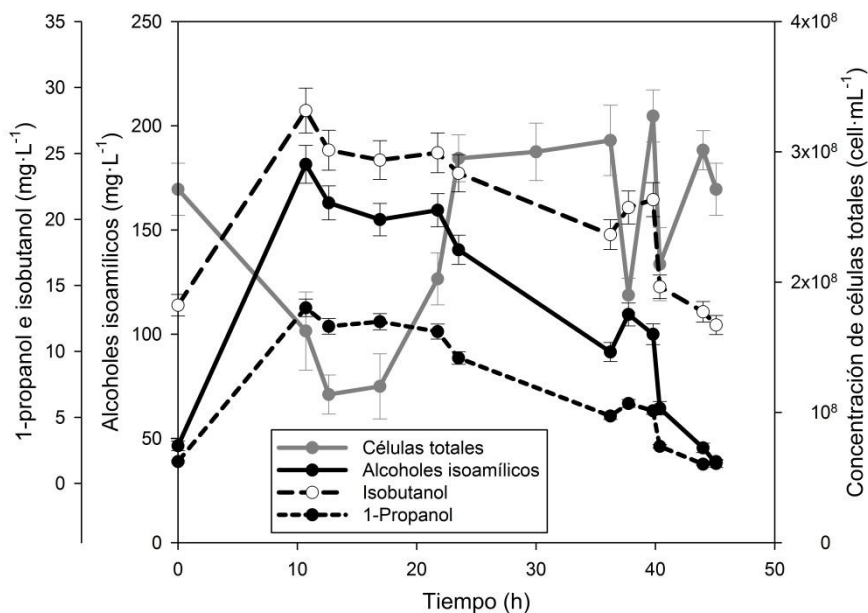


Figura VII.4. Variación de las concentraciones de alcoholes isoamílicos, isobutanol y 1-propanol y células totales a lo largo del ciclo de fermentación.

Se observa un aumento al principio del ciclo, consecuencia del aporte realizado durante la fase de carga teniendo en cuenta las concentraciones con las que éstos están en el vino de partida. Posteriormente, se pone en evidencia una tendencia general a disminuir que, dada su coincidencia con el aumento de la acidez del medio, puede sugerir que son las reacciones de esterificación con el ácido acético la causa principal que afecta a su evolución. Sin embargo, el pequeño aumento momentáneo, coincidente con el comienzo de las oscilaciones celulares, podría sugerir también la implicación de estos tres compuestos en el metabolismo celular.

Por otro lado, en la Figura VII.5. se puede apreciar que existe una clara relación entre la concentración celular y las de lactato y acetaldehído.

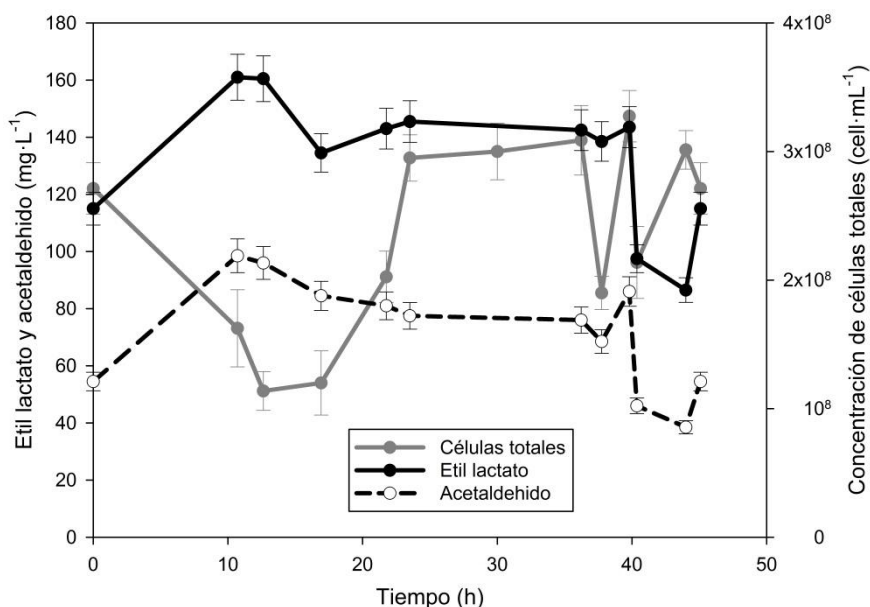


Figura VII.5. Variación de las concentraciones de etil lactato, acetaldehído y células totales a lo largo del ciclo de acetificación.

Este resultado era esperable si se tiene en cuenta la importancia del acetaldehído como compuesto intermedio en el metabolismo oxidativo del etanol y de otros compuestos en las bacterias acéticas<sup>338</sup>. Por otro lado, también es bien conocida la capacidad de éstas para utilizar lactato, que previa transformación en piruvato y luego a acetaldehído puede convertirse en acetato.

Para el resto de los compuestos evaluados (resultados mostrados en el artículo publicado) aunque no se encuentran diferencias significativas entre las concentraciones del vino y del vinagre final, de nuevo se ponen de manifiesto variaciones momentáneas de éstas durante los momentos finales del ciclo, sugiriendo la participación de estos compuestos en el metabolismo celular.

En definitiva, en el presente trabajo se aportan, por primera vez, datos más detallados sobre la evolución de determinados compuestos volátiles a lo largo del ciclo de acetificación biológica. Esta información ayuda a comprender mejor algunos de los cambios producidos en el complejo proceso biológico objeto de estudio. Por ejemplo, de esta forma, las oscilaciones observadas al final del ciclo en la concentración de células, explicadas como un mecanismo de adaptación y supervivencia celular, coinciden con alteraciones similares en las concentraciones de los productos estudiados, esta aparente relación podría servir, en estudios más detallados, como elemento adicional para discriminar la

<sup>338</sup> Véase referencia nº 322 página 155.



implicación de determinados compuestos con la actividad metabólica de las bacterias acéticas. Este tipo de estudios, hasta donde tenemos conocimiento no se han realizado hasta ahora.

A continuación, y como un segundo ejemplo de aplicación de la metodología desarrollada se hará referencia al trabajo:

“Influence of the final ethanol concentration on the acetification and production rate in the wine vinegar process” *J Chem Technol Biotechnol* 2010; 85:908-912

### **VII.2.1. Resumen.**

El proceso de acetificación de vino cuenta con un alto grado de desarrollo; muchas de las operaciones están completamente automatizadas gracias a la capacidad de medir y controlar la mayor parte de las variables del sistema. Sin embargo, sigue siendo necesario un estudio global de las variables que inciden sobre el proceso para fijar industrialmente sus valores óptimos de acuerdo con funciones objetivo técnicas y económicas.

Las variables operacionales que más influyen sobre el proceso, además de la temperatura, grado alcohólico del vino y del nivel de transferencia de oxígeno que se consiga, son: la concentración de etanol en el momento de la descarga, volumen de descarga y velocidad de carga. Distintos valores de estas variables suponen, en realidad y de forma simultánea, variación en la acidez del medio, concentración de etanol y en la concentración y actividad de las bacterias acéticas.

En este trabajo se ha estudiado la influencia que ejerce la concentración final de etanol en el momento de la descarga sobre la velocidad media de acetificación y por lo tanto sobre la productividad. Los resultados muestran que a medida que aumenta esta concentración de etanol, desde 0.5 hasta 3.5 % (v/v), la velocidad media de acetificación y producción de ácido acético aumentan en un 38 y 26 % respectivamente. Sin embargo, en la práctica no se podría trabajar dejando un producto con ese nivel de sustrato sin aprovechar; esto sugiere la optimización conjunta de los dos reactores en serie de los que habitualmente se dispone a nivel industrial. El primer reactor ha de trabajar con una concentración final en el momento de la descarga que implique una alta velocidad de acetificación pero garantizando que el segundo reactor finalice el agotamiento del sustrato antes de que tenga que recibir de nuevo la descarga del primer tanque. Este modo de trabajo puede conducir a velocidades medias globales de acetificación mayores de las que se obtienen habitualmente cuando el sustrato se agota mucho más en el primer reactor.

## VII.2.2. Introducción.

A nivel industrial, el vinagre de vino se produce, principalmente, mediante un cultivo sumergido de bacterias acéticas siguiendo un modo semi-continuo de trabajo<sup>339, 340</sup>.

En concreto, cuando se alcanza una determinada graduación alcohólica, se descarga un porcentaje del volumen total del medio de cultivo, y el medio restante actúa como inóculo para la siguiente carga; de esta forma se pueden conseguir vinagres de elevada graduación, se aprovecha parte de la biomasa generada en cada carga para fermentar rápidamente la siguiente y se establecen unos cambios en las condiciones del medio que favorecen y seleccionan a los organismos más adecuados para el proceso<sup>341, 342, 343, 344, 345, 346</sup>.

Normalmente se emplean dos biorreactores en serie, actuando el segundo como reactor de agotamiento del etanol no consumido en el primero. Si, con la finalidad de conseguir un alto rendimiento en la transformación, se agotara el etanol en el primer reactor, las células quedarían muy afectadas por las condiciones de escasez de sustrato y la alta acidez existente en el medio; esto dificultaría mucho su reutilización en la siguiente carga.

Este modo de trabajo implica la existencia de diversas variables operacionales sobre las que se tiene un mayor margen de actuación como son: concentración de etanol en el momento de la descarga, volumen de descarga y velocidad de carga. Distintos valores de estas variables influyen sobre la concentración y actividad de las bacterias acéticas dado que, en realidad y de forma simultánea, suponen una variación en la acidez, concentración de etanol, aporte de oxígeno e incluso de la temperatura del medio. Aunque se ha alcanzado un importante grado de conocimiento y desarrollo tecnológico en el proceso de elaboración de vinagre, todavía es necesario alcanzar una optimización respecto al valor de estas variables dada la influencia que pueden ejercer sobre la velocidad de fermentación. En este trabajo se presentan los resultados obtenidos del estudio realizado sobre la influencia de la

---

<sup>339</sup> Véase referencia nº 208 página 51.

<sup>340</sup> Hromatka, O.; Ebner, H. (1951). "Investigations of the vinegar fermentation III. The influence of aeration on submerged fermentation". *Enzymologia* 15, 57-69.

<sup>341</sup> Véase referencia nº 13 página 6.

<sup>342</sup> Véase referencia nº 224 página 52.

<sup>343</sup> Véase referencia nº 221 página 52.

<sup>344</sup> Véase referencia nº 31 página 15.

<sup>345</sup> Véase referencia nº 223 página 52.

<sup>346</sup> Véase referencia nº 4 página 3.

concentración de etanol en el momento de la descarga sobre la velocidad global de proceso.

### VII.2.3. Resultados y discusión.

En el artículo publicado que se adjunta se pueden encontrar los detalles relativos a la metodología seguida.

El modo más habitual de producción de vinagre de vino sigue, como se ha comentado, un modo semi-continuo de fermentación en el que se realizan descargas periódicas de parte del medio fermentación; desde el punto de vista de la velocidad global de fermentación, una de las variables que más influye es la concentración de etanol existente en el momento de realizar la descarga. Nótese que cuanto más se agota el medio en etanol, mayor es la acidez acumulada y las bacterias pueden expresar su sensibilidad a este compuesto. En este trabajo se ha estudiado la influencia de cuatro concentraciones diferentes de etanol, en concreto se han investigado las concentraciones de 0.5, 1.5, 2.5 y 3.5 % (v/v).

Tabla VII.2.1. Valores experimentales de: duración de cada fase, tiempo final del ciclo, acidez final y volumen medio global para las diferentes condiciones estudiadas. Se indican las desviaciones estándar.

Concentración final de etanol, % (v/v)	0.5	1.5	2.5	3.5
Número de ciclos repetidos	6	8	10	29
Duración de la fase de carga rápida, h	2.5 ± 0.1	2.1 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.9 ± 0.1
Duración de la fase de carga lenta, h	6.8 ± 0.4	8.3 ± 0.7	8.9 ± 0.6	11.0 ± 0.8
Duración de la fase de producción, h	22.6 ± 0.9	16.9 ± 0.8	12.0 ± 0.9	6.8 ± 1.2
Duración del ciclo, h	31.9 ± 0.8	27.3 ± 0.4	22.3 ± 0.5	18.7 ± 0.9
Acidez final (como ácido acético), % (m/v)	11.0 ± 0.2	10.1 ± 0.2	9.2 ± 0.15	8.1 ± 0.1
Volumen medio, L	7.68 ± 0.06	7.54 ± 0.03	7.37 ± 0.02	7.00 ± 0.02

Tal y como se ha explicado con más detalle en uno de los trabajos previos, este modo operativo implica diferentes fases a lo largo del ciclo: una

etapa rápida de carga, una más lenta y finalmente una fase de producción. En la tabla VII.2.1. se pueden encontrar los detalles correspondientes a los experimentos realizados.

Dado que el objetivo principal del trabajo es comparar la influencia de las condiciones experimentales estudiadas sobre la velocidad global del proceso, es necesario evaluar esta velocidad. Siguiendo el procedimiento descrito en el trabajo previo antes referido, se han determinado las velocidades de fermentación en las diferentes etapas. En la tabla VII.2.2. se recogen los valores obtenidos para todos los casos; igualmente se presentan los valores correspondientes a la producción de ácido acético ( $P_A$ , g ácido acético/h):

Tabla VII.2.2. Valores calculados de las velocidades medias de desaparición de etanol en cada fase, global de desaparición de etanol y de formación de ácido acético y la producción de ácido acético. Se indican las desviaciones estándar.

Concentración final de etanol, % (v/v)	0.5	1.5	2.5	3.5
$(-r_E)_{CR}$ , % (v/v)·h <sup>-1</sup>	0.13 ± 0.10	0.23 ± 0.24	0.20 ± 0.17	0.29 ± 0.29
$(-r_E)_{CL}$ , % (v/v)·h <sup>-1</sup>	0.15 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.28 ± 0.01
$(-r_E)_A$ , % (v/v)·h <sup>-1</sup>	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.01
$(-r_E)_{global}$ , % (v/v)·h <sup>-1</sup>	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.26 ± 0.03
$(r_A)_{global}$ , % (m/v)·h <sup>-1</sup>	0.18 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.25 ± 0.01
$P_{A global}$ , g ácido acético·h <sup>-1</sup>	13.8 ± 0.4	14.8 ± 0.4	16.5 ± 0.5	17.4 ± 0.9

siendo:

$(-r_E)_{CR}$ : velocidad media de desaparición de etanol durante la etapa de carga rápida [% (v/v)·h<sup>-1</sup>].

$(-r_E)_{CL}$ : velocidad media de desaparición de etanol durante la etapa de carga lenta [% (v/v)·h<sup>-1</sup>].

$(-r_E)_A$ : velocidad media de desaparición de etanol durante la etapa de agotamiento [% (v/v)·h<sup>-1</sup>].

$(-r_E)_{global}$ : velocidad media global de desaparición de etanol durante el ciclo [% (v/v)·h<sup>-1</sup>].

$(r_A)_{\text{global}}$ : velocidad media de formación de ácido acético [% (m/v)·h<sup>-1</sup>].

$P_{A \text{ global}}$ : Producción global de ácido acético [g ácido acético·h<sup>-1</sup>].

Como se puede observar, se produce un claro aumento de la velocidad global de acetificación y de la producción a medida que aumenta el valor de la concentración final de etanol en el momento de la descarga.

