

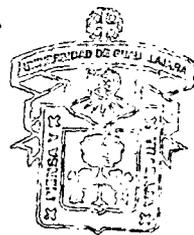
# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS  
BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS  
DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y AMBIENTALES



CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

"OPTIMIZACION DE PH Y AGITACION PARA EL CRECIMIENTO  
DE *Acetobacter aceti* EMPLEANDO LA METODOLOGIA  
DE SUPERFICIE DE RESPUESTA"

---

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :  
LICENCIADO EN BIOLOGIA  
P R E S E N T A N :  
ROSA MARIA NUÑO PIMIENTA  
GUADALAJARA, JAL. MARZO DE 1996

---



*Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias*  
*División de Ciencias Biológicas y Ambientales*  
*Biología*

717/95

C. ROSA MA. NUÑO PIMIENTA  
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis "OPTIMIZACION DE PH Y AGITACION PARA EL CRECIMIENTO DE Acetobacter acéti EMPLEANDO LA METODOLOGIA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Directora de dicha tesis la M.en C. Ingrid M. Rodríguez Buenfil.

C.U.C.B.A.



A T E N T A M E N T E  
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas Zapopan, Jal. 29 de Mayo de 1995

EL DIRECTOR

M.C. ALFONSO ENRIQUE ISLAS RODRIGUEZ

EL SECRETARIO

OCEAN. SALVADOR VELAZQUEZ MAGAÑA

c.c.p.- M.en C. Ingrid M. Rodríguez Buenfil, Directora de Tesis.-pte.

c.c.p.- El expediente del alumno

AEIR/SVM/cglr.

**Dr. Alfonso E. Islas Rodríguez.  
Director de la División de Ciencias  
Biológicas y Ambientales.**

**P R E S E N T E.**

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó la Pasante Rosa Ma. Nuño Pimienta código numero 88490577 con el título "OPTIMIZACION DEL pH Y AGITACION PARA EL CRECIMIENTO DE Acetobacter aceti EMPLEANDO LA METODOLOGIA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA" consideramos que reúne los méritos necesarios para la impresión de la misma y la realización de los exámenes profesionales respectivos.

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

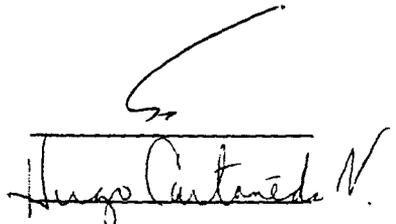
**ATENTAMENTE**  
Guadalajara, Jal. 28 de febrero de 1996.

**EL DIRECTOR DE TESIS**

  
\_\_\_\_\_  
M. en/C. Ingrid M. Rodríguez Buenfil.

**SINODALES**

1. Dr. Sergio Aguilar Benavides .
2. Dr. Hugo Castañeda Uázquez.
3. Biol. Conrado Soto Velasco.

  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  


**GRACIAS..**

**A MIS QUERIDOS HIJOS:**

Por todo el amor y comprensión que ma han brindado  
a lo largo de su pequeña existencia.

**A MIS PADRES  
Y HERMANAS Ma. DE JESUS Y OLIVIA:**

Por todo su apoyo durante  
la realización de este trabajo.

## **MI MAS SINCERO AGRADECIMIENTO:**

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), A.C.

Por permitirme realizar mi trabajo de tesis profesional brindandome todas las facilidades dentro de sus instalaciones.

A mi directora de tesis M. en C. Ingrid Mayanin Rodríguez Buenfil:  
Por compartir su tiempo y por su invaluable apoyo durante la realización de este trabajo, sinceramente muchas gracias.

Al Dr. Jaime Alvarez de la Cuadra:  
Por haberme brindado la oportunidad de realizar mi tesis.

A todos mis compañeros y amigos que laboran en el departamento de Microbiología y Fermentaciones:  
Por todo su apoyo muchas gracias.

Al Dr. Eulogio Pimienta Barrios:  
Por sus consejos y su valiosa ayuda.

