

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---



PRODUCCION DE ACIDO ACETICO A PARTIR DE AGUA DE  
COCO POR *Acetobacter aceti*

---

**TESIS PROFESIONAL**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

BERTHA ARACELI ZUÑIGA VILLALPANDO

GUADALAJARA, JAL.

1991

---



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Sección .....  
 Expediente .....  
 Número .. 0274/91 ..

SRITA. BERTHA ARACELI ZUÑIGA VILLALPANDO  
 P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el -  
 tema de Tesis "PRODUCCION DE ACIDO ACETICO A PARTIR DE AGUA DE COCO CON --  
Acetobacter aceti" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Direc-  
 tor de dicha Tesis el M. en C. Fernando Peraza Luna.

A T E N T A M E N T E  
 "PIENSA Y TRABAJA"  
 "AÑO JOSE GUADALUPE ZUNO HERNANDEZ"  
 Guadalajara, Jal., 8 de Mayo de 1991

EL DIRECTOR



FACULTAD DE  
 CIENCIAS BIOLÓGICAS

M. EN C. ~~CARLOS BEAS ZARATE~~ *Beas Zarate*

EL SECRETARIO

*M. P. Tena Meza*

M. EN C. MARTIN P. TENA MEZA

c.c.p. El M.en C. Fernando Peraza Luna; Director de Tesis.-Pte.  
 c.c.p. El expediente del alumno.

CBZ/MPTM/cglr.

Al contestar este oficio cítese fecha y número



CENTRO DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA EN TECNOLOGIA  
Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO A.C.

Ref. M.F. 090/91.

28 de Agosto de 1991.

M. en C. CARLOS BEAS ZARATE.  
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.  
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.  
P R E S E N T E.

Por este medio, le comunico a Usted que la Pasante de la Licenciatura en Biología BERTHA ARACELI ZUÑIGA VILLALPANDO, en el mes de Abril de 1991 concluyó satisfactoriamente el trabajo experimental de la Tesis Titulada: "Producción de Acido Acético a partir de Agua de Coco por Acetobacter aceti", realizada en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco.

Asimismo, le informo que he revisado el manuscrito de la Tesis y habiendo considerado que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad a su digno cargo, lo presentamos a su consideración.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E.

M. en C. FERNANDO A. PERAZA LUNA.  
JEFE DEL DEPTO. DE MICROB. Y FERMENTACIONES.  
CIATEJ, A.C.

FAPL/'nzk.

## FE DE ERRATAS

- PAG. 1 En el último párrafo dice: derivados de ácido cítrico como aditivo alimenticio(1). Debe decir: derivados de ácido acético como aditivo alimenticio (1).
- PAG. 3 En el último párrafo dice: Pasteur en 1868, confirmó los hallazgos de Kurtzing y informó.... Debe decir: Pasteur en 1868, confirmó los hallazgos de Kurtzing e informó....
- PAG. 11 En el inciso e) dice: Aptación. Debe decir: Adaptación.
- PAG. 12 Dice: El medio se esterilización por calor húmedo, 15 minutos a 121°C. Debe decir: El medio se esterilizó por calor húmedo, 15 minutos a 121°C.
- PAG. 13 Dice: El medio de esterilización por calor húmedo 15 minutos a 121°C. Debe decir: El medio se esterilizó por calor húmedo, 15 minutos a 121°C.
- Dice: El pH de los medios se ajusto a 5.5 con...  
Debe decir: El pH de los medios se austo a 4.5...
- PAG. 24 Dice: de azúcares reductores de 24 totales....  
Debe decir: de azúcares reductores totales....
- PAG. 49 Dice: 
$$Y_{p/s} = \frac{g \text{ de etanol (final)} - g \text{ de etanol (inicial)}}{g \text{ de ART (final)} - g \text{ de ART (inicial)}}$$
- Debe decir:
- $$Y_{p/s} = \frac{g \text{ de etanol (final)} - g \text{ de etanol (inicial)}}{g \text{ de ART (inicial)} - g \text{ de ART (final)}}$$

## **AGRADECIMIENTOS ESPECIALES.**

**A DIOS NUESTRO SEÑOR**, por haberme permitido terminar mi tesis, y así, culminar mi carrera profesional, haciendo posible una meta más. Por darme la vida, y haberme acompañado durante la realización de la presente, como lo ha hecho siempre en cada momento de mi vida.

### **Dedicada especialmente a mis Padres:**

Por su constante esfuerzo para mi formación profesional, por darme su tiempo, su apoyo, su amor y protección.... GRACIAS.

Que DIOS los bendiga.

### **A mis Hermanos:**

Por su apoyo constante, con mucho cariño.

### **A mis Abuelitos:**

Mateo y Ceci  
con todo mi amor.

## **MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO.**

A mi Maestro, Amigo y Director, **M. en C. Fernando Antonio Peraza Luna**, por su motivación constante y dedicación, al ser la guía para la realización de este trabajo, así como por su amistad y apoyo incondicional que tan enormemente contribuyó en mi formación académica...

### **MI GRATITUD Y ADMIRACION**

A mi Maestra, Amiga y Asesor, **M. en C. Ingrid Mayarin Rodríguez Buenfii**, por su valiosa colaboración, orientación y consejos en la realización de este trabajo, por su apoyo y amistad...

### **MI GRATITUD Y ADMIRACION**

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), A.C., por brindarme la oportunidad al permitirme realizar mi tesis en sus instalaciones...

### **GRACIAS**

Al **Biólogo Gabriel Moreno Hagelsieb**, por su colaboración y ayuda durante la realización de este trabajo, y por su gran amistad...

### **GRACIAS**

A todos mis compañeros y amigos que conforman el departamento de Microbiología y Fermentaciones, así como también de la Planta Piloto de Fermentaciones del CIATEJ, por su apoyo incondicional y grandiosa amistad...

### **GRACIAS**

A todos mis compañeros y amigos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U de G, de la novena generación "**Ruy Pérez Tamayo**" que de una forma directa o indirecta intervinieron en la elaboración de la tesis, para todo ellos sinceramente...

### **GRACIAS**

A mis amigos **René Jasso** y **Ana Ma. Bañuelos** por su ayuda y amistad...

### **GRACIAS**

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL CENTRO DE INVESTIGACION Y ASISTENCIA EN TECNOLOGIA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO (CIATEJ ) A.C.

EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA Y FERMENTACIONES, DE LA DIVISION DE BIOTECNOLOGIA. CON LA DIRECCION DE EL M. EN C. FERNANDO A. PERAZA LUNA Y ASESORAMIENTO DE LA M. EN C. INGRID M. RODRIGUEZ BUENFIL.

## INDICE

	Pág.
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	2
III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	11
IV. MATERIALES Y METODOS	12
V. METODOLOGIA	17
VI. RESULTADOS	21
VII. DISCUSIONES	23
VIII. CONCLUSIONES	25
IX. TABLAS	26
X. FIGURAS	32
XI. ANEXO	49
XII. BIBLIOGRAFIA	50



## I.- INTRODUCCION.

En las últimas décadas la Biotecnología, como disciplina producto de la fusión de la bioquímica, la genética, la ingeniería química y la microbiología, aplicada a la producción y utilización de los microorganismos y de sus productos, ha venido ofreciendo nuevas y mejores alternativas para las industrias como la alimentaria, farmacéutica, agrícola, minera y de alcohol, entre otras. En nuestro país, actualmente, se requiere desarrollar procesos tecnológicos competitivos a corto plazo.

Dentro de este contexto se ha observado un creciente interés en el aprovechamiento de residuos agroindustriales para la obtención de productos biotecnológicos con posibilidades reales de comercialización (1).

Por otro lado, considerando que algunas regiones costeras de Jalisco cuentan con fabricas de coco rayado y aceite de coco, en cuyos procesos se utiliza básicamente la pulpa o carne como materia prima, se ha notado una elevada subutilización de grandes porcentajes del fruto, siendo el agua de coco uno de los principales residuos (2).

De ahí la importancia del aprovechamiento del agua de coco en la obtención de nuevos productos, como el vinagre, demandado para la producción de derivados del ácido cítrico como aditivo alimenticio (1).

## II.- ANTECEDENTES.

El vinagre se ha conocido y apreciado como un aditivo importante en los alimentos desde que el hombre ha practicado el arte de la fermentación y la elaboración de vinos (1). La palabra vinagre deriva de dos palabras francesas, "VIN" y "AIGRE", significando "vino agrio", pero el termino se aplica hoy al producto de la fermentación acética del etanol de diferentes fuentes (3).

El vinagre es un líquido impuro, transparente y de olor fuerte que se obtiene por la fermentación acética del vino, sidra, cerveza o productos similares (1). La palabra fermentación es de origen latino y en sentido escrito se ha usado para designar la transformación del jugo de uva en vino. La palabra latina "ferver" significa "hervir" y se usa para describir el aspecto efervescente del jugo de uva en fermentación (4, 15).

La fermentación acética se define como un proceso biológico en el que se logra la acetificación de las soluciones alcohólicas derivadas de materiales azucarados (1).

El vinagre puede obtenerse de una gran variedad de sustancias, siendo el principal requisito un suficiente contenido de azúcar de la cual puede derivarse el alcohol. Entre las materias primas más usadas se encuentran:

1. Jugo de frutas: manzana, uva, naranja, pera, fresa, etc.
2. Hortalizas amiláceas: patatas y boniatos.
3. Cereales malteados: cebada, centeno, trigo y maíz.
4. Azúcares: jarabes, melazas, miel, etc.
5. Licores o alcohol: como líquidos alcohólicos sobrantes de la manufactura de levaduras (cerveza) o del alcohol etílico desnaturalizado y diluido (2).

Así pues, cualquier sustancia o materia que contenga azúcar o alcohol en cantidades suficientes, y no ofrezca inconvenientes como alimento, puede utilizarse para la fabricación de vinagre.

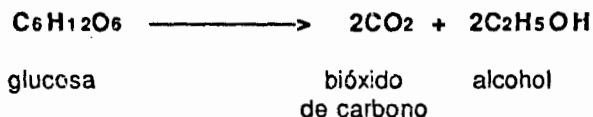
## 1.- PRODUCCION DE ACIDO ACETICO A PARTIR DE SUSTANCIAS AZUCARADAS.

La producción de ácido acético requiere de dos procesos fermentativos (FIGURA 1):

### A. Fermentación alcohólica.

La fermentación del azúcar para la producción de alcohol involucra un proceso **ANAEROBIO** efectuado por las levaduras como Saccharomyces cerevisiae, productoras de grandes cantidades de alcohol (4, 15).

Brevemente, este proceso puede resumirse en la siguiente ecuación:



### B. Proceso de producción de ácido acético.

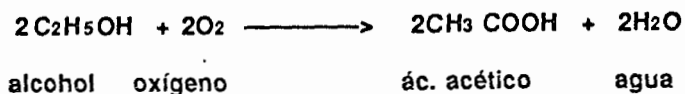
Existen procesos microbianos para la producción de ácido acético, que pudieran competir en todos los aspectos con los procesos químicos. Actualmente, el ácido acético es producido por procesos químicos en los E.U.A, teniendo buena aceptación, y clasificados precisamente en tres: oxidación de n-butano (33%); carbonilación de metanol (32%) y oxidación de acetaldehído (32%) (5).

El proceso de carbonilación de metanol se incrementó en uso y, a mediados de los 80's, fue la fuente mayor de ácido acético en los E.U.A. Esto se volvió más significativo, en vista de que el metanol sería uno de los productos principales de la gasificación del carbón. Obviamente, los procesos biológicos tendrán que competir con los procesos anteriores, y las materias primas para éstos procesos tendrán que competir con el metanol, aunque en la actualidad los procesos biológicos tienen mayor preferencia que cualquiera otros por su excelente calidad (5).

La producción de ácido acético es el segundo proceso fermentativo más antiguo conocido por el hombre. El primer reporte describiendo la naturaleza de la "Madre del Vinagre" fue hecho por Pearson en 1822, llamando a ésta película "micoderma". Kurtzing, en 1836, reconoció que los responsables de la acetificación del alcohol eran organismos minúsculos del licor madre. Pasteur, en 1868, confirmó los hallazgos de Kurtzing y informó que la conversión de vino a vinagre era realizada por una especie de bacteria que nombró "Micoderma aceti" (6).