Si se tiene en cuenta la sensibilidad de las bacterias acéticas tanto al sustrato como al producto, así como a los cambios en el medio de cultivo, es de esperar comportamientos diferentes para cada una de las condiciones experimentales estudiadas<sup>347, 348, 349</sup>. En efecto, los experimentos realizados (resultados y figuras adicionales aclaratorias se pueden encontrar en el trabajo publicado) implican condiciones diferentes en los valores medios de acidez y de etanol así como en la acidez máxima alcanzada; la forma con la que evoluciona la acidez para los diferentes casos es muy similar, la principal diferencia está en los valores alcanzados hacia el final del ciclo. Los valores medios de acidez más altos implican necesariamente valores medios de etanol más bajos, ambas realidades pueden influir de forma negativa sobre la velocidad global del proceso, el etanol por su carácter de sustrato limitante y el ácido acético dado su potencial inhibidor que se expresa más claramente a medida que aumenta su concentración. Por otro lado, también pueden influir los cambios experimentados desde el momento de la descarga hasta el final de la fase de carga; estos cambios son más bruscos a medida que el agotamiento del sustrato es mayor.

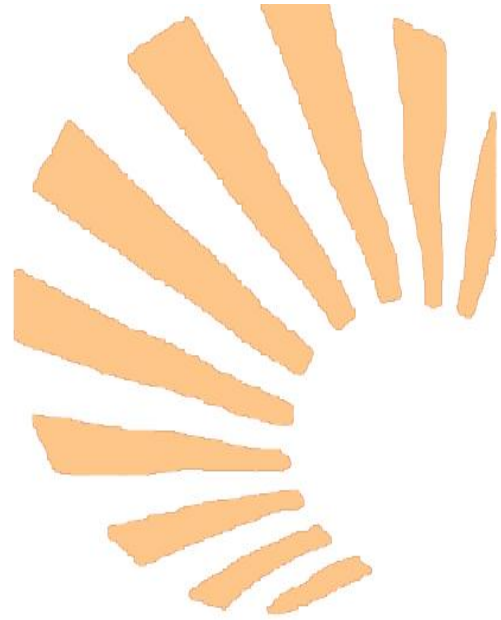
Desde el punto de vista de la consecución de altas velocidades del proceso, los resultados anteriores indican que se ha de trabajar con concentraciones de etanol altas en el momento de la descarga, sin embargo, este modo de trabajo implicaría una pérdida importante en el rendimiento de la acetificación dada la importante concentración de etanol en el líquido de descarga. Este problema podría resolverse si se tiene en cuenta que, en la práctica, el proceso seguido implica la existencia de dos biorreactores en serie, actuando el segundo como reactor de agotamiento para el etanol residual proveniente del primero; así pues, se podría optimizar el funcionamiento de estos dos reactores de modo que el primer reactor descargue con una alta concentración de etanol y el segundo pueda culminar el agotamiento antes de que tenga que recibir de nuevo la descarga desde el primero.

---

<sup>347</sup> Véase referencia nº 165 página 36.

<sup>348</sup> Véase referencia nº 177 página 37.

<sup>349</sup> Véase referencia nº 179 página 37.



## **CAPÍTULO VIII**

# **PUBLICACIONES – EJEMPLOS DE APLICACIÓN**





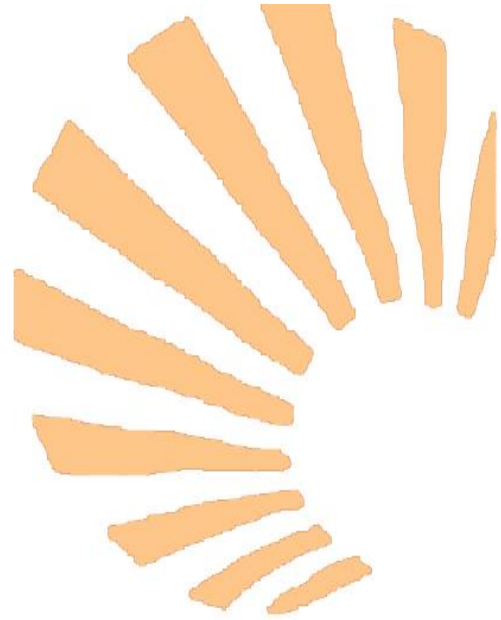


**VIII.1. Relationship between changes in the total concentration of acetic acid bacteria and major volatile compounds during the acetic acid fermentation of white wine.**

Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E., Bonilla-Venceslada, J.L., Álvarez-Cáliz, C., García-García, I. (2010). INFLUENCE OF THE FINAL ETHANOL CONCENTRATION ON THE ACETIFICATION AND PRODUCTION RATE IN THE WINE VINEGAR PROCESS. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85, 908-912. JOHN WILEY & SONS LTD. ISSN: 0268-2575.

**VIII.2. Influence of the final ethanol concentration on the acetification and production rate in the wine vinegar process.**

Baena-Ruano, S., Santos-Dueñas, I.M., Mauricio, J.C., García-García, I. (2010). RELATIONSHIP BETWEEN CHANGES IN THE TOTAL CONCENTRATION OF ACETIC ACID BACTERIA AND MAJOR VOLATILE COMPOUNDS DURING THE ACETIC ACID FERMENTATION OF WHITE WINE. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 2675-2681. JOHN WILEY & SONS LTD. ISSN: 0022-5142.



**ANEXO I**

**MATERIALES Y  
MÉTODOS GENERALES**



En este capítulo se describen los métodos analíticos utilizados para la caracterización de la materia prima y del producto obtenido, así como el equipo experimental, modo de trabajo y solución específica desarrollada para el seguimiento y automatización del proceso.

### **A1.1. MATERIA PRIMA.**

Se ha utilizado un vino blanco de la zona Montilla-Moriles (Córdoba) con una concentración de etanol de  $12.0 \pm 0.3$  % (v/v) y una acidez inicial de  $0.2 \pm 0.1$  % (m/v).

### **A1.2. MICROORGANISMOS.**

Los microorganismos empleados proceden de un tanque industrial de fermentación en plena actividad que la empresa Deoleo S.A. tiene en su factoría de Alcolea (Córdoba). El inóculo utilizado consiste en un cultivo mixto de bacterias de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*, la especie predominante es *Gluconacetobacter europaeus*<sup>350</sup>.

### **A1.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS EXPERIMENTALES.**

Las variables determinadas experimentalmente han sido: grado acético (porcentaje masa/volumen) o acidez total, grado alcohólico volumétrico (porcentaje volumétrico de etanol) y concentración de volátiles mayoritarios y polioles. Se ha desarrollado y optimizado un método rápido para la determinación de la concentración de células totales y viables que se detalla en los capítulos III y IV de esta memoria.

#### **A1.3.1. Preparación de muestra.**

Todas las muestras han sido analizadas de forma inmediata en el momento de su toma sin realizar ningún tipo de tratamiento previo general.

---

<sup>350</sup> Fernández-Perez, R.; Torres, C.; Sanz, S. y Ruiz-Larrea, F. (2010). "Strain typing of acetic acid bacteria responsible for vinegar production by the submerged elaboration method". *Food Microbiology* 27, 973-978.

### **A1.3.2. Grado acético, % (m/v) o acidez total.**

Es la totalidad de los ácidos volátiles y fijos que contiene el vinagre, expresado en gramos de ácido acético por 100 mL de vinagre (% m/v), medidos a la temperatura de 20 °C<sup>351</sup>.

#### **A1.3.2.1. Fundamento.**

Volumetría de neutralización en presencia de fenolftaleína como indicador del punto final de la valoración (pH = 8.2).

#### **A1.3.2.2. Materiales y reactivos.**

- Montaje necesario para la determinación, ver figura A1.3.1., compuesto por:
  - Bureta de 25 mL graduada en décimas de mL con depósito superior.
- Hidróxido de sodio ~0.5 N.
- Erlenmeyer de 100 mL.
- Pipeta aforada de 5 mL de doble enrase.
- Agua destilada.
- Fenolftaleína, disolución indicadora 1 % en alcohol.

---

<sup>351</sup> García-Cazorla, J.; Xirau-Vayreda, M. y Azorín-Romero, R. (2005). “Técnicas usuales de análisis en Enología”. Panreac Química S.A., Barcelona, España.

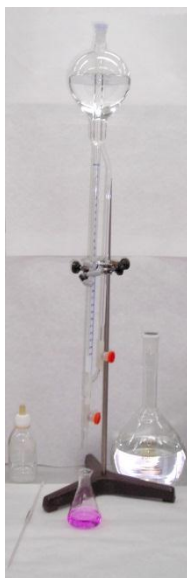


Figura A1.3.1. Fotografía del montaje empleado para la determinación del grado acético o la acidez total.

### A1.3.2.3. Preparación y estandarización de hidróxido sódico 0.5 N.

Para preparar una disolución de hidróxido sódico con una concentración de 0.5 N se parte del reactivo comercial al 98 %, se disuelven 20.41 g en agua destilada y se diluye a 1 L en un matraz aforado. Al no ser el hidróxido sódico un patrón primario, esta disolución solo será aproximadamente 0.5 N, por lo que es necesario estandarizarla para conocer exactamente su concentración.

La estandarización se realiza con un patrón primario, ftalato ácido de potasio. Como indicador de la titulación se emplea fenolftaleína.

Para gastar aproximadamente 15 mL de hidróxido sódico 0.5 N se deben pesar alrededor de 1.5 g de ftalato ácido de potasio, tal y como se muestra en la ecuación A1.3.1.

$$V_{\text{NaOH}} \cdot N_{\text{NaOH}} = \frac{m_{\text{ftalato}} \cdot 1000}{Pm_{(\text{ftalato})}} \quad [\text{Ec. A1.3.1.}]$$

siendo:

$V_{\text{NaOH}}$ : Disolución de hidróxido de sodio consumida en la valoración (mL).

$N_{\text{NaOH}}$  : Normalidad de la disolución de hidróxido de sodio.

$m_{(\text{ftalato})}$  : Peso de ftalato ácido de potasio (g).

$Pm_{(\text{ftalato})}$  : Peso molecular del ftalato ácido de potasio ( $204.23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

Se diluye el ftalato aproximadamente en 25 mL de agua destilada en un erlenmeyer de 125 mL, se añaden unas gotas de fenolftaleína al 1 % en alcohol y se valora con la disolución de hidróxido sódico 0.5 N preparada previamente. Se realiza esta valoración por triplicado

A partir de los pesos de ftalato y los volúmenes gastados de la disolución de hidróxido sódico en cada valoración se determina exactamente la normalidad de la disolución empleada.

$$N_{\text{NaOH}} = \frac{m_{\text{ftalato}} \cdot 1000}{Pm_{(\text{ftalato})} \cdot V_{\text{NaOH}}} \quad [\text{Ec. A1.3.2.}]$$

#### A1.3.2.4. Procedimiento.

Se toman 5 mL de muestra, se colocan en un erlenmeyer, se diluye aproximadamente con 25 mL de agua destilada, se añaden dos gotas de fenolftaleína y se valora lentamente con la disolución de hidróxido de sodio contenida en la bureta.

#### A1.3.2.5. Cálculo.

El grado acético o acidez total de vinagre se expresa en g de ácido acético en 100 mL de vinagre (% m/v).

$$\text{Acidez} = \frac{V_{\text{NaOH}} \cdot N_{\text{NaOH}} \cdot Pm_{(\text{HAc})}}{v \cdot 10} \quad [\text{Ec. A1.3.1}]$$

siendo:

Acidez : Concentración de ácido acético, g de ácido acético en 100 mL (% m/v).

$V_{\text{NaOH}}$  : Disolución de hidróxido de sodio consumida en la valoración (mL).

$N_{\text{NaOH}}$  : Normalidad de la disolución de hidróxido de sodio.

$P_{m(\text{HAc})}$  : Peso molecular del ácido acético ( $60 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

$v$  : Volumen de muestra (mL).

### **A1.3.3. Grado alcohólico volumétrico o % (v/v) de etanol.**

Es el número de litros de etanol y de sus homólogos (metanol, alcoholes superiores, 2,3-butanodiol, etc.) contenidos en 100 L de vino (% v/v), medidos ambos volúmenes a la temperatura de  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ <sup>352</sup>.

#### **A1.3.3.1. Método por destilación y aerometría.**

##### **A1.3.3.1.1. Fundamento.**

Destilación del medio alcalinizado y determinación del grado alcohólico en el destilado por aerometría. Se usan aerómetros (alcohómetros o alcoholímetros) específicos para el vino y sus derivados, graduados en % (v/v), fabricados y certificados por los laboratorios Dujardin-Salleron.

##### **A1.3.3.1.2. Material y reactivos.**

- Montaje de destilación, ver figura A1.3.2. y A1.3.3., compuesto por:
  - Manta calefactora.
  - Borbotador de vapor de agua.
  - Plataforma con tornillos de nivelación.
  - Matraz de destilación, de fondo redondo y 1 L de capacidad.
  - Columna rectificadora.
  - Refrigerante terminado en un tubo afilado para conducir el destilado al fondo del matraz aforado receptor, sumergido en agua-hielo, que deberá contener algunos mililitros de agua.
- Matraz aforado de 250 mL.
- Termómetro contrastado de  $0\text{-}35 \text{ }^\circ\text{C}$ , con apreciación  $0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ .
- Probetas de 10 y 250 mL.
- Aerómetro contrastado de clase I, graduado entre 0 y 10 % (v/v), y de clase II, graduado entre 6 y 16 % (v/v).

---

<sup>352</sup> Véase referencia nº 351 página 186.



- Óxido de calcio natural, disolución de 120 g en 1 L de agua destilada.
- Esferas de vidrio poroso.
- Agua destilada.

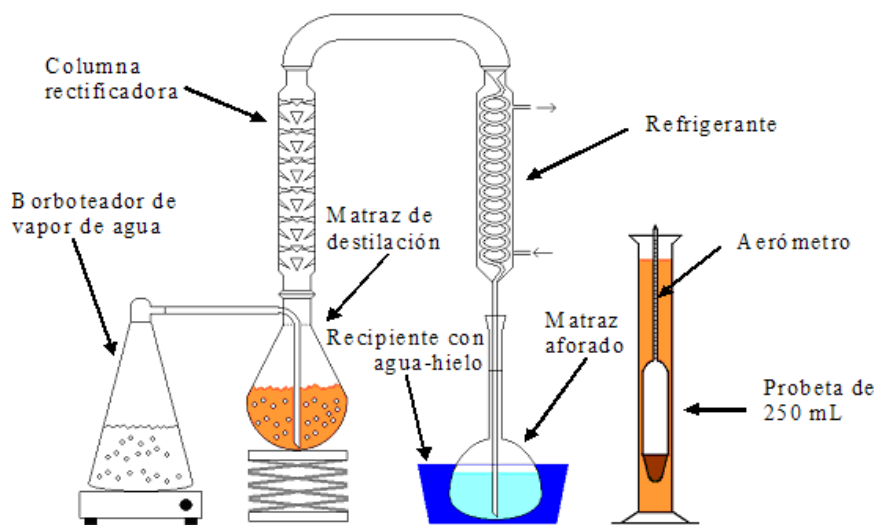


Figura A1.3.2. Esquema del aparato de destilación y aerómetro.



Figura A1.3.3. Fotografía del aparato de destilación y uno de los aerómetros empleados para la medida del grado alcohólico volumétrico.

- Tabla de corrección de la temperatura sobre el grado alcohólico aparente (ver Tabla A1.3.1.).

Los aerómetros se han de limpiar sucesivamente con: disolución alcohólica de hidróxido de potasio  $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , disolución de ácido clorhídrico diluido 1:10 y agua destilada.

#### A1.3.3.1.3. Procedimiento.

Se llena un matraz aforado de 250 mL con la muestra. Se pasa el contenido al matraz de destilación, evitando toda pérdida, y se lava 4 veces el matraz aforado con unos 5 mL de agua destilada cada vez, que se agregan al matraz de destilación. Se añade una cantidad suficiente de una suspensión de óxido de calcio para alcalinizar la muestra y unos fragmentos de vidrio poroso para regular la ebullición. Se destilan por arrastre de vapor de agua aproximadamente 200 mL, los cuales se recogen en el mismo matraz de 250 mL empleado para tomar la muestra. Después de agitar se llena hasta el volumen inicial de la muestra con agua destilada.