A mis sinodales:  
Dr. Sergio Aguilar, Dr. Hugo Castañeda y al Biol. Conrado Soto.  
Por sus valiosos consejos.

## **DEDICATORIA.**

**A mis hijos...**

**Porque son la fuerza que me impulsa a seguir adelante, por todas las tristeza y alegrías que compartimos, por el amor incondicional que me demuestran día a día, por ser el único motivo de mi existencia y por todo el amor que les tengo.**

**OPTIMIZACION DEL pH Y AGITACION PARA EL CRECIMIENTO DE  
*Acetobacter aceti* EMPLEANDO LA METODOLOGIA DE  
SUPERFICIE DE RESPUESTA.**

**Pasante de Biología: Rosa Ma. Nuño Pimienta.**

**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,  
BAJO LA DIRECCION DE LA M. EN C.  
INGRID MAYANIN RODRIGUEZ BUENFIL.**

## ÍNDICE

	Página
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>I.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II.- ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
2.1 Historia y desarrollo del vinagre.	3
2.2 Avances en la fabricación del vinagre.	4
2.3 Mecanismos de la fermentación ácido acético.	4
2.4 Organismos ácido acéticos.	5
2.5 Producción comercial de vinagre.	7
2.5.1 Generador de Frings.	9
2.5.2 Cultivo sumergido	11
2.5.2.1 Acetador de Frings.	12
2.5.3 Procesamiento del vinagre.	13
2.6 Investigaciones realizadas para mejorar la productividad del proceso.	14
2.6.1 Variables que intervienen en el crecimiento de microorganismos.	16
2.6.2 Efecto del pH sobre las bacterias ácido acéticas.	17
2.6.3 Efecto del oxígeno sobre las bacterias ácido acéticas.	18
2.7 Metodología de superficie de respuesta (RSM).	19
<b>III.- HIPÓTESIS</b>	<b>21</b>
<b>IV.- OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>V.- MATERIALES Y DETERMINACIONES ANALÍTICAS</b>	<b>23</b>
<b>VI.- METODOLOGÍA</b>	<b>29</b>
<b>VII.- RESULTADOS</b>	<b>33</b>
<b>VIII.- DISCUSIÓN</b>	<b>41</b>
<b>IX.- CONCLUSIONES</b>	<b>47</b>
<b>X.- FIGURAS</b>	<b>48</b>
<b>XI.- CUADROS</b>	<b>83</b>
<b>XII.- ANEXOS</b>	<b>96</b>
<b>XIII.- BILIOGRAFÍA</b>	<b>104</b>

## RESUMEN

Se optimizaron las variables de pH y agitación (rpm) por medio de la metodología de superficie de respuesta (RSM) con el fin de obtener altos rendimientos de biomasa y altas velocidades de crecimiento utilizándose la cepa *Acetobacter aceti* ssp. *Licuefacians* proporcionada por el Banco de Cepas y Genes del CIATEJ (BCGC B-051).

La superficie de respuesta encontrada para el incremento de biomasa correspondió a una meseta de mínimos para la zona de 4.5 - 6.5 de pH inicial y de 100 - 300 (rpm); obteniendo los mayores incrementos de biomasa a un rango de pH inicial de 4.5 - 5.5 y a una agitación de 400 - 700 (rpm), ejerciendo en esta zona, la variable de agitación, la mayor influencia.

La superficie de respuesta encontrada para la velocidad de crecimiento correspondió a una meseta de mínimos para la zona de 4.0 - 6.5 de pH inicial y de 60 - 300 (rpm); obteniendo la mas alta velocidad de crecimiento a un pH inicial de 4.0 - 4.5 y a una agitación de 400 (rpm), ejerciendo nuevamente la variable de agitación la mayor influencia en la respuesta.

La superficie de respuesta encontrada para el rendimiento correspondió a una silla de montar con respuestas mínimas para la zona de 4.5 - 6.0 de pH inicial y de 100 - 500 (rpm) y de 6.5 - 8.0 pH inicial con 400 - 800 (rpm) obteniendo el mayor rendimiento a un pH inicial de 4.5 - 5.0 y a una agitación de 700 - 800 (rpm) o con un pH inicial de 7.0 - 8.5 y una agitación de 100 - 250 (rpm) y en donde ambas variables ejercen igual influencia.