La oxidación del alcohol a ácido acético es una reacción **AEROBIA** efectuada por las bacterias acéticas como *Acetobacter aceti* productoras de ácido acético (4, 15).

Este proceso puede resumirse en la siguiente ecuación:



El primer método utilizado fué lo que Cruess, en 1948, llamó el método "déjalo solo" (3). El vino, almacenado en contenedores abiertos, se convertía en vinagre, por bacterias que se manifestaban naturalmente en los recipientes o en las frutas, o acarreadas en el aire (3).

El químico alemán Schutzenbach desarrolló un proceso en el cual hacía gotear vinagre sobre viruta de madera, contenida en la superficie de un generador. De esta forma se aceleraba la acetificación y se aumentaba la eficiencia de conversión de 60 a 80 %, ampliándose la técnica hasta fines de 1940 (3).

Como ejemplo reciente, se puede citar el trabajo que los investigadores Mehaia & Cheryan, en 1991, realizaron sobre la utilización de extractos de dátil como una fuente para la producción secuencial de etanol y vinagre, utilizando un reactor continuo de membrana (7). El objetivo de este estudio fue asegurar que se obtuvieran niveles de ácido acético mayores de 45.0 g/l, para alcanzar los estándares para vinagre. Los azúcares del extracto (como glucosa y fructosa), se convirtieron en etanol por *Saccharomyces cerevisiae*. Por otra parte, se utilizó la cepa de *Acetobacter aceti*, especial para la fermentación acética sumergida. La concentración final de ácido acético fue de 39.1 g/l, dando un rendimiento de 0.83 g ácido acético por gramo de etanol. El rendimiento fue un 65 % del valor teórico de 1.28 g/g. Este estudio demostró que los azúcares del jugo de dátil ofrecen una fuente viable para la producción de etanol y/o ácido acético por fermentación (7).

De lo anterior, puede notarse que el ácido acético es una sustancia que se puede sintetizar por medios biológicos, donde el etanol es oxidado a ácido acético por *Acetobacter aceti*; siendo éste un mercado de muy rápido crecimiento para el etanol (10 % al año) (5).

La composición del vinagre, depende del material utilizado en su fabricación. Los vinagres procedentes de frutas o licores malteados, poseen reminiscencias del aroma de éstos materiales. También influye poderosamente el método de fabricación. El vinagre debe ser muy claro se clarifica mediante filtración y refinado. Gran parte del vinagre que en la actualidad se vende en el mercado, es vinagre previamente pasteurizado, en masa o en botellas (8).

No se dispone de datos precisos sobre la cantidad y uso del vinagre en el mundo en estos días, pero tan solo en los E.U.A., el consumo excede los 530 millones de litros al año. El proceso de manufactura se ha desarrollado desde un proceso de fermentación incontrolada, hasta uno automatizado y cuidadosamente monitoreado. Los usos más importantes, la conservación y mejoramiento de alimentos, son los mismos hoy que en la antigüedad (3).

## 2. MICROORGANISMOS.

La selección del microorganismo no solo se limita a que pueda llevar a cabo la reacción deseada, sino también el que pueda efectuar el cambio bioquímico necesario en poco tiempo, que produzca el rendimiento máximo posible y que mantenga sus características de generación en generación.

Las bacterias del ácido acético son importantes por: a) oxidar el alcohol etílico a ácido acético, lo que las hace útil en la fabricación de vinagre y perjudiciales para las bebidas alcohólicas y b) su extraordinaria capacidad oxidativa (6).

Las bacterias acéticas son, económicamente, un grupo de microorganismos importantes comercialmente para el hombre. La importancia de éstos reside en su aplicación industrial para la obtención de productos útiles, debido a las propiedades fermentativas y oxidantes que desarrollan sobre determinados sustratos (10).

Por otra parte, en los últimos años, la bacteria del género *Acetobacter acetii* ha tomado una enorme importancia. Es un microorganismo de un gran potencial y de rápida producción de ácido acético (vinagre) para aplicaciones industriales. En el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey's (11) se indica una lista en la que propone 19 especies de *Acetobacter* formadoras de ácido acético.

La *Acetobacter acetii* oxida el alcohol etílico a ácido acético . y transforma otros compuestos orgánicos en productos de oxidación diversos (6).

A partir de los estudios de Nakayama, en 1961, se postuló el esquema para la oxidación del etanol por las especies de *Acetobacter* :

El etanol es oxidado primero a acetaldehído por E1 (alcohol citocromo 553 reductasa), la cual es reducida por los electrones liberados. El acetaldehído es oxidado ya sea por E2 (aldehído deshidrogenasa) cuando se liberan los electrones hacia E1, o por E3 (aldehído deshidrogenasa dependiente de NADP) cuando se reduce NADP (nicotinamida adenindinucleótido fosfato) a NADPH<sub>2</sub>. Por otro lado, la E1 reducida es entonces oxidada por un citocromo oxidasa. En base a los efectos inhibitorios del (CN) (cianuro) y del PCMB, (p cloromercuriobenzoato) se presume que el sistema de citocromos es utilizado por E1 y E2 para la oxidación del etanol y del acetaldehído, mientras que el NADPH<sub>2</sub> producido por E3 inhibe la mayor oxidación del ácido acético a través del ciclo TCA (ácido tricarbóxico) cambiando el equilibrio NADPH<sub>2</sub> a NADP<sub>2</sub> (FIGURA 2) (6).

Las bacterias del ácido acético pertenecen a la familia *Pseudomonadaceae*, son bacilos móviles o inmóviles con flagelos peritricos, Gram-negativos, no esporógenos, aerobios obligados y generalmente catalasa positivos.

Entre las bacterias del ácido acético, presentes en todas las etapas de fabricación del vino, desde la uva madura hasta la vitificación y conservación, la *Acetobacter acetii* se encuentra presente a niveles bajos en el vino, exhibiendo una rápida proliferación con exposiciones cortas del vino al aire y causando incrementos significativos en la concentración de ácido acético.

Las temperaturas altas de almacenaje y los pH's altos, favorecen el desarrollo y el metabolismo de estas especies (9).

Conner y Allgeier, han realizado estudios genéticos y microbiológicos a las bacterias de *Acetobacter*, describiendo que tienen una mutabilidad anormalmente alta en la producción de vinagre. Por otro lado, otro investigador encontró que con 39 cepas de *Acetobacter* no hubo cambios notables en propiedades y todavía existe controversia (5).

### 3. EL AGUA DE COCO COMO POSIBLE SUSTRATO PARA LA PRODUCCION DE VINAGRE.

El agua de coco constituye actualmente una bebida rica y refrescante que se consume diariamente en la zona donde se produce. En los procesos que utilizan el coco como materia prima, se aprovechan básicamente la carne desperdiándose grandes porcentajes del fruto, siendo el agua de coco uno de los residuos de mayor importancia (FIGURA 3). En algunas regiones costeras de Jalisco, particularmente en las fábricas de la zona de Cihuatlán, se producen anualmente hasta 500,000 litros de agua de coco, de la cual un 60 % se desaprovecha (TABLA 1) (3).

El agua de coco maduro (10 a 12 meses) contiene entre 20 y 40 g/l de azúcares. Cuando el agua de coco se desecha durante la fabricación de algún producto, constituye un problema en cuanto a su eliminación ya que la descomposición biológica contamina el área circundante produciendo ácidos; dañando los suelos y ejerciendo un efecto perjudicial sobre los cultivos cercanos (3, 14).

Respecto a la composición de agua de coco, entre otros componentes se ha encontrado glucosa, fructosa, sacarosa, sorbitol, m-inositol, s-inositol y galactosa (2). Así mismo, contienen otros componentes importantes como: grasas, proteínas, minerales como el calcio, magnesio, zinc, fuentes de nitrógeno y fósforo (TABLA 2). También se han encontrado aminoácidos libres, factores de crecimiento como indolacético-arabinosa y 1,3-difenilurea (2).

Investigadores filipinos, en 1965, encontraron que el agua de coco fue también un medio excelente para el cultivo de levadura (3). También ésta agua de coco maduro, puede ser utilizada como materia prima para la obtención de diversos metabolitos de interés industrial (3, 14).

#### **4. FACTORES CARACTERISTICOS, NECESARIOS PARA LA REALIZACION DEL PROCESO DE PRODUCCION DEL ACIDO ACETICO POR FERMENTACION.**

Como todos los seres vivos, los microorganismos crecen, se reproducen y segregan algunos compuestos bioquímicos de importancia para el hombre. Esta es una de las características primordiales para la utilización de los microorganismos en los procesos fermentativos. Es decir, que para que una fermentación se realice son necesarios los siguientes requisitos (FIGURA 4):

-Tener un microorganismo de características idóneas para el proceso y/o producto particular.

-Proveer un medio de cultivo adecuado (que contenga todos los nutrimentos esenciales en las proporciones y cantidades óptimas de producción).

-Establecer y controlar las condiciones fisico-químicas necesarias para el desarrollo de la fermentación.

Como resultado se obtendrá una cantidad de microorganismos mayor que la inicial y diversos productos (12, 23).

## A. NUTRIMENTOS.

En todo proceso fermentativo, el medio de producción se considera un factor de importancia vital desde el punto de vista económico.

Los nutrientes son compuestos del sustrato o materia prima asimilables por el microorganismo. La materia prima contiene a menudo suficientes sustancias nutritivas, aunque en ocasiones es necesario agregar compuestos que desempeñen un papel esencial. Para la mayoría de las materias primas utilizadas para fermentación alcohólica y acética utilizando cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y *Acetobacter aceti*, los suplementos más necesarios son los compuestos fuentes de nitrógeno y fósforo (12).

El nitrógeno se suministra en forma de sales de amonio, urea, aminoácidos, etc. El sulfato de amonio es el más ampliamente utilizado en fermentaciones industriales. Una limitación de iones de amonio en el medio de nutrientes causa una repentina transición de la fase de crecimiento exponencial a la fase de crecimiento lineal (12).

El fósforo se añade en forma de fosfatos; el más utilizado es el fosfato de amonio. La concentración de fosfatos controla la síntesis de lípidos y carbohidratos y mantiene la integridad de la membrana; siendo también una sustancia promotora del crecimiento (12).

Además de los elementos nutricionales ya mencionados, son importantes también: el carbono, hidrógeno, oxígeno, potasio, hierro, azufre y magnesio. Así pues, las levaduras, como las bacterias y otras formas de vida, requieren de estos materiales alimenticios para un apropiado crecimiento y reproducción (13).

Las vitaminas regulan el metabolismo del microorganismo y su función es la de un cofactor enzimático. Los requerimientos de las vitaminas esenciales para los rangos de fermentación dependen del microorganismo.

*Saccharomyces cerevisiae*, requiere de vitaminas. Para realizar una función catalítica vital, las vitaminas deben ser suministradas en el medio o sintetizadas por la misma levadura. Algunas de las vitaminas esenciales son: biotina, niacina, riboflavina, tiamina, piridoxina, ácido fólico y ácido pantoténico (13).

*Acetobacter aceti*, ha mostrado crecimiento en medios simples y complejos, donde la mayoría de estas cepas no requieren de vitaminas. Utilizan como fuente de carbono: etanol, lactato, hexosa, glicerol, y en pocas cantidades el manitol y glutamato.



## B. CONDICIONES AMBIENTALES.

Para que un proceso se desarrolle eficientemente, también es de considerable importancia que se establezcan y controlen las condiciones ambientales, para que el microorganismo transforme las sustancias nutritivas al producto deseado con un máximo de eficiencia. Entre las condiciones básicas se encuentran el pH, concentración de azúcar, temperatura y oxígeno.

El efecto del pH es muy importante en el control de la contaminación, en el efecto del crecimiento del microorganismo y en la formación de subproductos (12, 15).