Para la determinación aerométrica, se colocan 200 mL del destilado en una probeta de 250 mL. Tras introducir el alcoholómetro y el termómetro, se agita para homogeneizar la temperatura. Un minuto después, comprobada la constancia de la temperatura, se realiza la lectura en la escala del alcoholómetro. Se hacen, al menos, tres lecturas del grado alcohólico.

### **A1.3.3.1.4. Cálculo.**

Para obtener el grado alcohólico internacional a 20 °C se ha de corregir la lectura aparente obtenida previamente. La tabla A1.3.1. indica las correcciones necesarias en función de la temperatura a la que se haya medido la muestra.

Tabla A1.3.1. Correcciones a efectuar sobre el grado alcohólico aparente para corregir la influencia de la temperatura<sup>353</sup>.

Tempe- ratura	SUMAR															RESTAR																
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
10°	0.84	0.87	0.88	0.92	0.96	1.01	1.08	1.16	1.24	1.34	1.44	1.58	1.73	1.89	2.06	2.24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11°	0.80	0.81	0.83	0.86	0.90	0.96	1.01	1.08	1.16	1.25	1.34	1.46	1.59	1.73	1.88	2.04	-	0.26	0.27	0.28	0.28	0.29	0.30	0.32	0.34	0.35	0.37	0.40	0.42	0.44	0.46	0.48
12°	0.74	0.76	0.78	0.80	0.84	0.88	0.94	1.00	1.07	1.15	1.23	1.32	1.43	1.55	1.68	1.82	-	0.41	0.42	0.43	0.44	0.45	0.47	0.49	0.51	0.54	0.60	0.63	0.67	0.71	0.74	
13°	0.67	0.69	0.70	0.73	0.76	0.80	0.85	0.90	0.95	1.02	1.10	1.18	1.28	1.38	1.48	1.60	-	0.56	0.57	0.58	0.59	0.61	0.64	0.67	0.70	0.73	0.77	0.81	0.85	0.89	0.94	0.99
14°	0.60	0.61	0.62	0.65	0.68	0.71	0.75	0.79	0.85	0.90	0.96	1.03	1.11	1.19	1.28	1.39	-	0.71	0.72	0.73	0.75	0.78	0.81	0.84	0.89	0.93	0.98	1.02	1.07	1.12	1.18	1.24
15°	0.51	0.52	0.54	0.56	0.58	0.61	0.64	0.68	0.72	0.77	0.82	0.87	0.94	1.01	1.09	1.17	-	0.86	0.88	0.91	0.93	0.96	1.00	1.04	1.09	1.14	1.19	1.24	1.30	1.36	1.43	1.51
16°	0.42	0.43	0.45	0.46	0.48	0.50	0.53	0.55	0.58	0.62	0.66	0.71	0.76	0.82	0.88	0.94	-	1.05	1.05	1.08	1.10	1.14	1.18	1.23	1.28	1.34	1.40	1.46	1.53	1.60	1.68	1.76
17°	0.32	0.33	0.34	0.35	0.37	0.39	0.41	0.43	0.46	0.48	0.51	0.55	0.58	0.63	0.67	0.71	-	1.22	1.22	1.25	1.28	1.33	1.38	1.44	1.50	1.56	1.62	1.68	1.75	1.83	1.92	2.02
18°	0.23	0.24	0.24	0.25	0.26	0.27	0.28	0.30	0.31	0.33	0.34	0.36	0.39	0.42	0.45	0.47	-	1.40	1.40	1.44	1.48	1.52	1.58	1.64	1.71	1.78	1.85	1.92	2.00	2.08	2.17	2.28
19°	0.11	0.12	0.12	0.13	0.13	0.13	0.14	0.15	0.16	0.16	0.17	0.18	0.20	0.21	0.23	0.24	-	1.59	1.59	1.62	1.66	1.71	1.77	1.85	1.93	2.00	2.07	2.15	2.23	2.33	2.45	2.55
20°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21°	-	0.13	0.13	0.13	0.14	0.14	0.15	0.15	0.16	0.17	0.18	0.19	0.20	0.21	0.23	0.24	-	0.13	0.13	0.13	0.14	0.14	0.15	0.15	0.16	0.17	0.18	0.19	0.20	0.21	0.23	0.24
22°	-	0.26	0.27	0.28	0.28	0.29	0.30	0.32	0.34	0.35	0.37	0.40	0.42	0.44	0.46	0.48	-	0.26	0.27	0.28	0.28	0.29	0.30	0.32	0.34	0.35	0.37	0.40	0.42	0.44	0.46	0.48
23°	-	0.41	0.42	0.43	0.44	0.45	0.47	0.49	0.51	0.54	0.56	0.60	0.63	0.67	0.71	0.74	-	0.41	0.42	0.43	0.44	0.45	0.47	0.49	0.51	0.54	0.56	0.60	0.63	0.67	0.71	0.74
24°	-	0.56	0.57	0.58	0.59	0.61	0.64	0.67	0.70	0.73	0.77	0.81	0.85	0.89	0.94	0.99	-	0.56	0.57	0.58	0.59	0.61	0.64	0.67	0.70	0.73	0.77	0.81	0.85	0.89	0.94	0.99
25°	-	0.71	0.72	0.73	0.75	0.78	0.81	0.84	0.89	0.93	0.98	1.02	1.07	1.12	1.18	1.24	-	0.71	0.72	0.73	0.75	0.78	0.81	0.84	0.89	0.93	0.98	1.02	1.07	1.12	1.18	1.24
26°	-	0.86	0.88	0.91	0.93	0.96	1.00	1.04	1.09	1.14	1.19	1.24	1.30	1.36	1.43	1.51	-	0.86	0.88	0.91	0.93	0.96	1.00	1.04	1.09	1.14	1.19	1.24	1.30	1.36	1.43	1.51
27°	-	-	1.05	1.08	1.10	1.14	1.18	1.23	1.28	1.34	1.40	1.46	1.53	1.60	1.68	1.76	-	-	1.05	1.08	1.10	1.14	1.18	1.23	1.28	1.34	1.40	1.46	1.53	1.60	1.68	1.76
28°	-	-	1.22	1.25	1.28	1.33	1.38	1.44	1.50	1.56	1.62	1.68	1.75	1.83	1.92	2.02	-	-	1.22	1.25	1.28	1.33	1.38	1.44	1.50	1.56	1.62	1.68	1.75	1.83	1.92	2.02
29°	-	-	1.40	1.44	1.48	1.52	1.58	1.64	1.71	1.78	1.85	1.92	2.00	2.08	2.17	2.28	-	-	1.40	1.44	1.48	1.52	1.58	1.64	1.71	1.78	1.85	1.92	2.00	2.08	2.17	2.28
30°	-	-	1.59	1.62	1.66	1.71	1.77	1.85	1.93	2.00	2.07	2.15	2.23	2.33	2.45	2.55	-	-	1.59	1.62	1.66	1.71	1.77	1.85	1.93	2.00	2.07	2.15	2.23	2.33	2.45	2.55

<sup>353</sup> Panreac Química S.A. (1990). “Productos derivados de la uva y similares: métodos oficiales de análisis”. Barcelona.

### **A1.3.3.2. Método ebulloscópico.**

#### **A1.3.3.2.1. Fundamento.**

El método ebulloscópico se basa en la variación del punto de ebullición que experimentan los líquidos hidroalcohólicos según su proporción de alcohol.

En condiciones normales (760 mm Hg  $\equiv$  1013 hPa) el punto de ebullición del agua es 100 °C y el del alcohol 78.5 °C. Una mezcla de alcohol y agua que se mantenga constante mediante un refrigerante a reflujo, hervirá a una temperatura tanto más próxima a la del agua cuanto menos alcohol contenga, y viceversa.

Se puede llegar a fijar la composición alcohólica de una mezcla atendiendo a las relaciones que podamos establecer entre el porcentaje de alcohol y la temperatura de ebullición. Los primeros ebullómetros fueron contruidos por Malligand en 1875 y Dujardin-Salleron en 1881<sup>354</sup>.

#### **A1.3.3.2.2. Material y reactivos.**

- Ebullómetro (ver figura A1.3.4., A1.3.5. y A1.3.6.):
  - Caldera metálica protegida por una envoltura para disminuir la pérdida de calor por radiación.
  - Refrigerante.
  - Termómetro contrastado cuya escala graduada abarca un intervalo de 86-100 °C, con apreciación de 0.05 °C.
  - Mechero de alcohol.
  - Regla deslizante o disco graduado de cálculo.
- Probeta de 15 y 50 mL.

---

<sup>354</sup> Véase referencia nº 351 página 186.

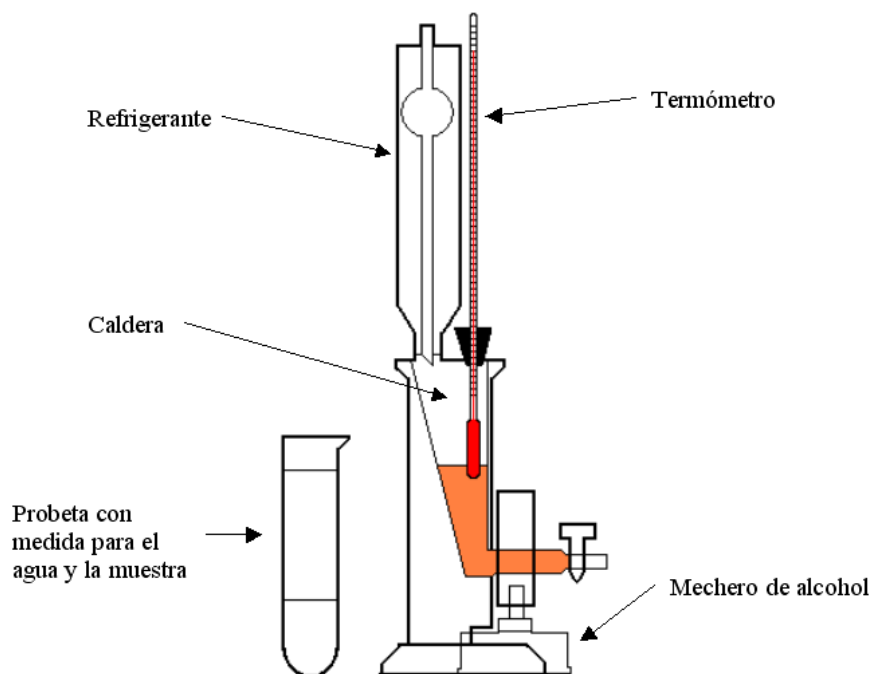


Figura A1.3.4. Esquema del ebullómetro de Dujardin-Salleron empleado.



Figura A1.3.5. Fotografía del ebullómetro de Dujardin-Salleron empleado.



Figura A1.3.6. Fotografía de la regla deslizable o disco de cálculo empleado.

#### A1.3.3.2.3. Procedimiento.

Primero se determina el punto de ebullición del agua. Para ello se introducen en la caldera 15 mL de agua destilada, se coloca el termómetro, se enciende el mechero y se espera a que la temperatura se estabilice. Esta operación se ha de realizar sin refrigerante en la cámara correspondiente. Se anota la temperatura de ebullición del agua (T1).

Para medir la muestra, se vacía la caldera, se lava con algunas porciones de la muestra a analizar, se deja escurrir bien y se pone en ella unos 50 mL de la muestra. Se procede como antes, pero trabajando ahora con el compartimento para el refrigerante lleno de agua y el bulbo del termómetro dentro del líquido. Cuando se estabiliza la temperatura del termómetro se lee ésta (T2). Dependiendo de la acidez de la muestra, esta temperatura deberá corregirse para tener en cuenta el efecto del ácido acético sobre el punto de ebullición. Si la acidez es del 7 % (m/v) se ha de restar 0.2 °C a T2, si la acidez es del 10 % (m/v) se restan 0.3 °C y si la acidez es del 15 % (m/v) se restan 0.5 °C.

En la regla deslizable, o disco graduado que acompaña al equipo (ver figura A1.3.6.), se gira la parte móvil central, que porta la escala de temperatura, hasta que coincida la temperatura T1 con el cero de la escala alcohólica que se encuentra en la parte fija del ábaco. A continuación, sin mover el referido disco, se lee qué graduación alcohólica corresponde a la temperatura T2 (graduación alcohólica de la muestra).

En el caso de muestras con un gran contenido de alcohol es conveniente diluirlas antes de realizar la determinación del punto de ebullición.

El grado alcohólico volumétrico obtenido de esta forma, corresponde con el grado alcohólico internacional según la O.I.V. a 20 °C.

### **A1.3.3.3. Método por cromatografía de gases.**

#### **A1.3.3.3.1. Fundamento.**

Separación del etanol de la muestra mediante una columna cromatográfica para gases y, su posterior, detección y cuantificación mediante un detector de ionización de llama.

#### **A1.3.3.3.2. Materiales y reactivos.**

- El equipo de cromatografía de gases está compuesto por (ver Figura A1.3.7.):
  - Detector de ionización de llama.
  - Horno con temperatura regulable.
  - Integrador.
  - Registrador.
  - Columna capilar: FFAP 2,5 % sobre Chromosorb G (HP), añadiéndose un 0.5 de un reductor de colas (p. E., Carbowax 1.500).
- Gases: Aire-Hidrógeno.
- Micro jeringa de 1 a 10 µL.
- Matraces aforados de 100 mL.
- Vasos de precipitado de 100 mL.
- Patrón interno: 4-metil-2-pentanol.
- Etanol absoluto.





Figura A1.3.7. Fotografía del cromatógrafo de gases empleado.

#### **A1.3.3.3.3. Preparación de patrones.**

Las disoluciones empleadas para construir la recta de calibrado han sido cinco disoluciones de etanol en agua destilada con las siguientes concentraciones: 0.5, 1, 2, 4 y 6 % (v/v) de alcohol.

Como patrón interno se ha utilizado una disolución de 4-metil-2-pentanol en agua destilada al 2 % (v/v).

#### **A1.3.3.3.4. Condiciones cromatográficas.**

Las condiciones del análisis cromatográfico son:

- Temperatura del detector: 230 °C.
- Temperatura del inyector: 230 °C.
- Volumen de muestra inyectado: 2  $\mu$ L.
- Gas portador: Hidrógeno.
- Gradiente de temperatura del horno: 70 °C durante 6 minutos, rampa de 30 °C/min hasta 220 °C, 220 °C durante 4 minutos.

#### **A1.3.3.3.5. Procedimiento.**

Para el caso de las disoluciones patrón, para cada una de las disoluciones se toman 10 mL y se añaden 2 mL de la disolución del patrón interno, se homogeniza y por último se procede a la inyección en el cromatógrafo.

Para la determinación de alcohol en vinagre no es necesario diluir la muestra, se toman 10 mL de muestra y se añaden 2 mL de la disolución del patrón interno, se homogeniza y se procede a la inyección en el cromatógrafo.

Para el caso de muestras de vino, en las que, normalmente el valor del alcohol es superior a la recta de calibrado, se realiza previamente una dilución al 10% empleando el matraz aforado de 100 mL. Se toman 10 mL de la muestra diluida, se añaden 2 mL de la disolución del patrón interno, se homogeniza y, al igual que en casos anteriores, se procede a su inyección en el cromatógrafo.

#### **A1.3.3.3.6. Cálculo.**

Los cromatogramas obtenidos de las distintas disoluciones patrón permiten representar gráficamente la relación existente entre el cociente:

$$\text{Relación de etanol} = \frac{\text{Área del pico del etanol}}{\text{Área del pico del patrón interno}} \quad [\text{Ec. A1.3.2}]$$

La relación de áreas obtenida para la muestra a determinar se compara con la curva de calibrado, obteniéndose la cantidad de alcohol de la muestra, expresada en % (v/v).