La superficie de respuesta encontrada para el tiempo de duplicación correspondió a una silla de montar con tiempos altos para la zona de 4.5 - 6.5 pH inicial y de 50 - 350 (rpm) y de 7.0 - 8.0 de pH inicial con 150 - 400 (rpm); obteniendo el menor tiempo de duplicación a un pH inicial de 4.5 y una agitación de 380 (rpm) y pH inicial de 7.5 y una agitación de 80 (rpm).

Concluyéndose que la variable que ejerce mayor influencia sobre las respuestas analizadas es la agitación, aunque ambas variables son de gran importancia para obtener óptimos valores en las respuestas analizadas.

# **INTRODUCCIÓN**

## I.- INTRODUCCIÓN

El vinagre se define como el líquido obtenido de la fermentación acética del vino natural y de sus subproductos, es uno de los condimentos más antiguos y ha sido utilizado alrededor del mundo por muchos siglos. La producción de ácido acético a partir de alcohol es conocida desde que se empezó a elaborar el vino, los Romanos y Griegos que utilizaban vinagre diluído como bebida refrescante, producían vinagre dejando vasijas abiertas al aire, sin embargo, el vinagre se produjo sólo para consumo local hasta la Edad Media.

Los primeros vinagres producidos industrialmente se elaboraban por medio de procesos lentos y fue en el siglo IX cuando se modificaron estos, hacia procesos más rápidos. Los procesos rápidos para la producción de vinagre que se utilizan actualmente, son el generador de goteo y el fermentador sumergido, aunque también son ampliamente utilizados los métodos de proceso lento especialmente para la fabricación de vinagre casero. El cultivo sumergido es actualmente el más empleado ya que la velocidad de producción que ofrece es 10 % más alta que la fermentación en superficie y 5% más alta que el generador de goteo, además de ofrecer altos rendimientos y bajo costo de operación. Aproximadamente el 68% del todo el vinagre producido es utilizado en los productos preparados comercialmente.

La producción de vinagre esta basada en la fermentación ácido acética por una bacteria Gram-negativa clasificada como *Acetobacter*, en la cual el etanol es oxidado a ácido acético vía acetaldehído casi estequiométricamente, ya que actualmente las cepas de alto rendimiento pertenecientes a este grupo producen de 13-14 % de ácido acético.

Por otra parte, muchos esfuerzos han sido realizados para mejorar la velocidad de la fermentación ácido acética ya sea, por adaptación de la bacteria o por selección y todo ello encaminado al desarrollo de procesos más eficientes. ( Fukaya y col. 1992).

Una de las características primordiales de esta fermentación es que el oxígeno es necesario para llevar a cabo la oxidación de etanol y acetaldehído. Además de que se realiza a muy bajo pH en presencia de una concentración relativamente alta de ácido acético, condiciones bajo las cuales otros microorganismos no podrían crecer.

Tales condiciones influyen de manera estricta en un bajo incremento de biomasa durante la producción de ácido acético, lo cual repercute en la productividad del proceso. Debido a esto actualmente se realizan cultivos con una alta densidad celular, como la inmovilización y recirculación de células, con el fin de obtener una mayor productividad y eficiencia de la fermentación. (Fukaya y col. 1992).

Hoy en día la producción de vinagre a nivel mundial, esta tomando una mayor importancia en la industria alimenticia, ya que el ácido acético es empleado como aditivo alimenticio principalmente en la industria de encurtidos, por lo que su demanda es de especial interés, aunado a las presentes tendencias hacia los productos naturales en lugar de los sintetizados químicamente. Queda de manifiesto que en las fermentaciones acéticas de cultivo sumergido el tipo y concentración de nutrientes así como las condiciones fisicoquímicas del cultivo juegan un papel importante para obtener un incremento de biomasa y una mayor producción. De ahí el interés para la optimización de condiciones que cubran las necesidades de oxígeno y pH para el incremento de biomasa, que den la pauta para realizar cultivos de producción con una alta densidad celular y así obtener una mejor productividad en el proceso.