La concentración de alcohol es otro factor importante que determina el rendimiento de fermentación acética, la eficiencia de conversión de etanol del microorganismo, lo cual es un parámetro clave para la valoración de la fermentación como tal (12, 15).

Por otro lado, la temperatura se debe mantener siempre en los intervalos óptimos, tanto para el crecimiento como para la acción enzimática. Se ha observado que operando cerca del rango de la temperatura máxima se reduce la tolerancia al etanol así como también se nota decremento rápido de la viabilidad celular. (12, 15).

El oxígeno es necesario en los primeros momentos de la fermentación alcohólica, particularmente para la reproducción de las células en condiciones óptimas. Para la fermentación acética, el oxígeno es un factor importante durante todo el proceso (12, 15).

Las condiciones ambientales que Saccharomyces cerevisiae requiere para su buen funcionamiento durante el proceso fermentativo, es un pH de 4.5 a 6.5 y una temperatura de 30°C. Para Acetobacter acetii se requiere de un pH entre 4.5 y 5.0, una temperatura de 35°C, y una agitación de 300 rpm. Se ha observado que la cantidad de oxígeno incrementa significativamente la concentración de ácido acético y que una mayor temperatura causa desestabilización de la membrana y un rápido decremento en la viabilidad celular (6).

### **C. DEFECTOS Y ENFERMEDADES DEL VINAGRE.**

Después de que la fermentación acética se ha completado, el vinagre no debe ser expuesto al aire debido a que puede sufrir una oxidación adicional causada por las mismas bacterias acéticas durante el proceso de fermentación. Esto se ha observado cuando no hay alcohol suficiente o cuando la aireación es excesiva, reduciéndose el vinagre rápidamente a una condición de baja calidad (14).

Después que todo el alcohol ha sido convertido a ácido acético, las bacterias del vinagre, igual que otras bacterias contaminantes, atacan al ácido mismo, causando una disminución de la acidez total, en presencia del aire. Estas situaciones pueden ser prevenidas llenando completamente el recipiente y sellados fuertemente para excluir el aire, ya que el sabor y la calidad del vinagre son mejorados por el añejamiento, pero puede ser usado inmediatamente después de su generación (14).

### III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.

#### 1. HIPOTESIS

Empleando el agua de coco como sustrato, se producirá ácido acético con rendimientos similares a los reportados en proceso biológicos para producción de vinagre.

#### 2. OBJETIVO GENERAL.

El presente estudio propone la utilización del agua de coco para la producción de ácido acético y evaluar los rendimientos obtenidos. La posibilidad se plantea realizarla a nivel laboratorio, determinando las condiciones nutricionales y físico-químicas adecuadas para lograr el objetivo.

#### A. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- a) Caracterización de la materia prima.
- b) Estandarización del inóculo en agua de coco, para producción de alcohol por Saccharomyces cerevisiae.
- c) Realización de fermentaciones alcohólicas en agua de coco determinando rendimientos.
- d) Estandarización del inóculo en agua de coco, para producción de ácido acético por Acetobacter aceti.
- e) Aptación y determinación de un medio mínimo con agua de coco, para producción de ácido acético para Acetobacter aceti.
- f) Realización de fermentaciones acéticas en agua de coco, evaluando los rendimientos en el medio mínimo seleccionado o en tal medio enriquecido con glucosa.

## IV. MATERIALES Y METODOS.

### 1. MICROORGANISMOS.

Los microorganismos utilizados fueron una levadura Saccharomyces cerevisiae (BCGC L-002) productora de etanol y una bacteria Acetobacter acetii (BCGC B-052) productora de ácido acético; ambas cepas obtenidas del Banco de Cepas y Genes del CIATEJ.

### 2. REACTIVOS.

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y obtenidos de fuentes comerciales conocidas.

### 3. EQUIPO.

Espectrofotómetro MRC Spectronic 20D, balanza analítica Chyo jupiter SDT-200, estufa incubadora Felisa 133, agitador magnético corning Stirrer / Hotplate PC-250, microscopio compuesto Microstar AO 1130, campana de flujo laminar Veco GVHL-B 18, orbital New Brunswick Scientific G 25, potenciómetro Hanna Instrument HI 8424, balanza granataria Chyo electronic JP-5000 micropipeta Gilson 1000 µl, microdestilador Lab. Glass 10/18, cámara de Neubauer, autoclave Infra, campana de extracción CIATEJ.

### 4. MEDIOS DE CULTIVO Y DE FERMENTACION.

#### A. Medios de Cultivo.

**MMA:** Medio de mantenimiento para la cepa Acetobacter acetii.

Extracto de levadura	5.0 g/l
Peptona biotriptasa	3.0 g/l
Manitol	25.0 g/l
Agar	15.0 g/l

El medio se esterilización por calor húmedo, 15 minutos a 121°C.

**MMS:** Medio de mantenimiento para Saccharomyces cerevisiae.

Agua de coco	1 lt.
Agar	2.5 %

El medio de esterilización por calor húmedo, 15 minutos a 121°C.

## B. Medios de Fermentación.

Medios de fermentación alcohólica para Saccharomyces cerevisiae

### a) MFAL (+)

Agua de coco	1 lt.
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.28 g/l

### b) MFAL (-)

Agua de coco	1 lt.
--------------	-------

El pH de los medios se ajusto a 5.5 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:1) o con NaOH (30 %).  
Se esterilizó a 121°C por 15 minutos.

Medios de fermentación acética para Acetobacter aceti.

### 1) MFAC-1

Agua de coco fermentada	1 lt.
-------------------------	-------

### 2) MFAC-2

Agua de coco fermentada	1 lt.
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.28 g/l

### 3) MFAC-3

Agua de coco fermentada	1 lt.
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.28 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.25 g/l

### 4) MFAC-4

Agua de coco fermentada	1 lt.
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.28 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.25 g/l

Jugo de tomate	250 ml/l
Acido cítrico	0.12 g/l
Acido láctico	1.0 g/l

#### 5) MFAC-5

Agua de coco fermentada	1 lt.
$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$	0.28 g/l
$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	0.25 g/l
Jugo de tomate	250 ml/l

#### 6) MFAC-6

Agua de coco fermentada	1 lt.
$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$	0.28 g/l
$\text{KH}_2 \text{PO}_4$	0.25 g/l
Acido cítrico	0.12 g/l
Acido láctico	1.0 g/l

#### 7) MFAC-2\*

Medio MFAC-2 enriquecido con 60.0 g/l de glucosa y fermentado.

El pH de los medios se ajusto a 5.0 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1:1) o con NaOH (30 %). Se esterilizó a 121°C por 15 minutos.

## 5. TECNICAS ANALITICAS.

A.- Conteo directo de células por el método de azul de metileno.

Los reactivos utilizados fueron disueltos en agua destilada, según la concentración mencionada a continuación:

Azul de metileno	10 g/l
Citrato de sodio	50 g/l

a) Procedimiento:

En un matraz aforado, de 50 ml, poner 5 ml de muestra, 2.5 ml de azul de metileno y aforar con agua destilada.

Tomar con una micropipeta de 20  $\mu$ l una muestra y, con la ayuda de la cámara Neubauer, contar la población microbiana total. Esta técnica permite conocer también la viabilidad, ya que la pared celular de las levaduras muertas absorbe el colorante; y de ésta forma es fácil identificar las células muertas de las vivas (16).

B.- Determinación de azúcares reductores totales por el método de fenol-sulfúrico ART (17).

Los reactivos utilizados fueron: ácido sulfúrico concentrado y fenol al 5 % (v/v).

a) Procedimiento:

A 1 ml de la solución problema se le adiciona 1 ml de fenol al 5 %, en seguida se agregan 5 ml de ácido sulfúrico concentrado en forma brusca para conseguir el efecto de la hidrólisis. Se deja enfriar durante 5 minutos a temperatura ambiente, se agita y en seguida se pone a baño de agua fría durante 10 minutos.

Finalmente se lee absorbancia a 490 nm.

C.- Determinación de etanol por el método de dicromato de potasio (18).

Los reactivos utilizados fueron:

Dicromato de potasio	33.768 g/l
Acido sulfúrico	325 ml

Se diluye el ácido sulfúrico en aproximadamente 400 ml de agua destilada, se deja enfriar y se agrega el dicromato diluido en aproximadamente 200 ml de agua destilada; y se afora en matraz a 1000 ml.

a) Procedimiento:

A 1 ml de muestra se le agregan 2 ml de solución de dicromato y se agita, se deja reposar durante 10 minutos y posteriormente se agregan 5 ml de agua destilada, para finalmente agitar.

Finalmente se lee absorbancia a 585 nm.

**D.-** Determinación de la concentración de ácido acético por el método de titulación (19).

Los reactivos utilizados son: Hidróxido de sodio 4.0 g/l  
Fenofaleína 50.0 g/l

a) Procedimiento:

A 5 ml de muestra se le agregan 3 gotas de fenofaleína al 5 % (indicador), posteriormente se titula con hidróxido de sodio 0.1N. Para sacar la concentración de ácido acético se observan los mililitros gastados de NaOH durante la titulación y se multiplican por su normalidad y por 0.060, que es el miliequivalente del ácido acético, dividiéndose el resultado entre los mililitros de la muestra a titular. El valor obtenido se multiplica por 1000 por tener la concentración reportada en g/l.

**E.-** Determinación del desarrollo microbiano por densidad óptica.

Del medio para crecimiento de ***Acetobacter aceti***, se hicieron diluciones 1:10 (v/v), debido a la alta concentración de células en el medio. Posteriormente, se realizó un barrido de absorbancias entre 400 y 600 nm, determinando una longitud de onda de 410 nm, con la que se midió crecimiento del microorganismo a diferentes tiempos, a fin de llegar a determinar la edad del cultivo.



## V. METODOLOGIA.

### A. ESTANDARIZACION DE METODOS ANALITICOS.

#### a) Curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores totales.

Se realizó una curva de calibración para la determinación de azúcares reductores totales, por el método de fenol-sulfúrico, se utilizó una solución patrón de sacarosa a una concentración de 0.1 g/l. El rango de concentración fue de 0.01 a 0.1 g/l. Mediante un análisis de regresión lineal se obtuvo una ecuación para el cálculo de la concentración de azúcares a partir de la absorbancia de la muestra dada. La ecuación hallada para la curva de calibración de azúcares reductores totales fue:  $Y = 1.484091 \times 10^{-2} + 6.618455(X)$ , aplicable en los rangos de absorbancia (Y) de 0.0796 a 0.6436 que correspondería a una concentración (X) de 0.01 y 0.1 g/l, respectivamente; con un coeficiente de regresión de 0.99859 para 10 puntos.

#### b) Curva de calibración para la cuantificación de etanol.

Se realizó una curva de calibración para la determinación de etanol por la técnica de dicromato de potasio se utilizó una solución patrón de alcohol etílico a una concentración de 20 g/l. El rango de concentración a probar fue de 2 a 20 g/l. Mediante un análisis de regresión lineal se obtuvo una ecuación para el cálculo de la concentración final de etanol a partir de la absorbancia de la muestra dada. Para la determinación de etanol la ecuación concentrada fue:  $Y = 9.972724 \times 10^{-3} + 4.722182 \times 10^{-2} (X)$ , aplicables para los rangos de absorbancia (Y) de 0.0942 a 0.9693 que corresponde a una concentración (X) de 2 a 20 g/l, respectivamente; con un coeficiente de regresión de 0.99894 para 10 puntos.

#### c) Técnica de acidez titulable.

Se determinó la concentración de ácido acético en la muestra por el método de titulación se utilizó como sustancia titulable NaOH 0.1N y como indicador fenoftaleína al 5 % (p/v). Para obtener la concentración de ácido acético se multiplicaron los mililitros de NaOH gastados durante la titulación por la normalidad de éste y por 0.060, que es el miliequivalente del ácido acético, dividiendo esto entre los mililitros de la muestra a titular:

$$\text{g/l de ácido acético} = \frac{(\text{ml gastados NaOH})(N)(0.060)}{(5 \text{ ml})} \times 1000$$

## B. CARACTERIZACION DE LA MATERIA PRIMA.

La caracterización de la materia prima se realizó mediante un análisis químico del agua de coco, donde se analizaron o los siguientes componentes: azúcares reductores totales, azúcares reductores libres, potasio, fósforo, sodio, calcio, magnesio, zinc, grasas, proteínas y cenizas (35).