#### **A1.3.4. Método de cuantificación de volátiles mayoritarios y polioles.**

##### **A1.3.4.1. Fundamento.**

Cuantificación de compuestos volátiles mayoritarios y polioles mediante una columna cromatográfica para gases y posterior detección y cuantificación mediante un detector de ionización de llama según el método propuesto por Peinado et al (2004)<sup>355</sup>.

##### **A1.3.4.2. Materiales y reactivos.**

- El equipo de cromatografía de gases está compuesto por (ver Figura A1.3.8.):
  - Detector de ionización de llama.

---

<sup>355</sup> Peinado, R.; Moreno, J.; Munoz, D.; Medina, M.; Moreno, J., (2004). "Gas chromatographic quantification of major volatile compounds and polyols in wine by direct injection". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(21), 6389-6393.

- Horno con temperatura regulable.
  - Integrador.
  - Registrador.
  - Columna capilar: CPWAX-57 CB de 60 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y 0.40  $\mu\text{m}$  de espesor de película.
- Gases: Helio.
  - Micro jeringa de 0.5  $\mu\text{L}$ .
  - Matraces aforados de 100 mL.
  - Vasos de precipitado de 100 mL.
  - Tubos de centrifuga de 15 mL.
  - Patrones de. Acetaldehído, Acetato de etilo, Metanol, Propanol, Isobutano, Alcoholes isoamílicos, Acetoina, Lactato de etilo, 2,3-butanodiol levo, 2,3-butanodiol meso, Succinato de dietilo, 2-Feniletanol y Glicerina.
  - Patrón interno: 4-metil-2-pentanol.
  - Carbonato cálcico anhidro de pureza analítica.
  - Disolventes: Etanol absoluto y Agua ultrapura.



Figura A1.3.8. Fotografía del cromatógrafo de gases empleado.

#### **A1.3.4.3. Preparación de patrones.**

Las disoluciones empleadas para construir la recta de calibrado han sido 3 disoluciones de diferentes concentraciones dentro del rango de trabajo de los patrones en agua ultrapura en 14%(v/v) de etanol.

Como patrón interno se ha utilizado una disolución de 1 g/L de 4-metil-2-pentanol en agua destilada en 14 % (v/v) de etanol.

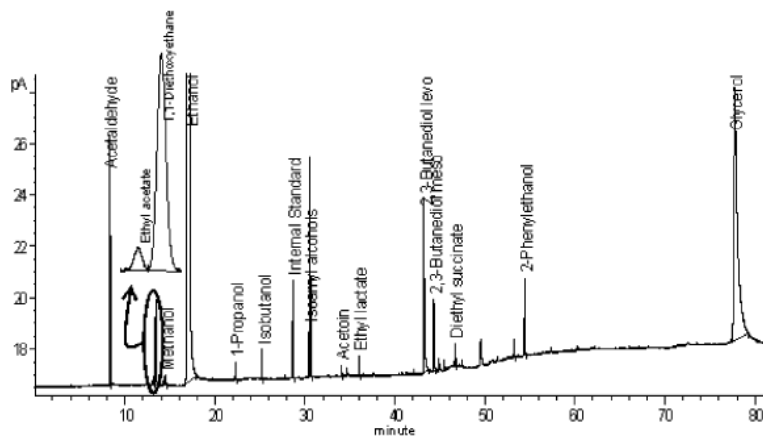


Figura A1.3.9. Cromatograma obtenido por el análisis por cromatografía de gases de los patrones empleados.

#### A1.3.4.4. Condiciones cromatográficas.

Las condiciones del análisis cromatográfico son:

- Temperatura del detector: 300 °C.
- Temperatura del inyector: 275 °C.
- Volumen de muestra inyectado: 0.5  $\mu$ L.
- Gas portador: Helio.
- Gradiente de temperatura del horno: 50 °C durante 15 minutos, rampa de 4 °C/min hasta 190 °C, 190 °C durante 35 minutos.

#### A1.3.4.5. Procedimiento.

Para el caso de las disoluciones patrón y de las muestras, se toman 10 mL en un tubo de centrifuga de 15 mL, se añade 1 mL de la disolución de patrón interno y 0.2 g de carbonato cálcico. Los tubos se agitan durante 15 s mediante ultrasonidos y son centrifugados durante 5 minutos a 3500 rpm. Se toman 0.5  $\mu$ L de sobrenadante y por último se procede a la inyección en el cromatógrafo.

#### **A1.3.4.6. Cálculo.**

Los cromatogramas obtenidos de las distintas disoluciones patrón permiten representar gráficamente la relación existente entre el cociente:

$$\text{Relación de compuesto} = \frac{\text{Área del pico de compuesto}}{\text{Área del pico del patrón interno}} \quad [\text{Ec. A1.3.3}]$$

La relación de áreas obtenida para la muestra a determinar se compara con la curva de calibrado, obteniéndose la cantidad de volátiles mayoritarios y polioles en la muestra, expresados en mg/L.

#### **A1.4. SISTEMA EXPERIMENTAL.**

La pieza central del sistema experimental utilizado consiste en un fermentador Frings<sup>356</sup> de 10 L (8 L de capacidad efectiva) que, como sistema de aireación, emplea una turbina autoaspirante situada en el fondo del equipo, que introduce una dispersión ultra-fina de burbujas de aire en el fermentador (aireación aproximada de 0.03-0.20 vvm). El equipo posee una alta eficacia para la transferencia de oxígeno entre la fase gaseosa y el medio [García-García, I. et al., 2009].

La tecnología del vinagre de Frings es, desde hace mucho tiempo, líder a nivel mundial en la producción de vinagre, aproximadamente el 60 % de la producción mundial. Los Acetator®<sup>357</sup> utilizados actualmente, casi 900 fermentadores repartidos en más de 50 países diferentes, destacan por su rendimiento y su funcionamiento altamente eficaz.

El biorreactor dispone de todo el equipamiento necesario para poder funcionar de forma automatizada. La carga, descarga, control y monitorización se realizan de manera autónoma previa programación en el ordenador correspondiente. Al automatizar el sistema se obtiene una alta reproducibilidad de los procesos de carga y descarga, y se obtiene un registro de todos los datos.

Se muestra en la figura A1.4.1. el montaje experimental desarrollado para la realización automática de experimentos semi-continuos de acetificación. En este sentido, es preciso diferenciar entre: los elementos del equipo de trabajo y de control, que son la parte física para la automatización, y el software necesario para la adquisición de datos.

---

<sup>356</sup> Heinrich Frings. <http://www.frings.com>.

<sup>357</sup> Véase referencia nº 356 página 203.

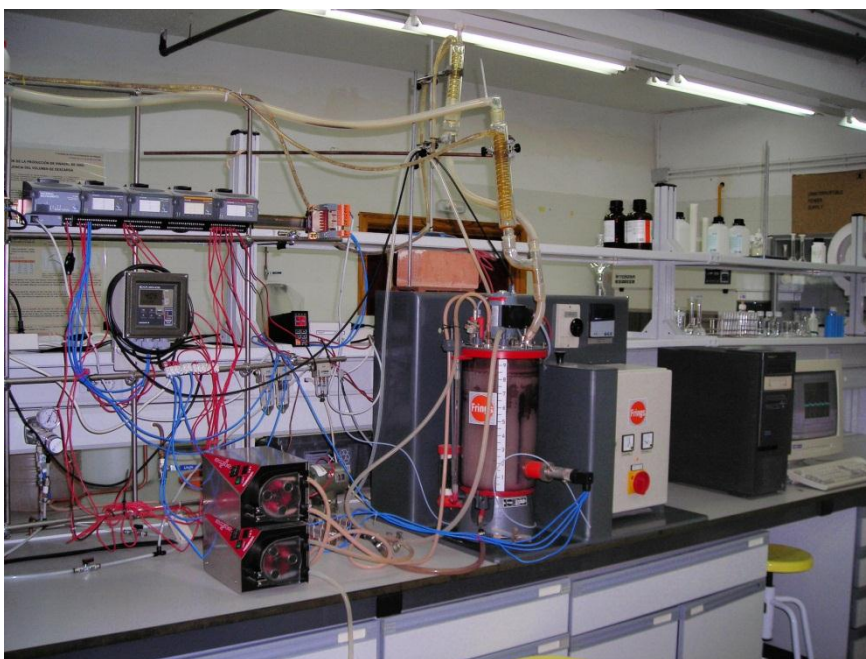


Figura A1.4.1. Dispositivo experimental utilizado en el laboratorio.

#### **A1.4.1. Elementos del equipo de trabajo y de control.**

Para la automatización de la planta en la que se lleva a cabo el estudio del proceso de acetificación se emplean una serie de elementos que se pueden clasificar en:

- Reactor.
- Sensores.
- Elementos de adquisición y acondicionamiento de señales.
- Actuadores.
- Elementos de control del proceso.

Como en cualquier otra automatización, en todo momento se toman medidas de las variables de interés del proceso (mediante los sensores) y se trasladan a los elementos de control correspondientes (a través de los elementos de adquisición y acondicionamiento de señales). Una vez que estos elementos de toma de decisiones establecen la acción a seguir en función de las consignas programadas, se comandan las señales de control a los actuadores, que son los que interactuarán con el proceso físico, cerrando de esta forma el lazo de

control. La solución software, creada específicamente, proporciona una visualización y un registro completo de los datos.

Los sensores empleados se pueden clasificar en función del tipo de variable que miden: presión diferencial, temperatura, oxígeno disuelto y concentración de etanol.

#### **A1.4.1.1. Fermentador o Reactor biológico.**

Este es un equipo Frings (10 L). Como se ha comentado previamente, para la aireación y mezcla dispone de una turbina situada en el fondo del equipo que, girando a elevada velocidad, aspira aire del exterior a través de un conducto convenientemente situado. La mezcla medio-aire, con la ayuda de una estructura fija que rodea a la turbina, es proyectada de forma radial hacia el seno del medio de cultivo. La transferencia de materia conseguida en el fermentador es muy alta y la mezcla del medio también, proporcionando unas condiciones idóneas para la reproducción de las bacterias empleadas.



Figura A1.4.2. Fotografía del fermentador vacío empleado en el laboratorio.



El fermentador empleado está hecho para la producción de pequeñas cantidades, reproducción de cultivos de arranque, probar materias primas y estudiar las variables experimentales implicadas en el proceso. El equipo está formado por: un tanque de PVC, serpentín de refrigeración, aireador y rompe-espuma.

#### A1.4.1.2. Condensador de gases.

Se utiliza un condensador en los gases de salida del reactor para minimizar las pérdidas de volátiles, especialmente el arrastre debido a la gran cantidad de aire introducido dentro del fermentador.



Figura A1.4.3. Fotografía del sistema de condensación empleado en la salida de gases del fermentador, sin y con recubrimiento aislante para el mejor funcionamiento.

### A1.4.1.3. Sensor de presión diferencial.

Mide la diferencia entre la presión debida a la columna de líquido que se encuentra en el reactor y la presión atmosférica. De este modo se evalúa el volumen contenido en el fermentador. En la figura A1.4.4. se muestra el sensor utilizado; se trata de un sensor de la casa Yokogawa con referencia EJA 110A<sup>358</sup>. Los volúmenes a descargar, cargar y, por supuesto, el volumen total, son controlados por el medidor de presión diferencial.



Figura A1.4.4. Sensor de presión diferencial.

### A1.4.1.4. Sensor de temperatura y de oxígeno disuelto.

Un conjunto formado por un electrodo de oxígeno disuelto y el oxímetro correspondiente se encarga de medir la concentración de oxígeno disuelto en el medio, siendo una de las variables más importantes del proceso puesto que da idea de la actividad bacteriana. Para la medida de esta concentración es necesaria también la lectura de temperatura, por lo que el mismo instrumento también dispone de un sensor de temperatura.

El sensor empleado (referencia DO sensor SM3-CM29) en el montaje experimental y el oxímetro (modelo EXA DO-400) pertenecen ambos a la casa

<sup>358</sup> Yokogawa. <http://www.yokogawa.com>.

comercial Yokogawa<sup>359</sup>. El oxímetro empleado es resistente al medio tan agresivo en el que ha de trabajar, flexible y necesita un bajo mantenimiento. El sensor empleado puede expresar la señal de salida como porcentaje de saturación y mg de oxígeno·L<sup>-1</sup>.

La figura A1.4.5. se muestran ambos equipos.



Figura A1.4.5. Sensor de temperatura y de oxígeno disuelto.

### A1.4.1.5. Sensor de concentración de alcohol.

Mediante este sensor (Alkosens®, de Frings)<sup>360</sup>, ver figura A1.4.6., se mide la concentración de etanol presente en el medio. Básicamente, se trata de un dispositivo electrónico que detecta la concentración de alcohol en un gas y genera una señal eléctrica proporcional. Posteriormente, esta señal se lleva a un transductor (Acetomat®, de Frings)<sup>361</sup>, ver figura A1.4.6., que realiza ajustes, correcciones y, finalmente, produce una señal eléctrica en un rango estándar para cualquier sistema de adquisición. El alcohol existente en el gas proviene

---

<sup>359</sup> Véase referencia nº 358 página 207.

<sup>360</sup> Véase referencia nº 356 página 203.

<sup>361</sup> Véase referencia nº 356 página 203.

del medio de cultivo. La permeación selectiva a través de una membrana da lugar a una mayor o menor concentración de etanol en la fase gaseosa, dependiendo de la concentración de etanol en el medio de cultivo.

El analizador en continuo de etanol, desarrollado por Frings, permite conocer, en todo momento, la concentración del sustrato de la fermentación. Este equipamiento es absolutamente necesario para programar el final de cada ciclo, así como la etapa de carga en el caso de ser necesario.

Todos los sensores empleados generan una señal en el rango estándar 4-20 mA.



Figura A1.4.6. Sensor y transductor de la señal de la concentración de alcohol.

#### A1.4.1.6. Elementos empleados para la adquisición de datos.

Para la obtención de las señales generadas por los sensores y la emisión de las señales de control correspondientes a los actuadores, se emplean elementos de adquisición y acondicionamiento, con el objeto de eliminar ruidos eléctricos, adaptación de las señales a los niveles empleados por el elemento de control de proceso, etc.

En el caso que nos ocupa se escogieron módulos robustos de entrada/salida distribuida, adecuados a las condiciones del proceso, concretamente los correspondientes a la familia FieldPoint de la casa National

Instruments<sup>362</sup>. Los módulos incluidos en el proceso se muestran en la figura A1.4.7.



Figura A1.4.7. Módulos de adquisición y tratamiento de las señales e interfaz de red.

- Módulo FP-AI-111, de 16 entradas analógicas 4-20 mA.
- Módulo FP-AO-200, de 8 salidas analógicas 4-20 mA.
- Módulo FP-RLY-420, de 8 salidas digitales a relé.
- Módulo FP-DI-300, de 8 entradas digitales 18-30 VDC.

Las señales, ya acondicionadas por los módulos, se envían al elemento de control de proceso vía red local Ethernet. Mediante el módulo correspondiente de interfaz de red (FP-1601).

Para la intervención sobre el sistema se emplean elementos actuadores que reciben como entrada las señales procedentes del elemento de control, una vez que ya han sido acondicionadas por los módulos correspondientes descritos con anterioridad. Los actuadores empleados son los siguientes:

### **A1.4.1.7. Electroválvula.**

Controla el caudal de agua fría para refrigeración del proceso. Se trata de una válvula todo o nada que, dado que la reacción biológica que se produce es exotérmica, permite el control de la temperatura en el reactor. La electroválvula empleada pertenece a la casa Asga, Modelo E21 0D002.

---

<sup>362</sup> National Instruments. <http://www.ni.com>.



Figura A1.4.8. Electroválvula.

#### **A1.4.1.8. Resistencia eléctrica.**

Permite calentar el medio cuando la temperatura es excesivamente baja. De este modo, como complemento de la electroválvula, sirve para mantener la temperatura del proceso en su punto de consigna. La resistencia eléctrica empleada como calefacción pertenece a la casa Frings<sup>363</sup>.