# **ANTECEDENTES**

## II.- ANTECEDENTES

### 2.1 Historia y desarrollo del Vinagre.

Es muy probable que el primer vinagre utilizado por los antiguos pobladores fue simplemente vino fermentado. La palabra vinagre se deriva del francés vin (que significa vino) y aigre (que significa agrio). El vino se empezó a elaborar por lo menos hace 10,000 años, y se puede asumir que el vinagre se elabora como entonces. Hay evidencias que indican que las antiguas culturas lo elaboraban a partir de numerosos materiales fermentables existentes en las áreas donde vivían. Informes recientes indican que el vinagre fue empleado como alimento o aditivo alimenticio y en medicina el vinagre se usó como antibiótico, en compresas húmedas para el tratamiento de la plaga. (Peppler y Periman, 1979).

El vinagre se ha conocido y apreciado como un aditivo importante en los alimentos (condimento y preservativo) desde que el hombre ha practicado el arte de la fermentación y elaboración de los vinos. Casi en los tiempos ancestrales se reconocía al vinagre, la sal, el ahumado y las hierbas como materiales o métodos para preservar los alimentos. El vinagre se define como un "líquido ácido formado por ácido acético diluido e impuro que se obtiene por fermentación acética de vino, sidra, cerveza, ale o productos similares". Además puede definirse como el producto que se obtiene de la acetificación, de las soluciones alcohólicas derivados de materiales azucarados o harinosos. Los vinagres comerciales contienen alrededor del 4% de ácido acético. Los vestigios de ésteres, de alcohol, de azúcar y de glicerina formados durante fermentaciones, son en gran parte los que le dan al producto un olor y un sabor agradables.

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 éste película "micoderma". Kurtzig, en 1836 reconoció que los responsables de la acetificación del alcohol eran organismos minúsculos del licor madre. Pasteur, en 1868 confirmó los hallazgos de Kurtzig e informó que la conversión de vino a vinagre era realizada por una especie de bacteria que nombró "*Micoderma aceti*". (Citados por Moon-Young 1985).

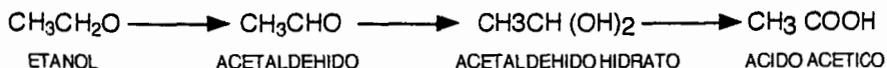
## 2.2 AVANCES EN LA FABRICACION DEL VINAGRE.

Inicialmente el vinagre fue producido comercialmente por método lento el cual consistía simplemente en guardar en vasijas llenas parcialmente el vino. El primer avance en el proceso fue hecho cuando se descubrió que agregando vinagre en barriles parcialmente llenos de vino se aceleraba la transformación del vino en vinagre. Este procedimiento fue conocido como **proceso de campo** desde entonces los barriles se exponían al aire libre. El **proceso de Orleans** se desarrolló en 1670, y fue una adaptación del mecanismo del proceso de campo fue el **primer proceso continuo**, donde el barril fue provisto con una espita para separar el vinagre terminado, un tubo fue insertado directamente en el fondo de la vasija permitiendo la adición del vino. Cuando el contenido de la vasija se transformaba en vinagre, solo parte de este era vaciado, dejando una parte de vinagre para luego agregar vino nuevo. Este proceso lento, como es sabido es actualmente usado en algunas partes del mundo. La idea de la fabricación del vinagre por goteo de líquido (generador de goteo) directo en el embalaje data de principios del siglo XVIII y es acreditado a H. Boerhaave y Kastner. Este proceso fue mejorado por J.S. Schützenbach en 1823 que hizo el generador de goteo. Su perfeccionamiento consistió únicamente en la provisión de un ventilador disipador de calor cerca del fondo del generador manteniendo el oxígeno requerido para las reacciones químicas que producen el vinagre. La versión del generador de goteo de Schützenbach predominó en la producción del vinagre cerca de 100 años.