## C. ESTANDARIZACION DEL INOCULO EN AGUA DE COCO PARA Saccharomyces cerevisiae.

Se probaron dos medios para estandarizar el inóculo de Saccharomyces cerevisiae:

1. Medio MFAL (+)
2. Medio MFAL (-)

El procedimiento empleado se describe a continuación:

Se inocularon dos matraces de 500 ml que contenían 180 ml del medio MFAL (+) y MFAL (-), respectivamente, con 20 ml de la suspensión celular de la cepa crecida en medio sólido (MMS). La suspensión celular se preparó al adicionar 5 ml de solución fisiológica estéril (NaCl al 0.85 % p/v) a tubos crecidos durante 24 horas, a una temperatura de 30°C. Los matraces se incubaron a 30°C y a 250 rpm, por 24 horas y, posteriormente, el crecimiento en medio líquido se determinó por conteo directo en la cámara de Neubauer, y el porcentaje de viabilidad por tinción con azul de metileno. Se obtuvo la curva de crecimiento en la que se analizaron muestras tomadas cada 2 horas durante 24 horas.

## D. FERMENTACION ALCOHOLICA EN AGUA DE COCO.

El procedimiento seguido se describe a continuación:

Se inoculó un matraz Erlenmeyer de 500 ml que contenían 180 ml del medio MFAL (+) con 20 ml del inóculo. El inóculo procedió de dos propagaciones sucesivas a partir de una suspensión realizada de la manera ya descrita. Se incubaron estáticamente a 35°C por 24 horas y se sacaron muestras a diferentes tiempos, a las cuales se les determinó: azúcares reductores totales y etanol. También se calculó el rendimiento de fermentación en base a la producción de alcohol y al consumo de azúcares.

## **E. ESTANDARIZACION DEL INOCULO EN AGUA DE COCO PARA Acetobacter acetii.**

Una vez llevada a cabo la fermentación alcohólica se decantaron los medios a fin de tener sólo el medio fermentado y desechar la levadura. Se probaron seis diferentes medios enriquecidos cada uno con distinto nutrientes (TABLA 4). En matraces de 500 ml, que contenían 135 ml del medio decantado, se inocularon con 15 ml de una suspensión de Acetobacter acetii a cada matraz, y se incubaron a 30°C y 300 rpm por 48 horas, tomando muestras a diferentes tiempos. Se realizó un barrido de absorbancias para determinar la longitud de onda, que permitiera medir la densidad celular, siendo la de 410 nm la seleccionada.

## **F. ADAPTACION Y DETERMINACION DE UN MEDIO MINIMO DE PRODUCCION PARA Acetobacter acetii.**

Al igual que el objetivo anterior, a partir del alcohol obtenido de la fermentación, se probaron los mismos seis diferentes medios (TABLA 4). En matraces de 500 ml, que contenían 135 ml, del medio decantado se inocularon 15 ml de una suspensión de Acetobacter acetii a cada matraz, y se incubaron a 35°C y 300 rpm por 32 horas, tomando muestras a diferentes tiempos. Posteriormente, se llevó a cabo la técnica de acidez titulable para determinar la concentración de ácido acético producido y establecer el medio mínimo para la cepa (FIGURA 5).

## **G. FERMENTACION ACETICA EN AGUA DE COCO.**

La fermentación acética se llevo a cabo en los medios fermentados, obtenidos de dos maneras diferentes:

a) Utilizando el medio mínimo seleccionado (MFA C-2), se siguieron los mismos pasos de las fermentaciones anteriores, donde una vez decantado el alcohol se añadieron los nutrientes correspondientes al medio. Realizándose análisis de azúcares reductores totales y etanol. Así mismo, se monitoreó el consumo de alcohol y la producción de ácido acético a diferentes tiempos a 35°C y 300 rpm. A partir de los resultados obtenidos en los análisis, se determinó el rendimiento de producción de ácido acético en base al sustrato y la eficiencia de fermentación.

b) Se enriqueció el medio seleccionado (MFAC-2\*) hasta 100 g/l de azúcares, se utilizó dextrosa anhidra, fermentando el medio y decantándolo para separar la levadura. A 180 ml de medio se le adicionaron los nutrientes correspondientes, y se inocularon con 20 ml de inóculo de Acetobacter acetii, crecida previamente en el medio mínimo, incubándose a las condiciones de 35°C y 300 rpm. Posteriormente, se analizó la producción de ácido acético por la técnica de acidez titulable, así como el consumo de alcohol. A partir de los resultados obtenidos en los análisis, se determinó el rendimiento de producción de ácido acético en base al sustrato y la eficiencia de fermentación.

## VI. RESULTADOS.

### 1. CARACTERIZACION DE LA MATERIA PRIMA.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de los análisis de laboratorio de la composición del agua de coco, comparados con los datos reportados en la bibliografía. Podemos observar que el agua de coco contiene una apreciable cantidad de azúcares, aproximadamente 40.0 g/l, además de una cantidad abundante de minerales.

### 2. ESTANDARIZACION DEL INOCULO EN AGUA DE COCO PARA Saccharomyces cerevisiae.

En la Figura 6 se muestra el crecimiento celular y el porcentaje de viabilidad de la levadura en el medio MFAL (-) y MFAL (+), durante 24 horas. Como se puede apreciar, estas curvas de crecimiento presentan una pequeña fase de adaptación durante las primeras 2 horas, empezando posteriormente la fase logarítmica en las horas siguientes, la cual se mantiene hasta las 10 horas, obteniéndose una población de  $132.5 \times 10^6$  cel/ml y una viabilidad del 100 % para el medio MFAL (-) y  $192.5 \times 10^6$  cel/ml y una viabilidad del 100% para el medio MFAL (+).

### 3. FERMENTACION ALCOHOLICA EN AGUA DE COCO.

La Figura 7 nos muestra el consumo de azúcares reductores totales así como el alcohol producido por la levadura en el medio MFAL (+) a nivel matraz de 500 ml; como se puede observar hay un consumo constante de azúcares mientras la producción de alcohol se va incrementando hasta 19.68 g/l a las 24 horas, a partir de lo cual tiende a estabilizarse, habiendo consumido finalmente un 88 % de sus azúcares, con un rendimiento de 0.50 (g/g) y una eficiencia de fermentación de 0.98 %.

### 4. ESTANDARIZACION DEL INOCULO EN AGUA DE COCO Y PRODUCCION DE ACIDO ACETICO POR Acetobacter aceti.

En las Figuras 8 a la 13 se observa el crecimiento de la bacteria en los seis primeros medios probados, durante 48 horas. Como se puede apreciar en las curvas de crecimiento y producción no se presenta la fase de adaptación,

empezando la fase logarítmica en las primeras horas, la cual se mantuvo hasta las 48 horas de incubación. Se decidió tomar como edad del inóculo un tiempo de 32 horas. Se selecciono el medio MFAC-3 para el crecimiento bacteriano con una densidad óptica de 2.0457 ( $A_{410\text{ nm}} \times \text{dil}$ ), para los experimentos posteriores. Por otro lado, como también se observa, se muestra la producción de ácido acético en los mismos medios, siendo el medio MFAC-2 el que mostró mayor concentración del producto (20.0 g/l). En la Tabla 5 se observa la producción de ácido acético los seis diferentes medios, donde se puede notar claramente la diferencia de producción entre estos.

## 5. FERMENTACION ACETICA EN AGUA DE COCO.

En las Figuras 14 y 15 se muestra la fermentación alcohólica, en el medio MFAL (+) normal y enriqueciéndolo con glucosa; donde se muestra el consumo de azúcares y la producción de alcohol, siendo de 14.30 g/l la concentración de alcohol producido en el medio normal y 37.35 g/l la concentración de alcohol producido en el medio enriquecido.

En las Figuras 16 y 17 se muestra el consumo de alcohol y la producción de ácido acético en los medios MFAC-2 y MFAC-2\*, donde se pudo observar que en ambas curvas no se presenta fase de adaptación, comenzando la fase logarítmica en las primeras horas, manifestándose hasta las 32 y 40 horas de incubación.

Del medio MFAC-2 se alcanzó una concentración de ácido acético de aproximadamente 17.0 g/l con un rendimiento de .49 (g/g) y un rendimiento de acidez de 1.14 g/l. Del medio MFAC-2\* se alcanzó una concentración de ácido acético de aproximadamente 41.0 g/l con un rendimiento de .49 (g/g) y un rendimiento de acidez de 1.10 g/l (TABLA 6).

## VII. DISCUSIONES.

### 1. CARACTERIZACION DE LA MATERIA PRIMA.

Se ha reportado que el agua de coco es un medio rico en nutrientes, entre ellos azúcares, fuentes de nitrógeno, sales minerales, grasas, etc. (2). Esto ha permitido emplearla en diferentes procesos, algunos de los cuales a escala industrial.

En éste trabajo se pudo observar que la concentración de azúcares (aproximadamente 40.0 g/l), es ligeramente mayor comparada con los datos reportados (ver tabla 4). Esto es un factor importante porque, para que podamos obtener y/o alcanzar las concentraciones deseadas de ácido acético, se debería tener una concentración de azúcares en el medio entre 90 y 100 g/l. Esto representa una necesidad de enriquecer el agua de coco con un porcentaje adicional de azúcares (60.0 g/l), para obtener las concentraciones adecuadas de ácido acético. Sin embargo, resultará atractivo, ya que no habrá que adicionar nutrientes o fuentes de nitrógeno, fósforo, etc., necesarios para el metabolismo celular de algunos microorganismos, porque son proporcionados en forma natural por el mismo sustrato.

### 2. ESTANDARIZACION DEL INOCULO EN AGUA DE COCO PARA Saccharomyces cerevisiae.

Con el propósito de conocer la fase de crecimiento así como la viabilidad, que refleja el estado fisiológico de la levadura, se optó por realizar la estandarización de estos parámetros para conocer el tiempo en que la célula está en las mejores condiciones metabólicas. El mejor resultado presentó un tiempo óptimo de crecimiento de 10 horas con una viabilidad del 100% y con una población de  $192.5 \times 10^6$  celi/ml.

Puede notarse que se obtuvo un buen nivel de crecimiento celular y alta viabilidad de la levadura en medio líquido enriquecido con la fuente de nitrógeno MFAL (+). Al observar el comportamiento de la levadura en el medio, el tiempo de inóculo recomendado de 10 a 12 horas resultó adecuado para nuestro trabajo, pudiéndose comparar con los tiempos de inóculo empleados en los procesos comerciales, que usan una edad no menor de 24 horas (6).

### 3. FERMENTACION ALCOHOLICA EN AGUA DE COCO.

En la fermentación alcohólica a nivel matraz, la levadura mostró los resultados deseados y reportados en la bibliografía, al consumirse casi la totalidad (90 %)

de azúcares reductores de 24 totales y producirse la cantidad requerida de etanol, lográndose alcanzar el objetivo en rendimiento y eficiencia de fermentación, cuyos valores respectivos fueron: 0.50 (g/g) y 98 %.

Los resultados obtenidos apoyan la posibilidad de usar agua de coco como materia prima, por su gran contenido de nutrientes y buenos rendimientos de producción.

#### **4. ESTANDARIZACION DEL INOCULO EN AGUA DE COCO Y PRODUCCION DE ACIDO ACETICO POR Acetobacter aceti.**

Con el objeto de conocer el tiempo en que la célula está en óptimas condiciones para llevar a cabo la transformación del etanol a ácido acético, se realizó la estandarización del inóculo en el medio MFAC-3 seleccionado, el cual permitió que el microorganismo alcanzara un mayor crecimiento en comparación con los otros medios. Se observó el comportamiento de la cepa en el medio, y el tiempo de inóculo requerido para este objetivo fue de 32 horas, pudiéndose comparar con los tiempos de inóculo empleados en procesos comerciales (utilizando otro sustrato para fermentación), que utilizan una edad de inóculo no menos de 24 horas (7). Por otro lado, se obtuvo una buena producción de ácido acético de acuerdo a la concentración de etanol obtenido del medio probado y seleccionado MFAC-2, aunque se observó poca diferencia significativa entre los tres primeros medios de prueba para la producción de ácido acético (ver tabla 5), se puede notar la importancia de los nutrientes requeridos, haciendo posible cumplir el objetivo con el medio seleccionado.