Figura A1.4.9. Resistencia eléctrica.

#### **A1.4.1.9. Bombas peristálticas.**

Dos bombas distintas realizan la carga de vino de alimentación y la descarga de producto, respectivamente, dependiendo de la fase del ciclo en la que se encuentre el proceso. En ambas es posible controlar el ritmo de carga y descarga (el caudal de alimentación y de descarga). Las bombas peristálticas empleadas son de la casa Ismatec, modelo ISM 912C<sup>364</sup>.

---

<sup>363</sup> Véase referencia nº 356 página 203.

<sup>364</sup> Ismatec. <http://www.ismatec.com>.

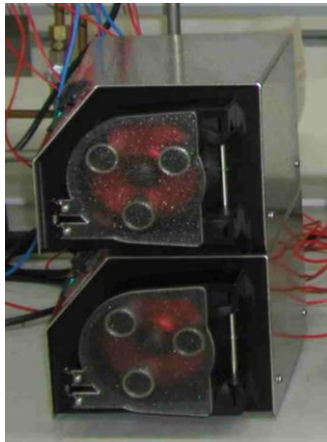


Figura A1.4.10. Bombas peristálticas empleadas en la carga y descarga.

#### **A1.4.2. Elemento de control del proceso: software necesario para adquisición y control de datos.**

El elemento de control es un PC equipado con una tarjeta de red Ethernet para comunicación con el módulo de interfaz de red del sistema de adquisición y acondicionamiento. De esta manera, es posible tanto recibir la información procedente de los sensores como enviar las señales de control generadas a los actuadores.

La gestión y el control de la planta se desarrolla mediante la ejecución de un software SCADA (Supervisory Control And Data Adquisition) escrito en LabView, que permite la monitorización del proceso en cada instante, así como el establecimiento de consignas por parte del usuario. El entorno de programación posibilita la comunicación con los módulos de adquisición y acondicionamiento incorporando en el software los drivers o controladores de dispositivo necesarios, los cuales toman datos a una frecuencia de muestreo determinada por el software, dependiente de la fase del ciclo en la que se encuentre el proceso. La aplicación creada específicamente para este proceso se encuentra ya en la segunda versión.

La automatización del proceso es absolutamente necesaria para poder llevar a cabo un buen estudio de la influencia de las principales variables que afectan al proceso. Como se sabe, los ciclos de fermentación tienen una duración variable dependiendo de las condiciones en las que se lleven a cabo. El cambio en los volúmenes de descarga, momento de la descarga y velocidad de carga, alargan o acortan la duración del ciclo fermentativo. Esto dificulta enormemente la planificación logística de los experimentos si éstos se han de seguir y controlar de forma manual. Además, las discontinuidades que se producirían de otro modo, introducirían cambios adicionales en el sistema -principalmente desde el punto de vista de la biomasa del fermentador-. Esto tendría un coste de tiempo y de seguridad a la hora de comparar resultados.

La aplicación se estructura en varias pantallas, que desempeñan una función concreta:



**A1.4.2.1. Vista principal del proceso:**

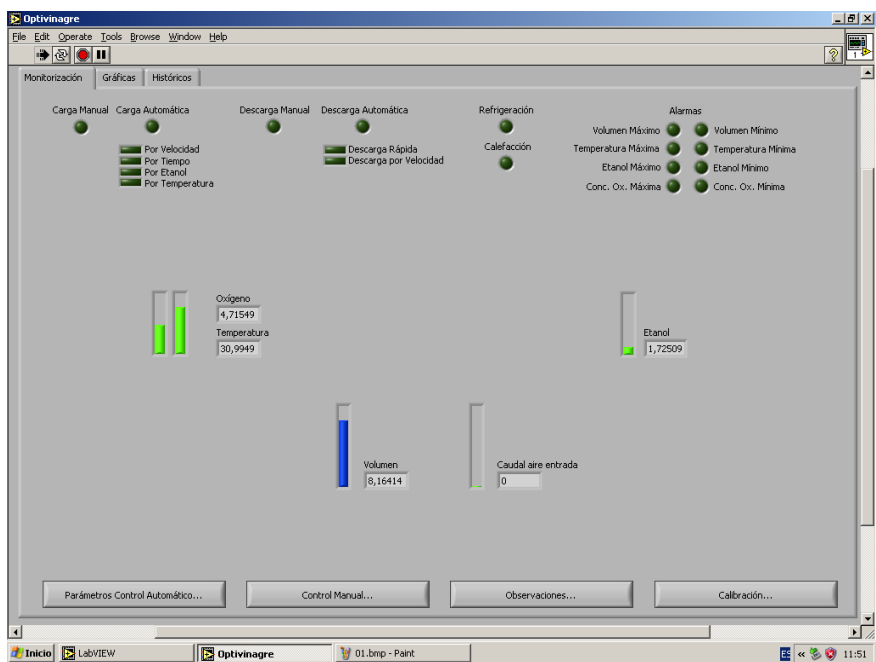


Figura A1.4.11. Vista de la pantalla principal del proceso.

En esta pantalla se pueden visualizar gráficamente los valores instantáneos que tienen las variables más importantes que se desean medir del proceso (concentración de oxígeno disuelto, temperatura, concentración de alcohol y volumen). También se muestra el estado del ciclo (carga o descarga y en que modo se está realizando, en su caso) y si se ha producido alguna condición de alarma.

## A1.4.2.2. Vista de monitorización gráfica:

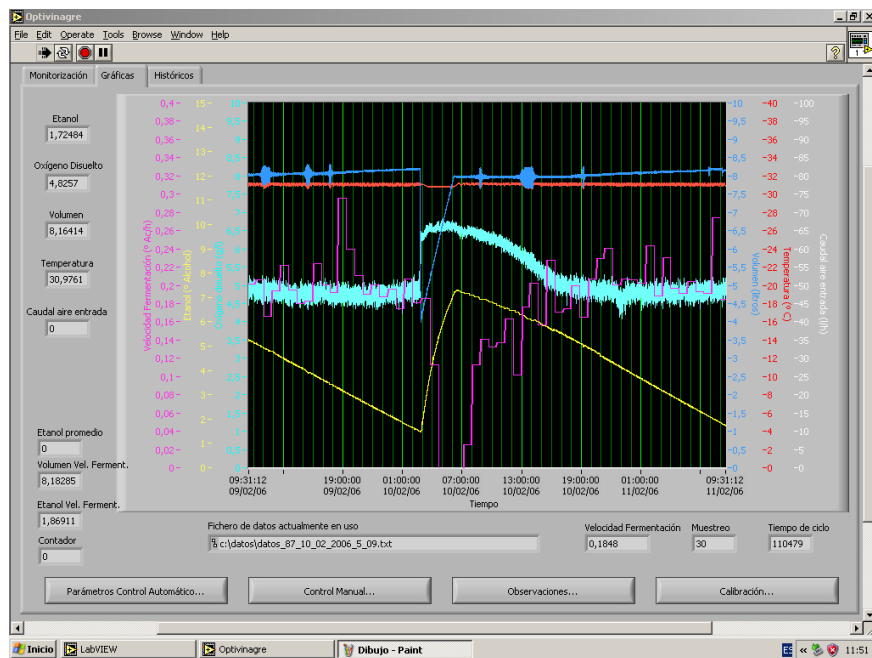


Figura A1.4.12. Vista de la pantalla de monitorización gráfica del proceso.

En esta pantalla se muestra gráficamente la evolución de las variables anteriores en un período de 48 horas, de forma que se puede observar cómo se han ido desarrollando uno o varios de los últimos ciclos. También se informa de los valores instantáneos de dichas variables y se muestra el fichero de texto donde se guarda la información correspondiente al ciclo actual (alarmas incluidas) para un tratamiento posterior de los datos. El nombre de este fichero de texto está adecuadamente identificado. El período de muestreo de registro de información, así como, la duración del ciclo que se está desarrollando aparecen en la parte inferior derecha de la ventana.

### A1.4.2.3. Vista de parámetros de control automático:

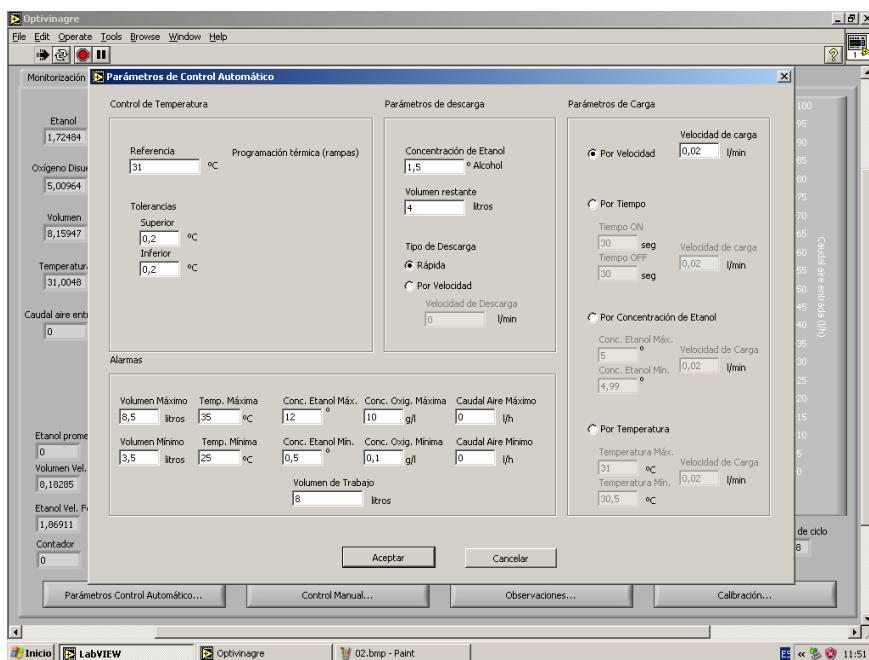


Figura A1.4.13. Vista de la pantalla de los parámetros de control automático.

Desde esta pantalla el usuario puede especificar las consignas y parámetros de control necesarios para el proceso. En cualquier momento se podrán modificar estos parámetros y el sistema reaccionará de forma inmediata. Los distintos paneles clasifican las facetas de actuación:

- **Temperatura:** se especifica la consigna de temperatura constante que se desea que se mantenga en el proceso, así como unos límites superior e inferior a modo de tolerancias. El control de temperatura será un todo o nada en el que la variable se mantendrá en el rango especificado y en torno a la consigna.
- **Parámetros de descarga:** se especifica la concentración de alcohol residual del medio que desencadenará la descarga del reactor y el volumen que debe quedar en el mismo. Así mismo, es posible especificar la velocidad de descarga.
- **Alarmas:** se especifican los límites máximos y mínimos para los valores de las variables de forma que, en el instante en que se excedan, se producirá una alarma (que se indicará convenientemente en la vista de proceso).

- Parámetros de carga: se especifica el modo en el que se deseará cargar vino en el siguiente ciclo, así como los parámetros correspondientes al modo de carga específico.

Los modos de carga son los siguientes:

- a) Por velocidad: se indica únicamente el caudal de carga de vino de alimentación.
- b) Por tiempo: se indica el tiempo en el que la bomba de carga se mantendrá en ON y en OFF y el caudal de vino de entrada en los momentos en los que se esté cargando. De esta forma se pueden simular cargas con caudales medios más bajos que los permitidos por la bomba.
- c) Por etanol: se carga un caudal determinado pero manteniendo constante (con una determinada tolerancia) la concentración de alcohol. Cuando se tenga un exceso de alcohol en el medio debido a la carga se cortará la bomba y se dejará fermentar hasta que la concentración de etanol caiga por debajo del límite inferior, momento en el que se volverá a cargar.
- d) Por temperatura: se carga un caudal determinado pero manteniendo constante la temperatura. Es un modo de funcionamiento similar al anterior salvo que, cuando se selecciona, se desconecta automáticamente el control de temperatura.

**A1.4.2.4. Vista de control manual:**

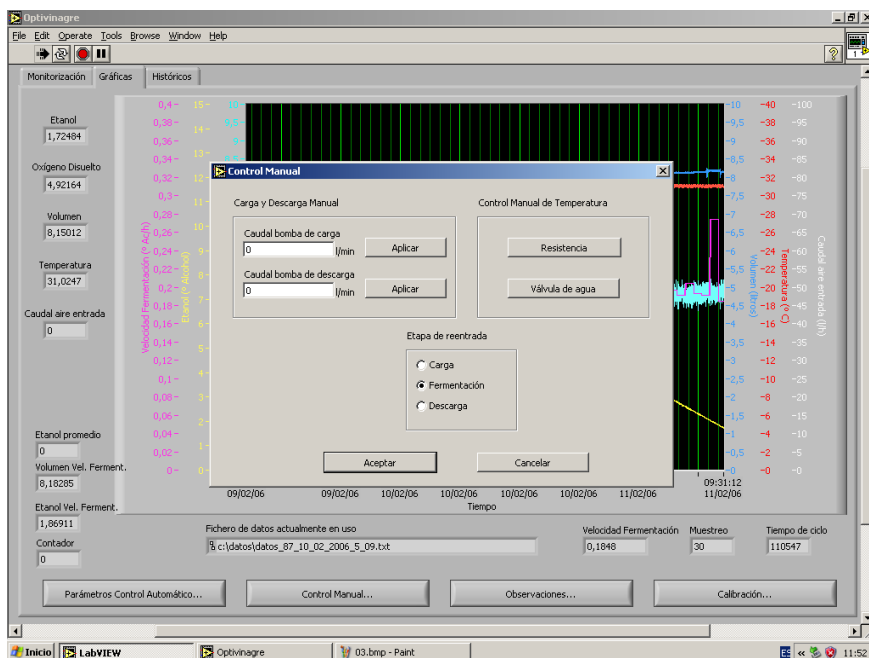


Figura A1.4.14. Vista de la pantalla del control manual del proceso.

Desde esta pantalla se puede controlar manualmente el proceso, manipulando directamente los elementos que son accesibles: las bombas de carga y descarga, la resistencia eléctrica y la electroválvula. También permite determinar la etapa de la fermentación (carga, fermentación o descarga) en la cual queremos que continúe el proceso una vez que se haya cerrado la ventana de control manual. En el instante en el que se activa el control manual se desconectan toda la parte automática del software y se deja el sistema al manejo del usuario. El control manual permite realizar las acciones correctoras necesarias en caso de situaciones inesperadas o de emergencia.

## A1.4.2.5. Vista de calibración:

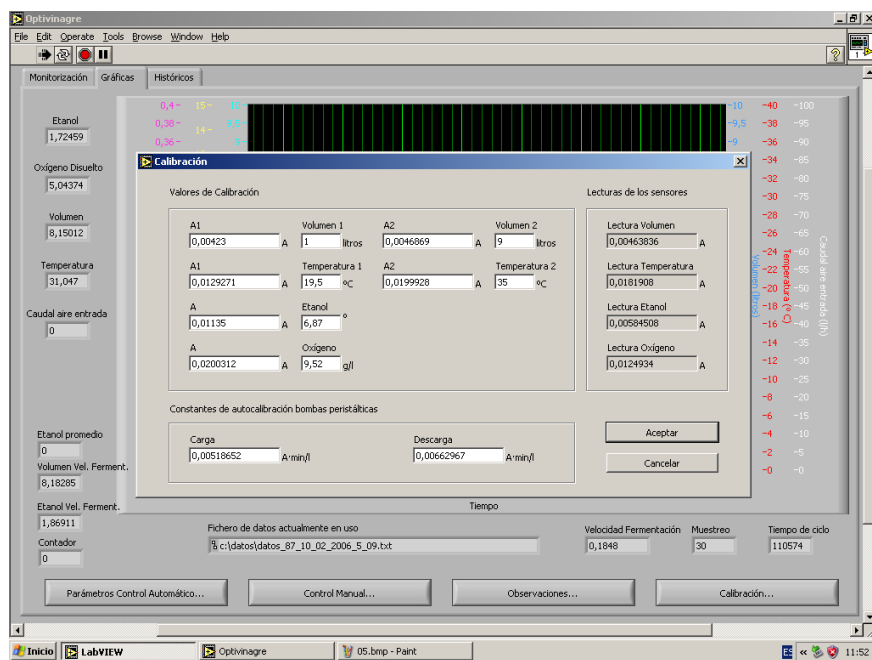


Figura A1.4.15. Vista de la pantalla de calibración del proceso.

Desde esta ventana se realizan los ajustes necesarios para calibrar los instrumentos, de forma que en cada instante proporcionen medidas exactas. Para efectuar la calibración se toma la lectura en mA de cada instrumento en un instante determinado y se toma la medida real de la variable (dependiendo del instrumento de que se trate puede ser necesario tomar uno o dos puntos para determinar completamente la recta de calibración). En el intervalo de introducción de datos se toman los ajustes anteriores para la calibración. Una vez definida la recta de calibración, el software calcula automáticamente el valor de la variable en función de la lectura en mA que esté proporcionando el instrumento.

**A1.4.2.6. Vista de observaciones.**

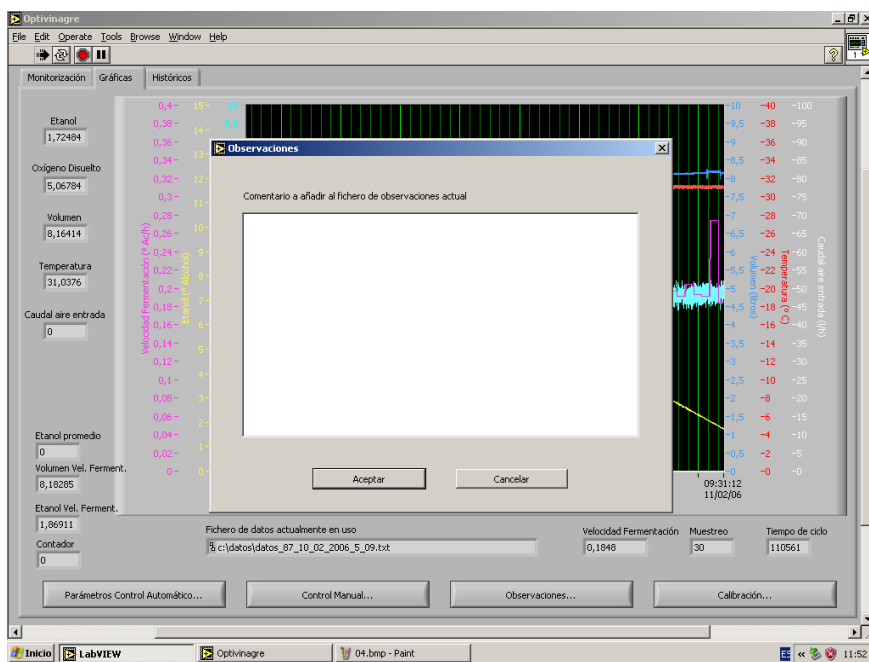
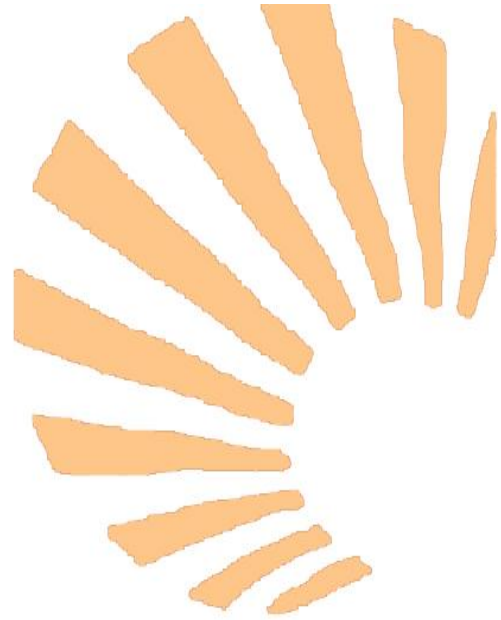


Figura A1.4.16. Vista de la pantalla de observaciones.

Esta pantalla permite crear un documento de texto con el mismo nombre que el documento que almacena los datos para poder guardar también las posibles incidencias y modificaciones realizadas sobre el proceso.



## **ANEXO II**

# **RESUMEN DE HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**





En el contexto de un estudio más amplio que pretenda optimizar el proceso de elaboración de vinagre de vino, es necesario disponer de la metodología adecuada que permita evaluar el efecto de las diferentes variables operacionales sobre el comportamiento del sistema. Entre estos métodos son fundamentales dos:

- La cuantificación de la concentración de bacterias acéticas y su porcentaje de viabilidad.
- Una medida de la velocidad de fermentación a lo largo del ciclo fermentativo.

1º.- Un primer **objetivo** de este trabajo es el desarrollo de un método rápido para determinar la concentración de bacterias totales y viables en el proceso de elaboración de vinagre. El método debe poder ser sistematizado en el contexto de un trabajo de laboratorio y/o industrial y aplicado por personas de diversas especialidades y para diferentes objetivos.

Este objetivo se aborda en el trabajo:

Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I.M., Cantero-Moreno, D., Barja, F., García-García, I. (2006). RAPID METHOD FOR TOTAL, VIABLE AND NON-VIABLE ACETIC ACID BACTERIA DETERMINATION DURING ACETIFICATION PROCESS. *Process Biochemistry*, 41, 1160-1164. ELSEVIER. ISSN: 1359-5113.

Para la consecución de este objetivo se han considerado diversos aspectos que han llevado a la **hipótesis** de partida que se resume a continuación.

Es difícil encontrar un método totalmente satisfactorio para evaluar el contenido microbiano de un medio dada la variedad de entornos en los que podemos estar así como por las diferencias existentes entre los propios microorganismos en sí. Tras evaluar las diversas alternativas, se decidió estudiar la posibilidad de integrar dos técnicas como son la del conteo directo al microscopio, empleando una cámara de Neubauer de profundidad especial (0.02 mm), junto con el uso de fluorocromos específicos que permitan discernir entre células viables y no viables.

Este tipo de cámaras de conteo para el microscopio, por su baja profundidad, permite la determinación directa de bacterias al estar éstas situadas en un único campo de visión. Si, además, se dispone de un microscopio de fluorescencia, se podría evaluar simultáneamente no sólo las células totales,

sino también las viables y no viables. Pues bien, esta alternativa no había sido descrita previamente.

2º.- Un segundo **objetivo** es el desarrollo de un método sencillo para evaluar la velocidad de fermentación a lo largo de los ciclos de fermentación y de forma global.

Este objetivo se aborda en el trabajo:

García-García, I., Cantero-Moreno, D., Jiménez-Ot, C., Baena-Ruano, S., Jiménez-Hornero, J.E., Santos-Dueñas, I.M., Bonilla-Venceslada, J.L., Barja, F. (2007). ESTIMATING THE MEAN ACETIFICATION RATE VIA ON-LINE MONITORED CHANGES IN ETHANOL DURING A SEMI-CONTINUOUS VINEGAR PRODUCTION CYCLE. *Journal of Food Engineering* 80, 460-464. ELSEVIER. ISSN: 0260-8774.

Para la consecución de este objetivo se ha de prestar especial consideración el modo habitual de trabajo que se sigue en la práctica para la elaboración de vinagre: modo semi-continuo. En este contexto, en cada ciclo semi-continuo de trabajo es necesario realizar una evaluación correcta de la velocidad global de acetificación y poder comparar este resultado con los obtenidos en condiciones experimentales diferentes. La velocidad global de acetificación se suele determinar a partir de la información relativa a la acidez final del medio justo antes de la descarga, volumen que se descarga y tiempo global del ciclo de fermentación. Sin embargo, como **hipótesis**, se plantea que esta evaluación se podría y se debería realizar también a partir de información sobre la evolución de la concentración de etanol a lo largo del ciclo. En términos prácticos, hoy día se dispone de dispositivos para la medida continua de etanol en el medio de cultivo.

Para una buena optimización de la producción de vinagres, sería recomendable evaluar la velocidad de acetificación de ambas formas. La evaluación a partir de los datos de etanol permite conocer cómo va evolucionando la velocidad de oxidación biológica a lo largo del ciclo y esto es especialmente interesante para evaluar la influencia de las variables operacionales sobre las diferentes etapas del ciclo y poder, de esta forma, facilitar las propuestas de mejora que se estimen convenientes. Por otro lado, la comparación con la velocidad de acetificación determinada a partir de los datos de acidez final, permite tener una medida adicional de las pérdidas de sustrato por evaporación, debido a la aireación, producida en el ciclo.

3°.- Un tercer **objetivo**, a modo de ejemplo de aplicación de los dos trabajos previos, fue la de investigar la posible relación entre la evolución celular a lo largo de los ciclos fermentativos y de algunos de los principales compuestos volátiles que se detectan durante el ciclo de elaboración de vinagre de vino.

Este objetivo se aborda en el trabajo:

Baena-Ruano, S., Santos-Dueñas, I.M., Mauricio, J.C., García-García, I. (2010). RELATIONSHIP BETWEEN CHANGES IN THE TOTAL CONCENTRATION OF ACETIC ACID BACTERIA AND MAJOR VOLATILE COMPOUNDS DURING THE ACETIC ACID FERMENTATION OF WHITE WINE. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 2675-2681. JOHN WILEY & SONS LTD. ISSN: 0022-5142.

Partiendo de la **hipótesis** de la posibilidad de que exista una relación entre la evolución y/o cambios en la composición de compuestos volátiles de un vinagre con los cambios que la biomasa responsable del proceso pueda experimentar, en este trabajo se realizaría, por primera vez, un estudio detallado de la evolución a lo largo del ciclo de los principales compuestos volátiles que se detectan durante el ciclo de elaboración de vinagre de vino. Esta información puede ayudar a comprender mejor el complejo proceso de bio-oxidación que llevan a cabo estas bacterias.

4°.- Un cuarto **objetivo**, también a modo de ejemplo de aplicación de los dos trabajos previos, fue la de estudiar la influencia que ejerce la concentración final de etanol en el momento de la descarga sobre la velocidad media de acetificación y por lo tanto sobre la productividad del sistema

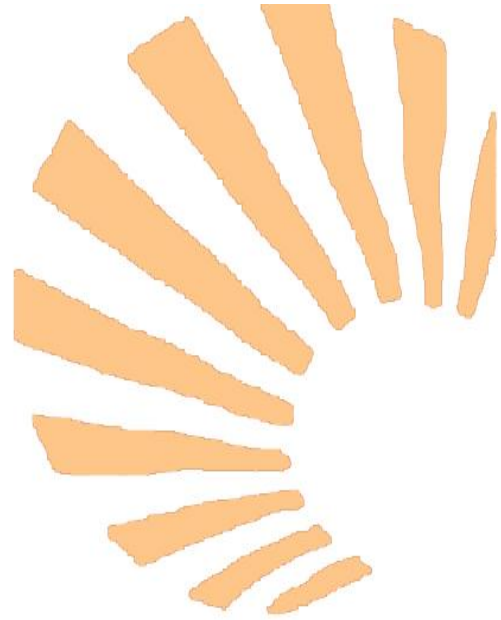
Este objetivo se aborda en el trabajo:

Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E., Bonilla-Venceslada, J.L., Álvarez-Cáliz, C., García-García, I. (2010). INFLUENCE OF THE FINAL ETHANOL CONCENTRATION ON THE ACETIFICATION AND PRODUCTION RATE IN THE WINE VINEGAR PROCESS. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85, 908-912. JOHN WILEY & SONS LTD. ISSN: 0268-2575.

Aunque el proceso de acetificación de vino cuenta con un alto grado de desarrollo y muchas de las operaciones están completamente automatizadas

gracias a la capacidad de medir y controlar la mayor parte de las variables del sistema. Sin embargo, la **hipótesis** de partida es que seguía siendo necesario un estudio global de las variables que inciden sobre el proceso para fijar industrialmente sus valores óptimos de acuerdo con funciones objetivo técnicas y económicas.

Las variables operacionales que más influyen sobre el proceso, además de la temperatura, grado alcohólico del vino y del nivel de transferencia de oxígeno que se consiga, son: la concentración de etanol en el momento de la descarga, volumen de descarga y velocidad de carga. Distintos valores de estas variables suponen, en realidad y de forma simultánea, variación en la acidez del medio, concentración de etanol y en la concentración y actividad de las bacterias acéticas. En este trabajo se evaluó la influencia de la concentración de etanol en el momento de la descarga.



## **ANEXO III**

# **CONCLUSIONES**



A continuación se **resumen** las conclusiones obtenidas, referidas a cada uno de los trabajos en los que se han obtenido.

1°.- Para el trabajo:

Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I.M., Cantero-Moreno, D., Barja, F., García-García, I. (2006). RAPID METHOD FOR TOTAL, VIABLE AND NON-VIABLE ACETIC ACID BACTERIA DETERMINATION DURING ACETIFICATION PROCESS. *Process Biochemistry*, 41, 1160-1164. ELSEVIER. ISSN: 1359-5113.

Se puede destacar que el método propuesto para evaluar y seguir la evolución de la concentración de bacterias totales y viables durante los ciclos de elaboración de vinagre:

- Es fiable, rápido, fácil de aplicar y conduce simultáneamente a la determinación de tanto células totales como viables.
- Las muestras, además de la facilidad para su preparación, permiten una clara diferenciación entre los colores que discriminan a las células viables de las que, en principio, no lo son.
- El kit utilizado no produce fluorescencia del fondo, lo que ayuda a la diferenciación de las células.
- El empleo de una cámara de Neubauer de profundidad especial (0.02 mm) permite contar directamente, y en un solo campo, la bacterias.
- Los resultados que se alcanzan son consistentes con los que se obtienen mediante citometría de flujo.

2°.- Para el trabajo:

García-García, I., Cantero-Moreno, D., Jiménez-Ot, C., Baena-Ruano, S., Jiménez-Hornero, J.E., Santos-Dueñas, I.M., Bonilla-Venceslada, J.L., Barja, F. (2007). ESTIMATING THE MEAN ACETIFICATION RATE VIA ON-LINE MONITORED CHANGES IN ETHANOL DURING A SEMI-CONTINUOUS VINEGAR PRODUCTION CYCLE. *Journal of Food Engineering* 80, 460-464. ELSEVIER. ISSN: 0260-8774.

Se puede destacar que el método seguido es rápido y sencillo para estimar la velocidad media de acetificación en un ciclo típico semicontinuo de fabricación de vinagre.



Basándose en la evolución de etanol a lo largo del ciclo, medida que se obtiene on-line y, por lo tanto, de la que se dispone de una gran información, es posible evaluar la velocidad media de oxidación biológica en cada una de las diferentes fases por las que pasa el ciclo.

La disponibilidad de esta información permite cuantificar perfectamente la actividad de las bacterias a lo largo del ciclo y cómo se ve afectada ésta al variar las condiciones de trabajo. En este sentido, y en el contexto de un estudio de optimización de las variables operacionales del proceso, esta información permite analizar qué fase es la más sensible antes los posibles cambios inherentes a diferentes valores de las variables operacionales.

3°.- Para el trabajo:

Baena-Ruano, S., Santos-Dueñas, I.M., Mauricio, J.C., García-García, I. (2010). RELATIONSHIP BETWEEN CHANGES IN THE TOTAL CONCENTRATION OF ACETIC ACID BACTERIA AND MAJOR VOLATILE COMPOUNDS DURING THE ACETIC ACID FERMENTATION OF WHITE WINE. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 2675-2681. JOHN WILEY & SONS LTD. ISSN: 0022-5142.