#### **5. FERMENTACION ACETICA EN AGUA DE COCO.**

Debido a que en los medios de agua de coco, no se logró alcanzar concentraciones mayores de azúcares de 40.0 g/l, fue necesario llevar a cabo el enriquecimiento del medio seleccionado con glucosa. La concentración de azúcares de 100.0 g/l se seleccionó a partir de los datos de producción de alcohol de la levadura utilizada por otros trabajos (20), lo cual permitiría obtener concentraciones de alcohol hasta de 45.0 g/l.

A este respecto, en el medio de agua de coco enriquecido se alcanzó un concentración poco menor a 40.0 g/l de alcohol. Posteriormente, la conversión de alcohol a ácido acético permitió alcanzar una concentración de 40.0 g/l de ácido acético. Esta concentración puede ser considerada adecuada ya que el vinagre comercial llega a tener una concentración de 40.0 a 50.0 g/l de ácido acético.

Desde luego, el producto con agua de coco representaría una ventaja adicional ya que no requeriría una purificación adicional, para su comercialización y consumo, puesto que tiene una apariencia comercial deseable.



## VIII. CONCLUSIONES.

1. Actualmente existe poca investigación relacionada con la utilización del agua de coco, que se desperdicia en grandes cantidades en las costas de Jalisco. Siendo un sustrato rico en azúcares puede ofrecer grandes alternativas para la producción de vinagre, muy utilizado para la elaboración de conservas y salsas. A fin de minimizar la contaminación, principalmente de los suelos, y dado que este representa un costo negativo para las industrias que lo desperdician, en este trabajo se observó que su aprovechamiento resultaría económicamente atractivo, ya que permitiría obtener un producto de valor comercial competitivo que justificara su recuperación.

2. Se observó una edad del inóculo de 10 horas, para Saccharomyces cerevisiae, la cual es mejor que otras usadas en la industria alcoholera.

3.- Se determinó que el medio mínimo para la producción de ácido acético por Acetobacter aceti, en agua de coco solamente contenía como nutriente  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ .

4. Se logró obtener una concentración de ácido acético de 40.0 g/l, la cual puede ser comparada con la cantidad contenida normalmente en los vinagres comerciales (40.0 a 50.0 g/l). Esto se logró, sin embargo, enriqueciendo el medio con glucosa .

IX. TABLAS.

TABLA 1. SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIALIZACION DEL  
COCO DE  
AGUA DEL ESTADO DE JALISCO

COMPONENTES	PRODUCCION ANUAL ( ton )		APROVECHAMIENTO (%)	DESECHO (%)
	COSTA	CIHUATLAN		
COCO DE AGUA	28 000	2 000	70	30
ESTOPA	9 800	700	70	30
HUESO	3 300	240	30	70
AGUA	7 000	500	40	60

**TABLA 2. COMPOSICION TIPICA DEL AGUA DE COCO  
MADURO ( 2 ).**

<b>COMPONENTES</b>	<b>CANTIDAD</b>	<b>UNIDAD</b>
Sólidos totales	8.9	% volúmen (p/v)
Azúcares reductores ( Invertidos )	3.34	% volúmen (p/v)
Azúcares reductores ( después de inversión )	3.15	% volúmen (p/v)
Cenizas	0.50	% volúmen (p/v)
Grasas	1.0	% volúmen (p/v)
Proteínas	1.0	% volúmen (p/v)
Ca	68.8	mg/l
K	37.5	mg/l
Mg	30.0	mg/l
P	202.0	mg/l
Na	105.0	mg/l
Zn	6.1	mg/l

**TABLA 3. COMPARACION DE LA COMPOSICION DEL AGUA DE COCO**

COMPONENTES	ANALISIS DE LABORATORIO CIATEJ	DATOS BIBLIOGRAFICOS ( 2 )	UNIDAD
Sólidos totales	9.98	8.96	% Volúmen
Grasas	0.01	1.0	% Volúmen
Cenizas	0.53	0.50	% Volúmen
ART	3.84	3.35	% Volúmen
( Invertidos )			
ARD	3.50	3.15	% Volúmen
Ca	71.5	68.8	mg/l
Mg	46.7	30.0	mg/l
K	36.8	37.5	mg/l
Zn	5.8	6.1	mg/l
P	197.6	202.0	mg/l

TABLA 4. MEDIOS EMPLEADOS EN LA DETERMINACION DE UN MEDIO MINIMO DE PRODUCCION Y CRECIMIENTO PARA Acetobacter acetl.

MEDIOS DE FERMENTACION ( F )		AGUA DE COCO FERMENTADA	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ( g/l )	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ( g/l )	JUGO DE TOMATE ( % )	AC. CITRICO ( g/l )	AC. LACTICO ( g/l )	GLUCOSA ( g/l )
AGUA DE COCO	MFAC-1	1L	-	-	-	-	-	-
AGUA DE COCO ( F ) + ( NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MFAC-2	1L	0.28	-	-	-	-	-
AGUA DE COCO ( F ) + ( NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	MFAC-3	1L	0.28	0.25	-	-	-	-
AGUA DE COCO ( F ) + TODO	MFAC-4	1L	0.28	0.25	25	0.12	1.0	-
MFAC - 3 + JUGO DE TOMATE	MFAC-5	1L	0.28	0.25	25	-	-	-
MFAC - 3 + AC. CITRICO + AC. LACTICO.	MFAC-6	1L	0.28	0.25	-	0.12	1.0	-
MFAC - 2 + GLUCOSA	MFAC-2*	1L	0.28	-	-	-	-	60

**TABLA 5. PRODUCCION Y RENDIMIENTO DE ACIDO ACETICO EN LOS SEIS DIFERENTES MEDIOS.**

MEDIOS	PRODUCCION AC. ACETICO (g/l)	Y p/s
M FAC - 1	12.96	0.75
M FAC - 2	16.25	1.18
M FAC - 3	13.01	0.78
M FAC - 4	2.05	0.40
M FAC - 5	6.67	0.48
M FAC - 6	2.05	0.14

CONDICIONES : 30°C, 300 rpm por 32 horas.

Y p / s : Rendimiento de ácido acético.

**TABLA 6. RENDIMIENTOS DE LA FERMENTACION ACETICA**

<b>MEDIOS</b>	<b>RENDIMIENTOS ALCOHOL</b>	<b>RENDIMIENTOS ACIDEZ</b>	<b>CONCENTRACION MAXIMA DE AC. ACETICO. ( g/l )</b>
M FAC -2	0.49	1.14	16.30
M FAC -2*	0.49	1.10	40.16

CONDICIONES : 35°C, 300 rpm por 32 y 40 horas.

X. FIGURAS.

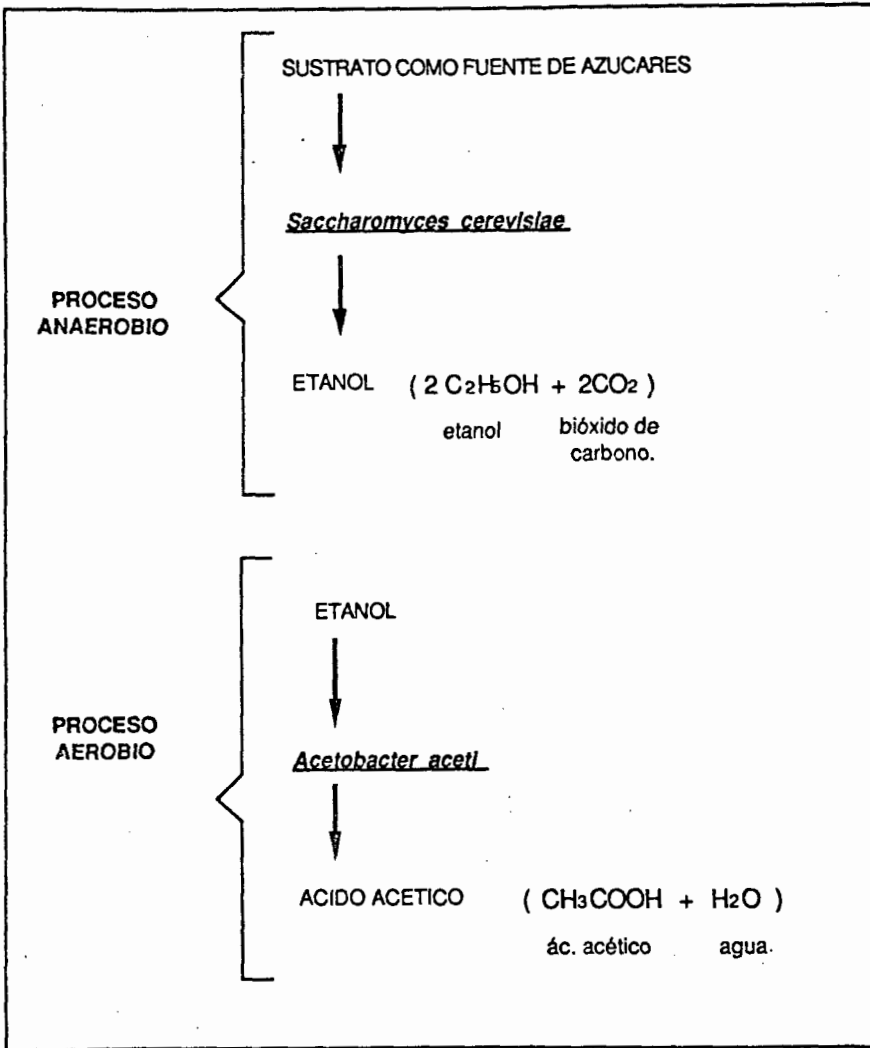


FIGURA 1 : ESQUEMA GENERAL DE PRODUCCION DE ACIDO ACETICO.



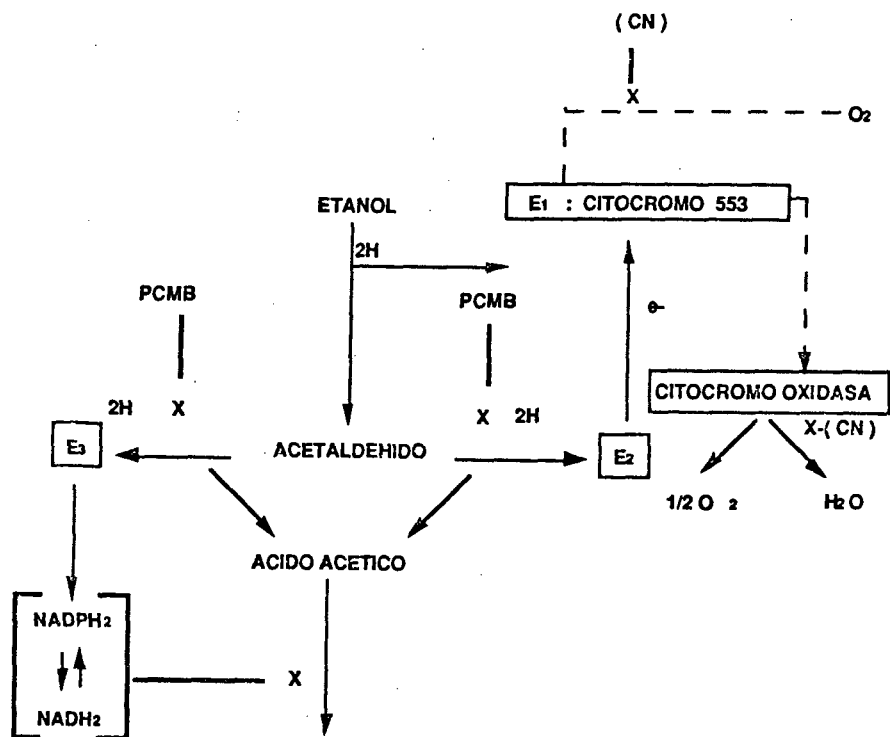


FIGURA 2. VIA METABOLICA PARA LA PRODUCCION DE ACIDO ACETICO POR *Acetobacter aceti* (6).