Se puede destacar que la determinación simultánea de la evolución de la concentración de células, ha permitido detectar que al final de los ciclos se producen unas oscilaciones en la concentración de éstas que podrían ser debidas a mecanismos celulares de supervivencia dadas las condiciones extremas que existen en dichos momentos del ciclo de acetificación: escasez de nutrientes y elevada acidez. También, es de especial interés, indicar que las oscilaciones celulares referidas son coincidentes con oscilaciones similares en la mayoría de los compuestos volátiles analizados, lo que sugiere una relación entre ambos hechos.

Por otro lado de los compuestos volátiles analizados: 2-feniletanol, succinato de dietilo, meso-2,3-butanodiol, levo-2,3-butanodiol, metanol y acetato de etilo no mostraron cambios significativos entre las concentraciones existentes al principio y al final del ciclo, mientras que el resto de los analizados (excepto la acetoina) lactato de etilo, alcoholes isoamílicos (3-metilbutan-1-ol y 2-metilbutan-1-ol), isobutanol, 1-propanol y acetaldehído se consumieron de forma sustancial a lo largo del proceso.

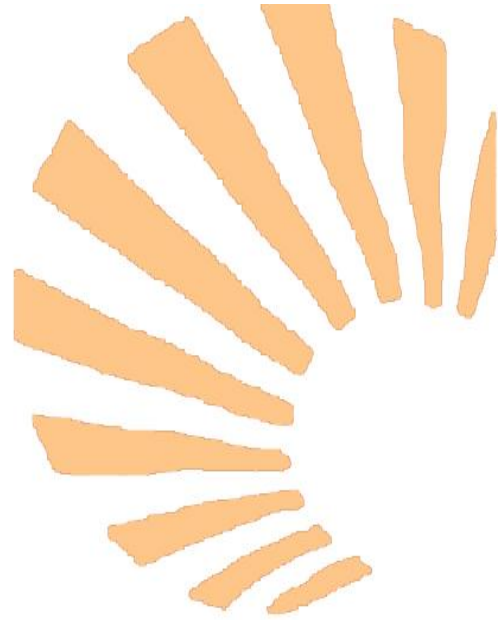
4°.- Para el trabajo:

Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E., Bonilla-Venceslada, J.L., Álvarez-Cáliz, C., García-García, I. (2010). INFLUENCE OF THE FINAL ETHANOL CONCENTRATION ON THE ACETIFICATION AND PRODUCTION RATE IN THE WINE VINEGAR PROCESS. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85, 908-912. JOHN WILEY & SONS LTD. ISSN: 0268-2575.

Se puede destacar que los resultados muestran que a medida que aumenta la concentración de etanol en el momento de la descarga, desde 0.5 hasta 3.5 % (v/v), la velocidad media de acetificación y producción de ácido acético aumentan en un 38 y 26 % respectivamente; este incremento se produce, fundamentalmente, durante la etapa de carga

Sin embargo, en la práctica no se podría trabajar dejando un producto con ese nivel de sustrato sin aprovechar; esto sugiere la necesidad de **optimización conjunta** de los dos reactores en serie de los que habitualmente se dispone a nivel industrial. El primer reactor tendría que trabajar con una concentración final en el momento de la descarga que implique una alta velocidad de acetificación pero garantizando que el segundo reactor finalice el agotamiento del sustrato antes de que tenga que recibir de nuevo la descarga del primer tanque. Este modo de trabajo podría conducir a velocidades medias globales de acetificación mayores de las que se obtienen habitualmente cuando el sustrato se agota mucho más en el primer reactor.





## **ANEXO IV**

### **RESUMEN - ABSTRACT**

---

## RESUMEN

A nivel industrial, el vinagre de vino se produce, principalmente, mediante un cultivo sumergido de bacterias acéticas siguiendo un modo semi-continuo de trabajo. En concreto, cuando se alcanza una determinada graduación alcohólica, se descarga un porcentaje del volumen total del medio de cultivo, y el medio restante actúa como inóculo para la siguiente carga; de esta forma se pueden conseguir vinagres de elevada graduación, se aprovecha parte de la biomasa generada en cada carga para fermentar rápidamente la siguiente y se establecen unos cambios en las condiciones del medio que favorecen y seleccionan a los organismos más adecuados para el proceso.

Este modo de trabajo implica la existencia de diversas variables operacionales sobre las que se tiene un mayor margen de actuación como son: concentración de etanol en el momento de la descarga, volumen de descarga y velocidad de carga. Distintos valores de estas variables influyen sobre la concentración y actividad de las bacterias acéticas dado que, en realidad y de forma simultánea, suponen una variación en la acidez, concentración de etanol, aporte de oxígeno e incluso de la temperatura del medio.

Aunque se ha alcanzado un importante grado de conocimiento y desarrollo tecnológico en el proceso de elaboración de vinagre, todavía es necesario alcanzar una optimización respecto al valor de estas variables dada la influencia que pueden ejercer sobre la velocidad de fermentación. Para esta tarea es fundamental disponer de métodos que permitan determinar la concentración de células totales y viables así como la velocidad de fermentación.

En relación al primer punto, se ha desarrollado un método rápido en el que se conjunta el contero directo en el microscopio con el uso de un kit de tinción para epifluorescencia (LIVE/DEAD® BacLight Bacteria Viability Kit) que permite estimar simultáneamente tanto bacterias totales como viables. Para el conteo se ha de emplear una cámara de Neubauer de profundidad especial (0.02 mm). El kit de fluorescencia está formado por una mezcla de dos compuestos (SYTO 9™ e ioduro de propidio) que fluorescen de distinta forma cuando se unen a los ácidos nucleicos de las células. Los colorantes se diferencian, además de por sus espectros de fluorescencia, por su capacidad para permear a través de la membrana celular. Mientras que el compuesto SYTO 9™ es capaz de penetrar en bacterias con su membrana celular intacta y fluorescer en verde, el ioduro de propidio sólo accede al interior de las células si éstas tienen su membrana dañada, además fluoresce en rojo. De este modo, las células que fluorescen en verde se pueden contabilizar como viables mientras que las que lo hacen en rojo se considerarían no viables al tener su membrana

dañada. Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos mediante otras técnicas: conteo de colonias y citometría de flujo.

Adicionalmente, se ha desarrollado un método sencillo para estimar la velocidad de oxidación biológica en un ciclo típico (semi-continuo) de producción de vinagre de vino. El método implica la medida continua de la concentración de etanol a lo largo del ciclo, permitiendo la estimación de esta velocidad en cada etapa. Esta información es de gran importancia para la optimización del proceso dado que nos permite evaluar la influencia de las diferentes variables operacionales sobre cada etapa del proceso.

Para ilustrar la importancia de los métodos previos, se presentan los resultados de dos estudios en los que es fundamental la disponibilidad de esta metodología.

En un primer estudio se obtiene una información detallada sobre la evolución de algunos compuestos volátiles durante el ciclo de acetificación. Estos resultados se comparan con la acidez, concentración celular y de etanol. Todo ello ayuda a conseguir un mejor entendimiento de los complejos procesos biológicos involucrados.

Los compuestos: 2-feniletanol, succinato de dietilo, meso-2,3-butanodiol, levo-2,3-butanodiol, metanol y acetato de etilo no mostraron cambios significativos entre las concentraciones existentes al principio y al final del ciclo, mientras que el resto de los analizados (excepto la acetoina) lactato de etilo, alcoholes isoamílicos (3-metilbutan-1-ol y 2-metilbutan-1-ol), isobutanol, 1-propanol y acetaldehído se consumieron de forma sustancial a lo largo del proceso. Además, se estudió los patrones de evolución de cada uno de los compuestos, así como los de concentración celular, acidez y concentración de etanol.

Para la concentración de bacterias acéticas, se encontró que cerca del final del ciclo se producen una serie de oscilaciones que podrían explicarse por fenómenos de lisis celular debida a las condiciones extremas existentes en esos momentos (alta acidez y escasez de sustrato). Estas variaciones son similares a las que se observan para algunos de los compuestos volátiles, lo que sugiere su clara interrelación con el metabolismo microbiano. Los resultados sugieren, por tanto, la necesidad de estudios más detallados, desde el punto de vista microbiológico y bioquímico para relacionar la presencia de determinados compuestos volátiles, claves para las propiedades sensoriales del producto, y el metabolismo de las células responsables.

Finalmente, considerando que de las variables operacionales que más influyen sobre el proceso, se puede destacar la concentración de etanol en el momento de la descarga, en este trabajo se ha estudiado su influencia sobre la velocidad media de acetificación y por lo tanto sobre la productividad.

Los resultados muestran que a medida que aumenta esta concentración de etanol, desde 0.5 hasta 3.5 %(v/v), la velocidad media de acetificación y producción de ácido acético aumentan en un 38 y 26% respectivamente; este incremento se produce, fundamentalmente, durante la etapa de carga. Sin embargo, en la práctica no se podría trabajar dejando un producto con ese nivel de sustrato sin aprovechar; esto sugiere la optimización conjunta de los dos reactores en serie de los que habitualmente se dispone a nivel industrial. El primer reactor ha de trabajar con una concentración final en el momento de la descarga que implique una alta velocidad de acetificación pero garantizando que el segundo reactor finalice el agotamiento del sustrato antes de que tenga que recibir de nuevo la descarga del primer tanque. Este modo de trabajo puede conducir a velocidades medias globales de acetificación mayores de las que se obtienen habitualmente cuando el sustrato se agota mucho más en el primer reactor.



## ABSTRACT

Industrially, wine vinegar is normally produced using a semi-continuous process involving submerged acetic acid bacteria. Specifically, once the alcohol content falls below a preset level, a portion of the culture medium is unloaded, that remaining in the reactor acting as inoculum for the next load. This allows the production of high-acidity vinegar, facilitates the use of part of the biomass formed in each load to rapidly ferment the next, and alters the conditions of the medium in such a way that it can be used efficiently by the most suitable organisms for the intended purpose.

This operational procedure affords easier control of some variables including the ethanol concentration at unloading time, unloaded volume and loading rate. Such variables influence the concentration and activity of acetic acid bacteria as they act simultaneously on the acidity, ethanol concentration, oxygen supply and even temperature of the medium.

Although a wealth of knowledge currently exists on the vinegar production process, there remains the need to optimize the variables, which may have a significant effect on the global process. **For this task the availability of methods for evaluate the total and viable cell concentrations as well as the fermentation rate are key issues to be solved.**

Regarding the first aspect, a rapid epifluorescence staining method using the LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability Kit (BacLight™) and direct counts in Neubauer chamber were applied to estimate both viable and total counts of bacteria in different stages of vinegar making. BacLight kit is composed of a mixture of two nucleic acid binding stains: SYTO 9™ and propidium iodide. These stains differ both in their spectral characteristics and in their ability to penetrate viable bacterial cells. SYTO 9 penetrates all bacterial membranes and stains the cells green, while propidium iodide only penetrates cells with damaged membranes, and the combination of the two stains produces red fluorescing cells. Optimal dilution and incubation conditions were found to be 1:5 and 15 min at room temperature in dark respectively. Total (red plus green) and viable (green) cells can be obtained in one staining step and hence counted simultaneously. Results obtained with this technique were compared with those from other measurement techniques (colony counts and flow cytometry).

Additionally a simple, fast method for estimating the mean rate of biological oxidation in a typical semi-continuous wine vinegar production cycle was developed. The method involves on-line monitoring changes in ethanol concentration during the cycle and allows the acetification rate in each cycle

step to be estimated. This datum is of a high interest with a view to optimizing the process by establishing the influence of the operational variables on productivity.

To illustrate the importance of the previous methods two studies were carried out to serve as examples.

A first study provides comprehensive information about the evolution of some volatile compounds during the biological acetification cycle. These data were compared with the acidity, cell concentration and ethanol concentration. Such information may allow a better understanding of the complex biological processes involved.

The volatile compounds 2-phenylethanol, diethyl succinate (diethyl butanedioate), meso-2,3-butanediol (mesobutane-2,3-diol), levo-2,3-butanediol (levo-butane-2,3-diol), methanol and ethyl acetate exhibited no significant changes between the starting wine and produced vinegar, whereas the rest [acetoin (3-hydroxybutan-2-one) excepted] ethyl lactate (ethyl 2-hydroxypropanoate), isoamyl alcohols (3-methylbutan-1-ol and 2-methylbutan-1-ol), isobutanol (2-methylpropan-1-ol), 1-propanol (propan-1-ol), and acetaldehyde were consumed in substantial amounts during the process. Additionally, their specific evolution patterns alongside bacterial cell concentrations, acidity and ethanol concentration were considered.

Concentrations of acetic acid bacteria at the end of the acetification cycle were found to vary because of cell lysis, a result of the high acidity and low ethanol concentration of the medium. Variations were similar to those in some volatile compounds, which suggest their involvement in the metabolism of acetic bacteria. The results testify to the usefulness of this pioneering study and suggest that there should be interest in similar, more detailed studies for a better knowledge of the presence of certain volatile compounds and metabolic activity in cells effecting the acetification of wine.

Finally, and taking into account that among the variables most strongly influencing the acetification process is the ethanol concentration at the time the reactor is unloaded, to ensure economically efficient industrial production of vinegar, the influence of this variable has been studied in this work.

An increase in the final ethanol concentration from 0.5 to 3.5% (v/v) increased the mean overall acetification rate and acetic acid production by 38 and 26%, respectively. The increase was established mainly during the loading phase.

The final ethanol concentration is a key variable for process optimization. If a high rate is desired then a product containing much unused substrate will be obtained, which may be industrially unacceptable. These results suggest the necessity to investigate other possibilities when high values for yield and productivity must to be achieved.



**ANEXO V**

**OTRAS APORTACIONES  
CIENTÍFICAS  
DERIVADAS  
DIRECTAMENTE DE LA  
TESIS DOCTORAL**

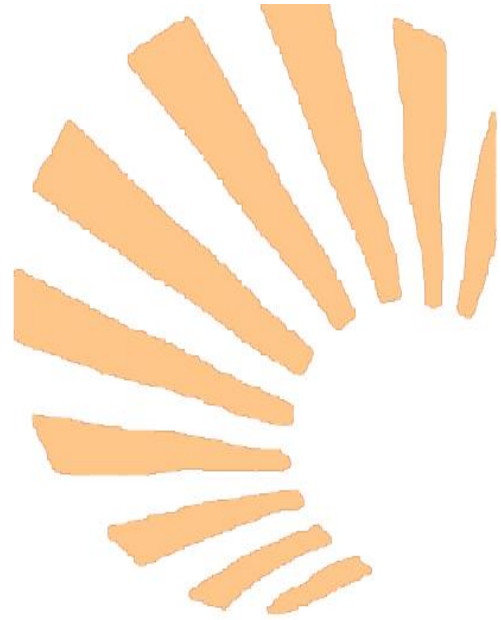


El trabajo realizado también ha contribuido de forma importante para la presentación de diferentes comunicaciones en varios congresos nacionales e internacionales:

- García-García, I., Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Cantero-Moreno, D., Bonilla-Venceslada, J.L. MODELLING AND PARAMETRIC ADJUSTMENT OF THE WHOLE CYCLE OF A SEMI-CONTINUOUS WINE VINEGAR PROCESS. *Vinegars and Acetic Acid Bacteria. International Symposium. Ponencia. Book of Abstract, pág 46. ISBN: 88-901732-0-3. Celebrado en Reggio Emilia, Italia. 8-12 de mayo de 2005.*
- García-García, I., Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Cantero-Moreno, D., Bonilla-Venceslada, J.L. OPTIMISATION OF THE WINE VINEGAR PROCESS. INFLUENCE OF ETHANOL CONCENTRATION AT THE MOMENT OF DISCHARGE. *Vinegars and Acetic Acid Bacteria. International Symposium. Ponencia. Book of Abstract, pág 57. ISBN: 88-901732-0-3. Celebrado en Reggio Emilia, Italia. 8-12 de mayo de 2005.*
- García-García, I., Baena-Ruano, S., Santos-Dueñas, I.M., Mesa, M., Barja, F. RAPID METHOD FOR TOTAL, VIABLE AND NON VIABLE ACETIC ACID BACTERIA DETERMINATION. *Vinegars and Acetic Acid Bacteria. International Symposium. Ponencia. Book of Abstract, pág 51. ISBN: 88-901732-0-3. Celebrado en Reggio Emilia, Italia. 8-12 de mayo de 2005.*
- Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Jiménez-Hornero, J., Santos-Dueñas, I.M., Bonilla-Venceslada, J.L., Cantero-Moreno, D., García-García, I. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE VINAGRE DE VINO. INFLUENCIA DEL VOLUMEN DE DESCARGA. *Segundas Jornadas de I+D+I en la Elaboración de Vinagres. Second Symposium on R+D+I for Vinegar Production. Póster. Libro de Abstract, pág 180-183. ISBN: 84-7801-816-6. Celebrado en Córdoba, España. 26-28 de abril de 2006.*
- Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J., Baena-Ruano, S., Martín-Santos, M.A., Bonilla-Venceslada, J.L., García-García, I. INFLUENCIA DE LA GRADUACIÓN TOTAL DE UN VINO MONTILLA-MORILES SOBRE LA VELOCIDAD DE ACETIFIACIÓN EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE VINAGRE. *XVI Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Póster. Libro de Abstract, pág 255-256. ISBN: 978-84-691-5094-8. Celebrado en Córdoba, España. 14-19 de septiembre de 2008.*
- Jiménez-Hornero, J.E, Santos-Dueñas, I.M., Bonilla-Venceslada, J.L., Baena-Ruano, S., Mauricio, J.C., García-García, I. A NEW PROPOSED MODEL FOR THE ACETIC ACID FERMENTATION PROCESS. *2nd International Conference on Acetic Acid Bacteria.*

Póster. Book of Abstract, pág 84. Celebrado en Nagoya, Japón. 11-14 de noviembre de 2008.

- Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E, Cañete-Rodríguez, A.M., Mauricio, J.C., García-Martínez, T., Baena-Ruano, S., García-García, I. DEPENDENCE OF VIABLE CELL CONCENTRATION ON OPERATIONAL VARIABLES DURING AN ACETIFICATION PROCESS IN A FED-BATCH PILOT FERMENTER. Third International Conference on Acetic Acid Bacteria. Vinegar and other products. Póster. Book of Abstract, pág 27. eISSN: 2240-2845. Celebrado en Córdoba, España. 17-20 de abril de 2012.
- Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E, Cañete-Rodríguez, A.M., Baena-Ruano, S., Cantero-Moreno, D., García-García, I. POLYNOMIAL MODELLING FOR THE OPTIMIZATION OF ACETIC ACID WINE FERMENTATION IN A FED-BATCH PILOT FERMENTER. Third International Conference on Acetic Acid Bacteria. Vinegar and other products. Póster. Book of Abstract, pág 29. eISSN: 2240-2845. Celebrado en Córdoba, España. 17-20 de abril de 2012.



**ANEXO VI**

**INFORME DE LAS  
PUBLICACIONES  
PRESENTADAS**



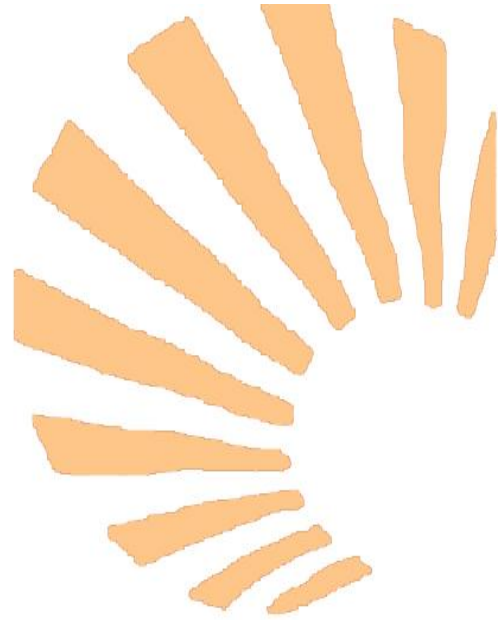


Este trabajo se ha presentado bajo el formato de “Tesis como compendio de publicaciones”, con las siguientes publicaciones.

- Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I.M., Cantero-Moreno, D., Barja, F., García-García, I. (2006). RAPID METHOD FOR TOTAL, VIABLE AND NON-VIABLE ACETIC ACID BACTERIA DETERMINATION DURING ACETIFICATION PROCESS. *Process Biochemistry*, 41, 1160-1164. ELSEVIER. ISSN: 1359-5113.
  - Indicios de calidad:
    - Índice de impacto en 2006 de 2.008.
    - Posición 10/110 en el área de Chemical Engineering.
    - Primer cuartil.
  
- García-García, I., Cantero-Moreno, D., Jiménez-Ot, C., Baena-Ruano, S., Jiménez-Hornero, J.E., Santos-Dueñas, I.M., Bonilla-Venceslada, J.L., Barja, F. (2007). ESTIMATING THE MEAN ACETIFICATION RATE VIA ON-LINE MONITORED CHANGES IN ETHANOL DURING A SEMI-CONTINUOUS VINEGAR PRODUCTION CYCLE. *Journal of Food Engineering* 80, 460-464. ELSEVIER. ISSN: 0260-8774.
  - Indicios de calidad:
    - Índice de impacto en 2007 de 1.848.
    - Posición 15/114 en el área de Chemical Engineering.
    - Primer cuartil.
  
- Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E., Bonilla-Venceslada, J.L., Álvarez-Cáliz, C., García-García, I. (2010). INFLUENCE OF THE FINAL ETHANOL CONCENTRATION ON THE ACETIFICATION AND PRODUCTION RATE IN THE WINE VINEGAR PROCESS. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85, 908-912. JOHN WILEY & SONS LTD. ISSN: 0268-2575.
  - Indicios de calidad:
    - Índice de impacto en 2010 de 1.818.
    - Posición 37/134 en el área de Chemical Engineering.
    - Segundo cuartil.
  
- Baena-Ruano, S., Santos-Dueñas, I.M., Mauricio, J.C., García-García, I. (2010). RELATIONSHIP BETWEEN CHANGES IN THE TOTAL CONCENTRATION OF ACETIC ACID BACTERIA AND MAJOR VOLATILE COMPOUNDS DURING THE ACETIC ACID FERMENTATION OF WHITE WINE. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 2675-2681. JOHN WILEY & SONS LTD. ISSN: 0022-5142.

- Indicios de calidad:
  - Índice de impacto en 2010 de 1.360.
  - Posición 9/55 en el área de Agriculture, Multidisciplinary.
  - Primer cuartil.

Es importante destacar que uno de los cuatro artículos presentados por el doctorando no aparece ni en primer ni en segundo lugar debido a que su publicación es previa a la normativa de la Universidad de Córdoba aplicable para este tipo de formato de tesis doctoral:



**ANEXO VII**

**INFORME DE LOS  
DIRECTORES**



TÍTULO DE LA TESIS: Algunos aspectos metodológicos en la investigación sobre el proceso de elaboración de vinagre de vino

DOCTORANDO/A: Silvia Baena Ruano

La tesis para la que se solicita su presentación y defensa, corresponde a un proyecto que se inscribió dentro del plan del 2007 presentado en registro el 24 de junio de 2010.

El trabajo se ha desarrollado de acuerdo con la propuesta realizada en su día y dentro del contexto de un proyecto de investigación financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL2002-01712) así como con la ayuda de diversos proyectos de investigación financiados por el Grupo SOS-Cuétara (actualmente Deoleo S.A.). La colaboración de este importante grupo multinacional del sector agroalimentario, ha sido fundamental para llevar a buen término esta investigación.

El trabajo ha sido clave para el desarrollo de algunos procedimientos metodológicos necesarios para la investigación y ha dado lugar a cuatro publicaciones en revistas internacionales lo cual ha justificado la presentación siguiendo el formato de “Tesis como compendio de publicaciones”, si bien, creemos que es importante destacar que uno de los cuatro artículos presentados el doctorando no aparece ni en primer ni en segundo lugar debido a que su publicación es previa a la normativa aplicable para este tipo de formato de tesis doctoral:

- Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I.M., Cantero-Moreno, D., Barja, F., García-García, I. (2006). RAPID METHOD FOR TOTAL, VIABLE AND NON-VIABLE ACETIC ACID BACTERIA DETERMINATION DURING ACETIFICATION PROCESS. *Process Biochemistry*, 41, 1160-1164. ELSEVIER. ISSN: 1359-5113. Indicios de calidad: Índice de impacto en 2006 de 2.008. Posición 10/110 en el área de Chemical Engineering.
- García-García, I., Cantero-Moreno, D., Jiménez-Ot, C., Baena-Ruano, S., Jiménez-Hornero, J.E., Santos-Dueñas, I.M., Bonilla-Venceslada, J.L., Barja, F. (2007). ESTIMATING THE MEAN ACETIFICATION RATE VIA ON-LINE MONITORED CHANGES IN ETHANOL DURING A SEMI-CONTINUOUS VINEGAR PRODUCTION CYCLE. *Journal of Food Engineering* 80, 460-464. ELSEVIER. ISSN: 0260-8774. Indicios de calidad: Índice de impacto en 2007 de 1.848. Posición 15/114 en el área de Chemical Engineering.

- Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E., Bonilla-Venceslada, J.L., Álvarez-Cáliz, C., García-García, I. (2010). INFLUENCE OF THE FINAL ETHANOL CONCENTRATION ON THE ACETIFICATION AND PRODUCTION RATE IN THE WINE VINEGAR PROCESS. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85, 908-912. JOHN WILEY & SONS LTD. ISSN: 0268-2575. Indicios de calidad: Índice de impacto en 2010 de 1.818. Posición 37/134 en el área de Chemical Engineering.
- Baena-Ruano, S., Santos-Dueñas, I.M., Mauricio, J.C., García-García, I. (2010). RELATIONSHIP BETWEEN CHANGES IN THE TOTAL CONCENTRATION OF ACETIC ACID BACTERIA AND MAJOR VOLATILE COMPOUNDS DURING THE ACETIC ACID FERMENTATION OF WHITE WINE. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 2675-2681. JOHN WILEY & SONS LTD. ISSN: 0022-5142. Indicios de calidad: Índice de impacto en 2010 de 1.360. Posición 9/55 en el área de Agriculture, Multidisciplinary.

El trabajo realizado también ha contribuido de forma importante para la presentación de diferentes comunicaciones en varios congresos nacionales e internacionales:

- García-García, I., Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Cantero-Moreno, D., Bonilla-Venceslada, J.L. MODELLING AND PARAMETRIC ADJUSTMENT OF THE WHOLE CYCLE OF A SEMI-CONTINUOUS WINE VINEGAR PROCESS. *Vinegars and Acetic Acid Bacteria. International Symposium. Ponencia. Book of Abstract*, pág 46. ISBN: 88-901732-0-3. Celebrado en Reggio Emilia, Italia. 8-12 de mayo de 2005.
- García-García, I., Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Cantero-Moreno, D., Bonilla-Venceslada, J.L. OPTIMISATION OF THE WINE VINEGAR PROCESS. INFLUENCE OF ETHANOL CONCENTRATION AT THE MOMENT OF DISCHARGE. *Vinegars and Acetic Acid Bacteria. International Symposium. Ponencia. Book of Abstract*, pág 57. ISBN: 88-901732-0-3. Celebrado en Reggio Emilia, Italia. 8-12 de mayo de 2005.
- García-García, I., Baena-Ruano, S., Santos-Dueñas, I.M., Mesa, M., Barja, F. RAPID METHOD FOR TOTAL, VIABLE AND NON VIABLE ACETIC ACID BACTERIA DETERMINATION. *Vinegars and Acetic Acid Bacteria. International Symposium. Ponencia. Book of Abstract*, pág 51. ISBN: 88-901732-0-3. Celebrado en Reggio Emilia, Italia. 8-12 de mayo de 2005.

- Baena-Ruano, S., Jiménez-Ot, C., Jiménez-Hornero, J., Santos-Dueñas, I.M., Bonilla-Venceslada, J.L., Cantero-Moreno, D., García-García, I. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE VINAGRE DE VINO. INFLUENCIA DEL VOLUMEN DE DESCARGA. Segundas Jornadas de I+D+I en la Elaboración de Vinagres. Second Symposium on R+D+I for Vinegar Production. Póster. Libro de Abstract, pág 180-183. ISBN: 84-7801-816-6. Celebrado en Córdoba, España. 26-28 de abril de 2006.
- Jiménez-Ot, C., Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J., Baena-Ruano, S., Martín-Santos, M.A., Bonilla-Venceslada, J.L., García-García, I. INFLUENCIA DE LA GRADUACIÓN TOTAL DE UN VINO MONTILLA-MORILES SOBRE LA VELOCIDAD DE ACETIFICACIÓN EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN DE VINAGRE. XVI Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Póster. Libro de Abstract, pág 255-256. ISBN: 978-84-691-5094-8. Celebrado en Córdoba, España. 14-19 de septiembre de 2008.
- Jiménez-Hornero, J.E, Santos-Dueñas, I.M., Bonilla-Venceslada, J.L., Baena-Ruano, S., Mauricio, J.C., García-García, I. A NEW PROPOSED MODEL FOR THE ACETIC ACID FERMENTATION PROCESS. 2nd International Conference on Acetic Acid Bacteria. Póster. Book of Abstract, pág 84. Celebrado en Nagoya, Japón. 11-14 de noviembre de 2008.
- Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E, Cañete-Rodríguez, A.M., Mauricio, J.C., García-Martínez, T., Baena-Ruano, S., García-García, I. DEPENDENCE OF VIABLE CELL CONCENTRATION ON OPERATIONAL VARIABLES DURING AN ACETIFICATION PROCESS IN A FED-BATCH PILOT FERMENTER. Third International Conference on Acetic Acid Bacteria. Vinegar and other products. Póster. Book of Abstract, pág 27. eISSN: 2240-2845. Celebrado en Córdoba, España. 17-20 de abril de 2012.
- Santos-Dueñas, I.M., Jiménez-Hornero, J.E, Cañete-Rodríguez, A.M., Baena-Ruano, S., Cantero-Moreno, D., García-García, I. POLYNOMIAL MODELLING FOR THE OPTIMIZATION OF ACETIC ACID WINE FERMENTATION IN A FED-BATCH PILOT FERMENTER. Third International Conference on Acetic Acid Bacteria. Vinegar and other products. Póster. Book of Abstract, pág 29. eISSN: 2240-2845. Celebrado en Córdoba, España. 17-20 de abril de 2012.

Igualmente, el trabajo presentado ha sido fundamental para el desarrollo de diversas tesis, ya presentadas, en el contexto de la investigación del grupo.

Parte de estos resultados han sido especialmente interesantes, hasta el punto de sugerir nuevos proyectos de investigación. En concreto, parte de ellos



han sido susceptibles de ser transferidos al sector industrial al facilitar la concesión de un proyecto PETRI (PET2006-0827).

El doctorando comenzó su labor investigadora en 2003 y gracias a la experiencia conseguida con el desarrollo de su tesis, inició inmediatamente su actividad profesional fuera de esta Universidad, lo que ha prolongado en el tiempo la presentación de esta tesis doctoral.

Como directores de este trabajo, mostramos nuestra satisfacción con los resultados obtenidos y pensamos que reúne sobradamente los requisitos mínimos para el acto que se solicita.

Por todo ello, damos nuestro visto bueno a la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 8 de marzo de 2013

Firma del/de los director/es

Fdo.: Isidoro García García

Fdo.: Inés M<sup>a</sup> Santos Dueñas