- E1 : Alcohol-citocromo 553 reductasa
- E2 : Aldehído deshidrogenasa.
- E3 : Aldehído deshidrogenasa dependiente de NADP.
- NADP : Nicotinamida adenindinucleótido fosfato.
- (CN) : Cianuro.
- PCMB : p-cloromercuriobenzoato.

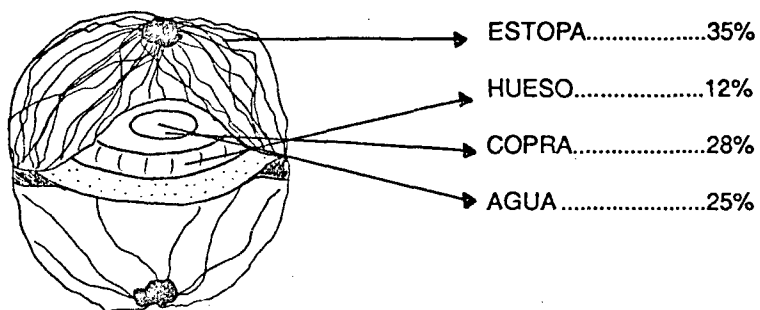


FIGURA 3. COMPOSICION PROMEDIO DEL COCO DE AGUA (2).

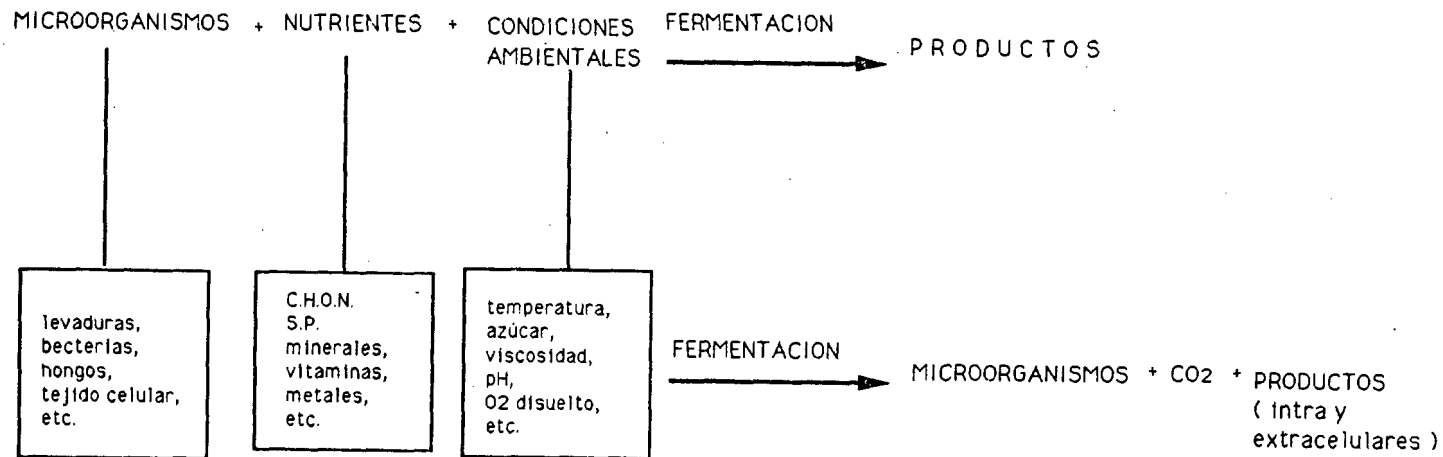
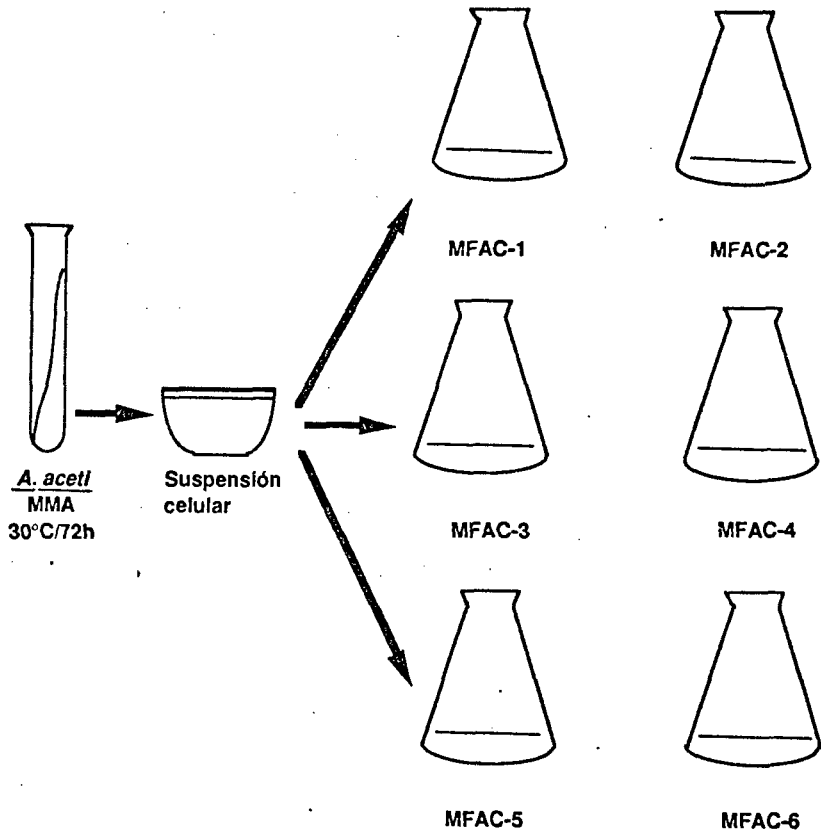


FIGURA 4. FACTORES CARACTERISTICOS NECESARIOS PARA LA REALIZACION DE UN PROCESO FERMENTATIVO ( 12 ).

## MEDIOS DECANTADOS



FERMENTACION ACETICA  
30°C a 300 rpm por 32 h.

FIGURA 5. SECUENCIA EXPERIMENTAL PARA LA REALIZACION DE LA FERMENTACION ACETICA POR *Acetobacter aceti* EN SEIS DIFERENTES MEDIOS.

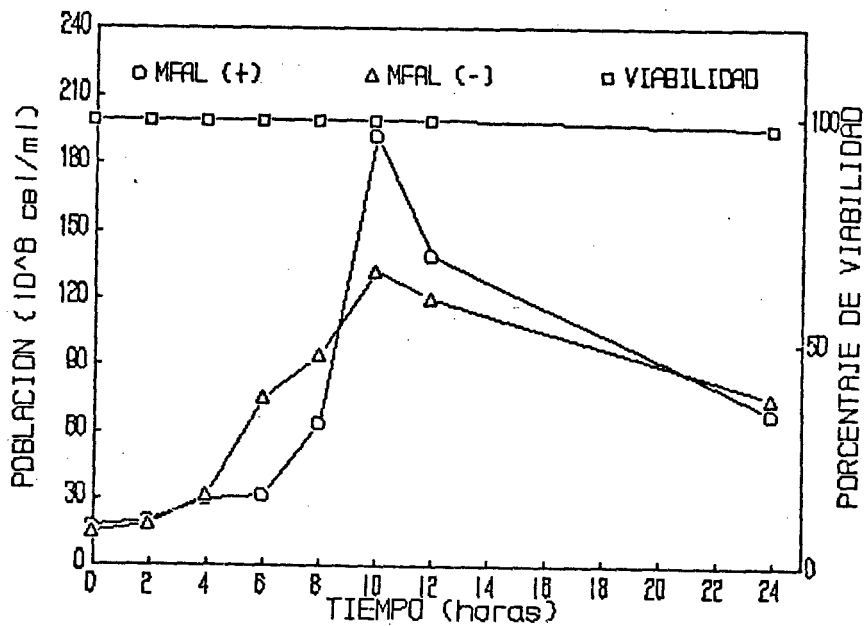


FIGURA 6 : CRECIMIENTO CELULAR Y VIABILIDAD EN EL MEDIO MFAL (+) Y MFAL (-) *Saccharomyces cerevisiae* . ( 30° C, 250 rpm, 24 h ).

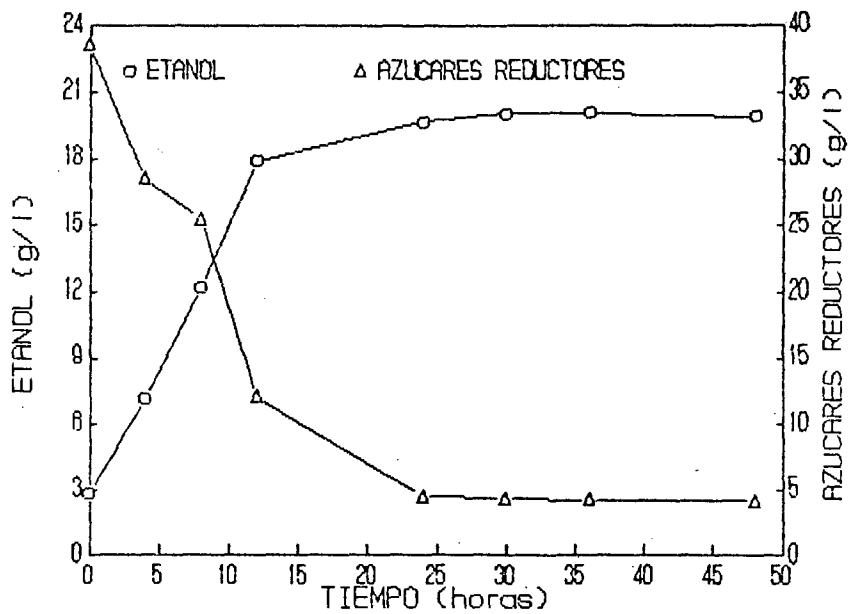


FIGURA 7 : CONSUMO DE AZUCARES Y PRODUCCION DE ALCOHOL EN EL MEDIO MFAL (+) POR *Saccharomyces cerevisiae* . ( 35° C, 250 rpm, 48 h ).

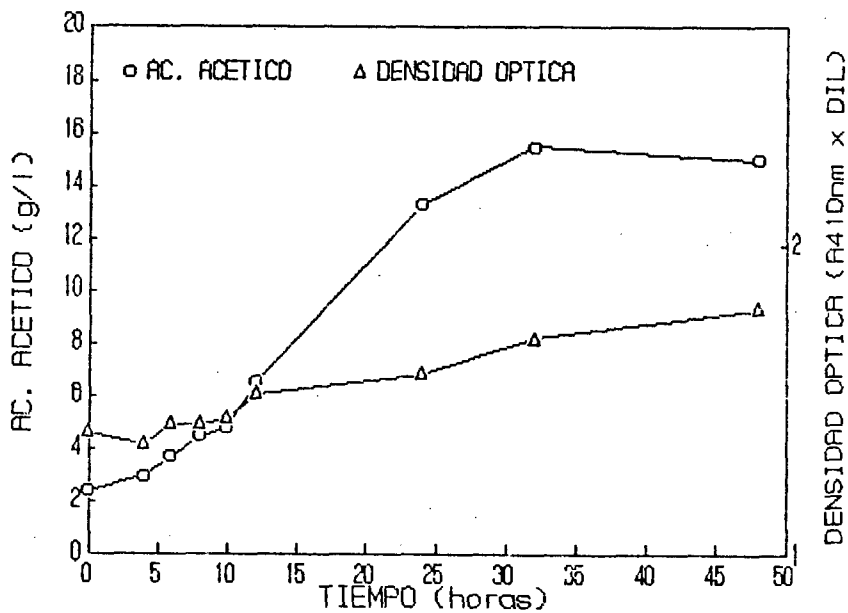


FIGURA 8 : CRECIMIENTO Y PRODUCCION POR *Acetobacter aceti* EN MFAC-1 ( 30° C, 300 rpm, 48 h ).

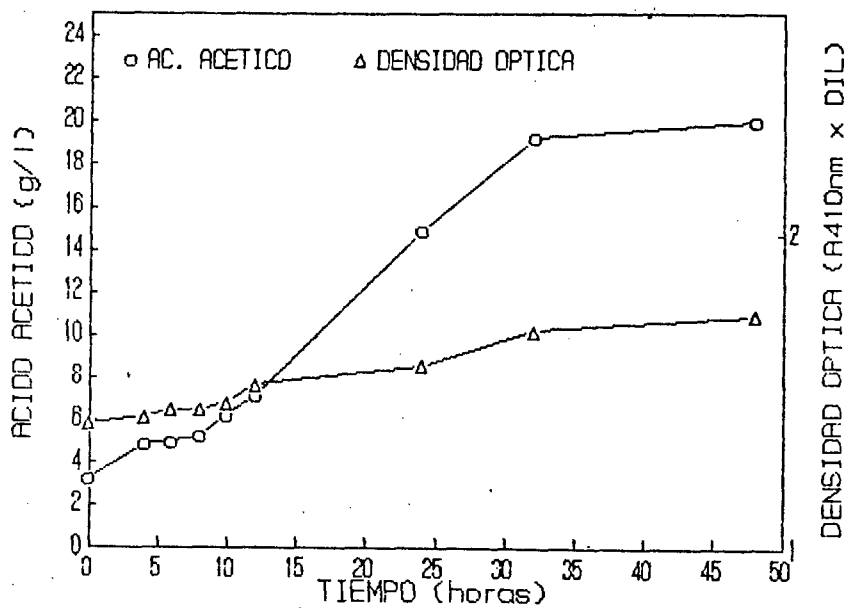


FIGURA 9 : CRECIMIENTO Y PRODUCCION POR *Acetobacter aceti* EN MFAC-2 ( 30° C, 300 rpm, 48 h ).



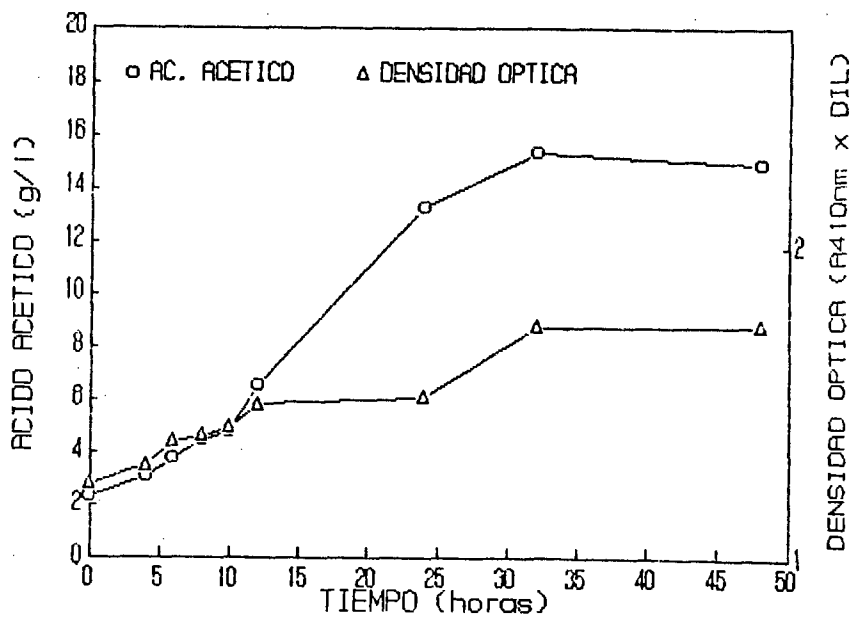


FIGURA 10 : CRECIMIENTO Y PRODUCCION POR *Acetobacter aceti* EN MFAC-3 ( 30° C, 300 rpm, 48 h ).

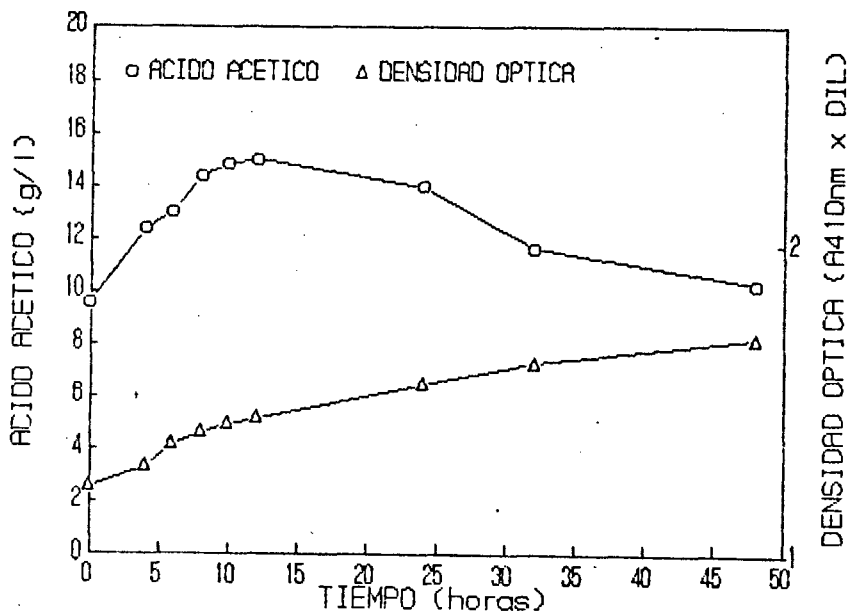


FIGURA 11 : CRECIMIENTO Y PRODUCCION POR *Acetobacter aceti* EN MFAC-4 ( 30° C, 300 rpm, 48 h ).

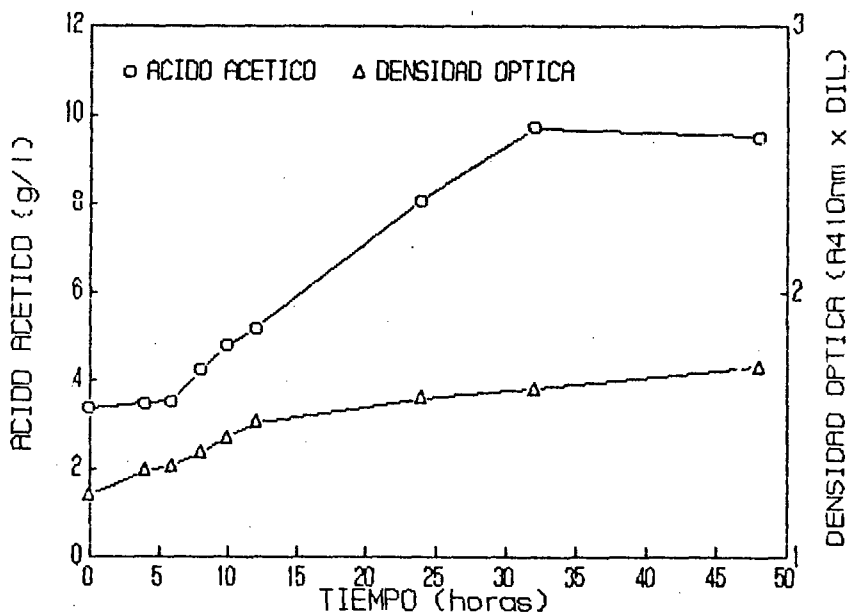


FIGURA 12 : CRECIMIENTO Y PRODUCCION POR *Acetobacter aceti* EN MFAC-5 ( 30° C, 300 rpm, 48 h ).

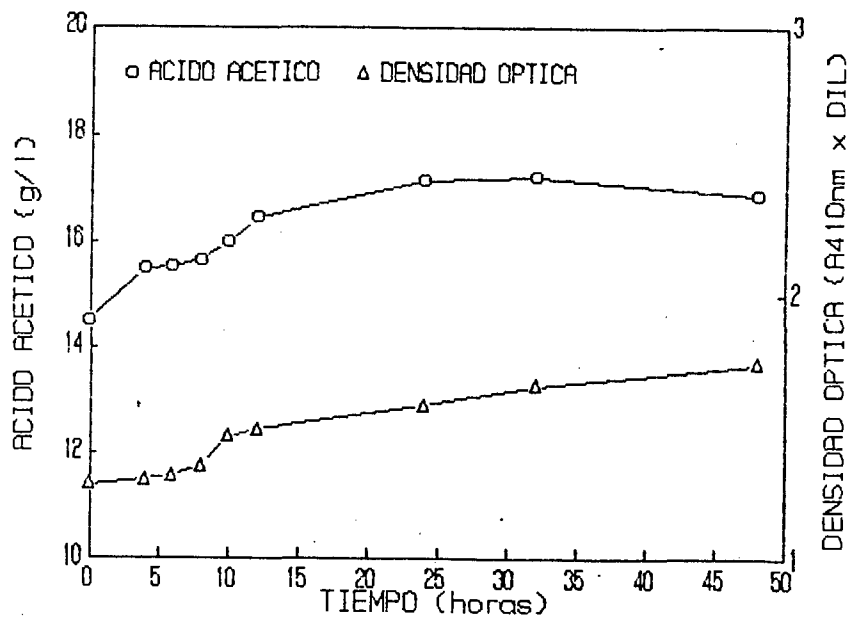


FIGURA 13 : CRECIMIENTO Y PRODUCCION POR *Acetobacter aceti* EN MFAC-6 ( 30° C, 300 rpm, 48 h ).

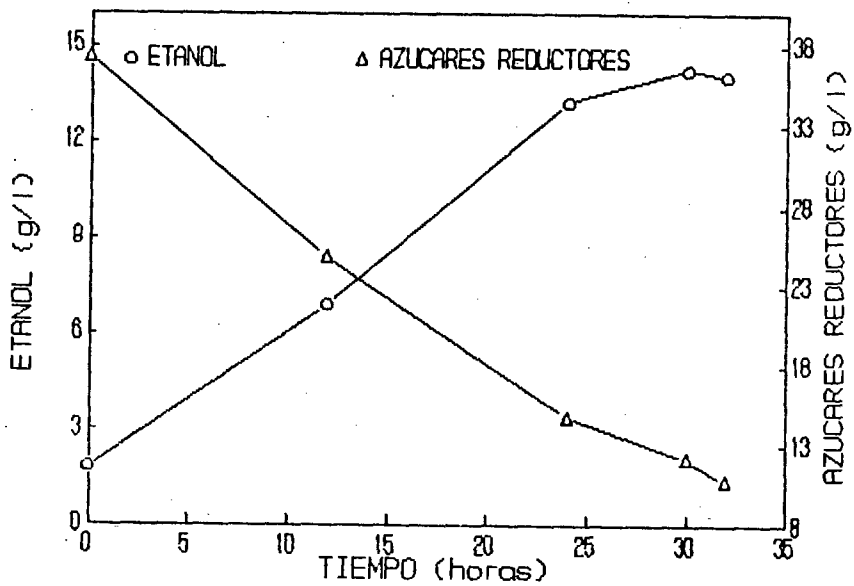
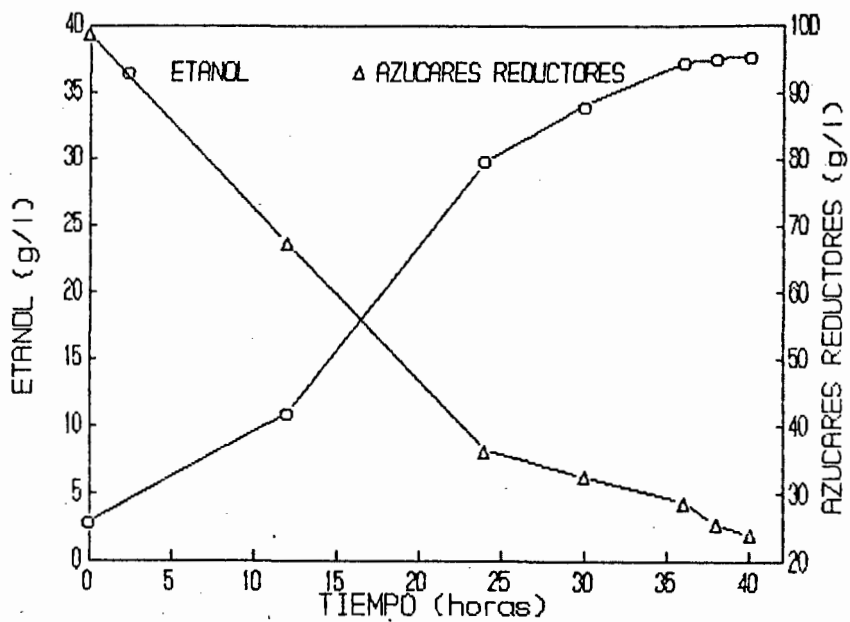


FIGURA 14 : PRODUCCION DE ALCOHOL EN MFAL (+) (40 g azúcares / l ) ( 35°C, 32 h ).



**FIGURA 15 : PRODUCCION DE ALCOHOL EN MFAL (+) ENRIQUECIDO CON GLUCOSA (100 g azúcares/l) ( 35°C, 40 h ).**

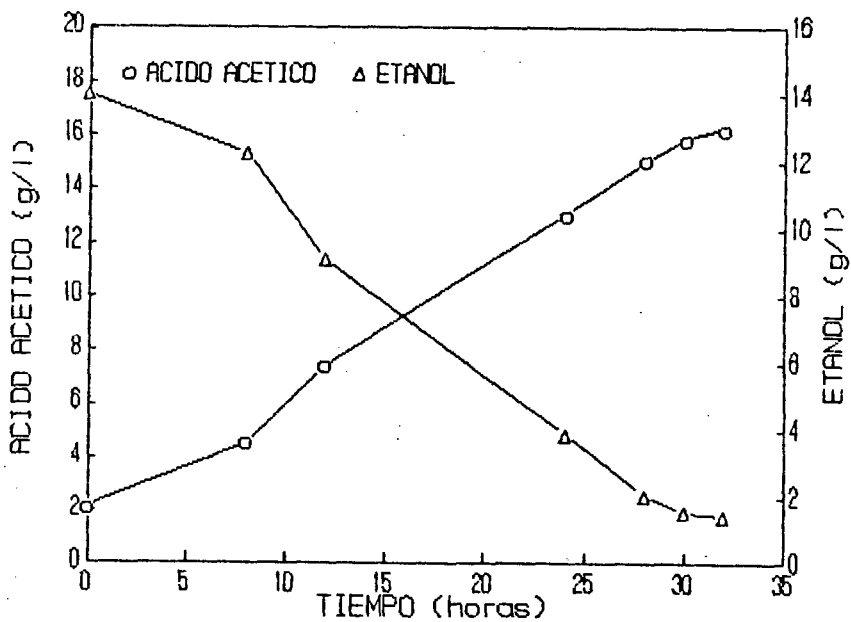


FIGURA 16 : PRODUCCION DE ACIDO ACETICO EN MFAC-2.  
( 30°C, 300 rpm, 32 h ).

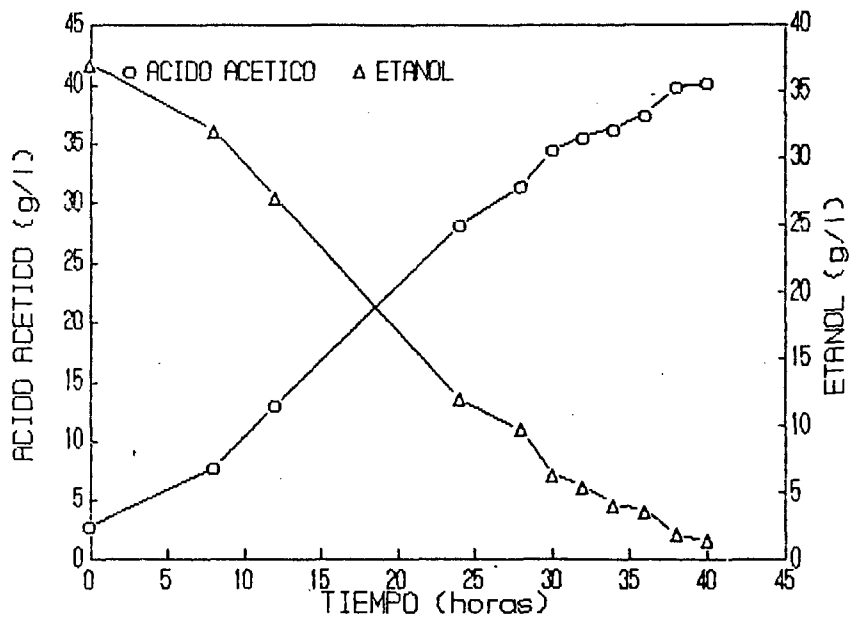


FIGURA 17 : PRODUCCION DE ACIDO ACETICO EN MFAC-2\*.  
( 30°C, 300 rpm, 40 h ).



## XI. ANEXO .

### CALCULO DE PARAMETROS CINETICOS.

#### 1. Rendimiento

El rendimiento (Y p/s) son los gramos del metabolito en cuestión entre los gramos de sustrato consumido.

$$Y(p/s) = \frac{\text{g de etanol (final)} - \text{g de etanol (inicial)}}{\text{g ART (final)} - \text{g ART (inicial)}}$$

$$Y(p/s) = \frac{\text{g de ác. acético (final)} - \text{g de ác. acético(inicial)}}{\text{g de etanol (inicial)} - \text{g de etanol (final)}}$$

#### 2. Eficiencia de fermentación.

La eficiencia es la relación entre el rendimiento del metabolito obtenido y el rendimiento teórico reportado por el metabolito deseado.

$$E, \% = \frac{Yp/s \text{ (experimental)}}{Yp/s \text{ (teórico)}}$$

$$E, \text{ alcohol} = \frac{Yp/s}{0.51}$$

$$E, \text{ ác. acético} = \frac{Yp/s}{1.3}$$

## XII. BIBLIOGRAFIA.

1. Desrosier, N. W. 1989. **"Elementos de Tecnología de Alimentos"**. Ed. CECSA. México. p. 686-689.
2. Grimwood, B. E. 1977. **"Los Productos del Cocotero"**. ONU, para la Agricultura y la Alimentación. Ed. Roma. México. p. 20-27, 169-175
3. Conner, H. A., R. J. Allceier. 1976. **Vinegar: Its Historia and Development**. *Advances in Applied Microbiology*. vol. 20 p. 82-121
4. Frazier, W. C. 1981. **"Microbiología de los Alimentos"**. Ed. Acribia. España. p. 389-390.
5. Donald, L. W. 1983. **Organic Chemicals form Biomass**. Ed. Board. E.U.A p. 22-25.
6. Moo-Young. 1985 **"Comprehensive Blotechnology"**. Ed. Pergamon Press. Great Britain. p. 701-727.
7. Mehaia M. A., M. Cheryan. 1991. **Fermentation of date extracts to ethanol and vinegar in batch and continuous membrane reactors**. *Enzyme Microbiology Technology*. vol. 13 p. 257-261.
8. Norman, W. D. 1982. **"Conservación de Alimentos"**. Ed. Continental. México. p. 302-306.
9. Joyeux, A., L. Lafourcade y P. Riberean. 1984. **Evolution of acetic acid bacterial during fermentation and storage of wine**. *Applied and Environmental Microbiology*. vol. 48 p. 153-156.
10. Stewart, G. G. y I. Rusell. 1971. The Biology of Saccharomyces. In: **"Biology of Industria Microorganisms"**. Demian A. L. & N. A. Salomon (comp) *Biotechnology series*. p. 515-536.
11. Buchanan, R. E., y N. E. Gibbson, 1984. **"Bergey's Manual of Determinative Bacteriolog"**. Ed. N oe R. K. p. 576-580.
12. Presscot, K., y S. C. Gordon. 1962. **"Microbiología Industrial"** Ed. Aguilera. España. p. 15-21, 121.

13. Jones, R. P., N. Pamment., y P. F. Greenfield. 1981. **Alcohol Fermentation by Yeast**. The Effect of Enviromental and Other Variables. Process Biochemestry. vol. 16 (13) p. 42.
14. Jasper, G. W. 1979. **"Coconuts: Production, Processing, Products"**. The Avi Publishing Company, Inc. Westport. p. 200-235.
15. Atlas, R. M. 1984. **"Microbiology Fundamentals and Applications"**. Ed. Macmillar Publishing Company. New York. p. 694-696.
16. Bradsahw, J. 1985. **"Microbiología de Laboratorio"**. Ed. Manual Moderno. México. p. 24-61.
17. Duobois, M., K. A. Gilles., J. K. Hamilton., P. A. Robers y F. smith. 1959. **Colorimetric Method for Determination of sugar and Related Substances**. Analytical Chemistry. vol. 28 (3) p. 350-356
18. Amarine, M. A., y C. S. Ough. 1976. Determinación de Etanol en el Destilado. In: **"Análisis de Vinos y Mostos"**. Ed. Acribia. España. p. 54-59.
19. Fernando, O. D. 1981. **"Análisis Químico Cuantitativo"**. Ed. Roma. México. p. 210, 234-235.
20. Pinal, Z. L. 1990. **"Comparación de la producción de alcohol de cuatro cepas de Saccharomyces cerevisiae"**. Tesis profesional, Lic. en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas. U de G. México.
21. Flores, M. N. 1991. **"Estudio comparativo del rendimiento de producción de alcohol de Zymomonas mobilis y Saccharomyces cerevisiae a partir de meladura"**. Tesis profesional, Lic. en Biología. Facultad de Ciencias Biológicas. U de G. México.
22. Salvador, B. D. 1981. **"Química de los Alimentos"**. Ed. Alhambra Mexicana. México. p. 322.
23. Pelczar, M. J., y R. D. Redi. 1972. **"Microbiology"**. Ed. Thrid. New York. p. 812-814, 823.
24. Vera, S. F. 1973. **"Incremento de la Productividad por Fermentación de Acido Acético"**. Tesis profesional, Lic. en Ingeniería Química. I.P.N. México.

25. Yong, S. P., O. Hisao., y T. Kiyoshi. 1988. **Acetic Acid Production using a Fermentor Equipped with a Hollow Fiber Filter module**. *Biotechnology and Bioengineering*. vol. 33 p. 918-923.
26. Arnold, L. D., y A. S. Madine. 1986. **"Biology of Industrial Microorganisms"**. Ed. *Biotechnology series*. Washington. p. 146, 160, 166-170.
27. Harrigan, W. F., y E. Margaret. 1972. **Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology**. p. 256-257.
28. Presscot y Dunn. 1976. Producción de Alcohol po Fermentación. In: **"Microbiología Industrial"**. Ed. Agulera. España. p. 110-133.
29. Sturion, C. A. 1988. **"Tecnología de la Producción de Alcohol por Fermentación"**. Ed. GEPLACEA. México. p. 25-38.
30. Coccheiro, A. A. 1985. Biotecnología y Energía. In: **"Prospectivas de la Biotecnología en México"**. Ed. Quintero-Ramírez R. CONACYT. p. 445-461.
31. Ramírez, Q. R. 1985. **"Prospectivas de la Biotecnología en México"**. In: *Prospectivas de la Biotecnología en México*. CONACYT. p. 460-478.
32. Ramírez, Q. R. 1987. **"Ingeniería Bioquímica"**. Ed. Alhambra Mexicana. México. p. 15-38.
33. Smith, M. E., y A. T. Bull. 1976. Studies of the Utilization of Coconus Water Waste for the Production of the Food Years *Saccharomyces fragilis*. *Journal of Applied Bacteriology*. vol. 41 p. 81-95.
34. Banwarts, G. J. 1979. **"Microbiología Básica de los Alimentos"**. Ed. Bellaterra. Barcelona. p. 34-40.
35. Kenneth, H. 1990. **"Association of Official Analytical Chemists"**. *Official Methods of Analysis*. U.S.A.