El siguiente paso en el perfeccionamiento del generador de goteo fue hecho en 1929. En aquel tiempo, la fuerza de la aeración y los controles de temperatura fueron introducidos en el generador de goteo resultando hoy ampliamente usado. El más reciente proceso en ser inventado y desarrollado para uso comercial fue publicado por primera vez en 1949. Este proceso con cultivo sumergido, como es llamado, envuelve la aeración del mismo líquido, y su buen éxito depende grandemente en la eficiencia de la aeración. Ambos procesos tanto el generador de goteo como el proceso de cultivo sumergido son extensamente usados hoy. (Peppler y Perlman, 1979).

## 2.3 MECANISMOS DE LA FERMENTACION ACIDO ACETICA.

La producción de ácido acético es una **oxidación incompleta** más que una auténtica fermentación, debido a que el poder reductor que se produce se transfiere al oxígeno. La primera etapa de oxidación a partir de etanol conduce a acetaldehído mediante un alcohol deshidrogenasa específica de NAD o NADP. Existe luego una hidratación a acetaldehído hidrato y una segunda oxidación con acetaldehído deshidrogenasa a ácido acético.

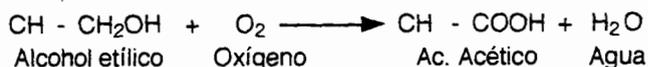


Durante la oxidación se produce 1mol de ácido acético por mol de etanol. A partir de 1 litro de alcohol del 12% (v/v) se produce 1 litro de ácido acético del 12,4 %. Fig. No. 1. Para la producción óptima se requiere suficiente oxígeno, que se reduce a través de la cadena respiratoria. Se producen 6 ATP por mol de ácido acético. Si no existe suficiente oxígeno, en presencia de altas concentraciones de ácido acético y etanol, las células mueren. A una concentración de 5% de ácido acético y etanol muere el 34% de las bacterias después de una interrupción de la aeración de 2 minutos, mientras que a una concentración del 12% de ácido acético y etanol la misma tasa de muerte se produce después de solamente 10-20 segundos. Tanto el ácido acético como el etanol deben estar presentes para el óptimo crecimiento de *Acetobacter*. El suministro de etanol es crítico y con menos del 0,2% (v/v) en solución aumenta la velocidad de muerte. Sin embargo, la concentración máxima de etanol no debe de exceder el 5% en los procesos convencionales. Actualmente las cepas de alto rendimiento producen 13-14% de ácido acético. (W. Crueger y A. Crueger, 1984).

## 2.4 ORGANISMOS ACIDO ACETICOS.

Por miles de años, la gente que produce vinagre ha utilizado los organismos acido-acéticos, aunque la naturaleza microbiana del proceso del vinagre no fue reconocida antes que F. T. Kützing teorizara en 1837 que estos microorganismos convertían el etanol a ácido acético. Su teoría fue confirmada por Pasteur en 1868 (citados por W. Crueger y A. Crueger, 1984). Aunque los organismos productores de ácido acético, o *Acetobacter*, fueron entre las primeras especies en ser estudiadas, la producción de vinagre ha sido esencialmente asociada con contaminantes oportunos. La razón de esto fue la relativa dificultad de aislar cultivos puros a partir de los procesos del vinagre. También la naturaleza de la industria ha ido para arriba muy recientemente, ha sido conducida a operar provechosamente en una manera no tecnológica. Por encima de 100 especies, subespecies, y variedades del género *Acetobacter* han sido clasificadas. Algunas de estas especies probablemente son aceptadas en un generador de vinagre con excepción de *A. xylinum*, formador de un espeso légamo y algunas especies que oxidan ácido acético a dióxido de carbono (sobreoxidantes) (Peppler y Perlman, 1979). Aunque el ácido acético es producido por muchas bacterias fermentativas, sólo miembros de un grupo especial, las bacterias del acético se utilizan en la producción comercial.

Las bacterias del ácido acético pueden ser divididas en dos géneros, *Gluconobacter* y *Acetobacter*, el primer grupo, que oxida etanol solamente a ácido acético, y el segundo grupo (las superoxidantes) capaces de oxidar el etanol primero a ácido acético y luego adicionalmente a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O. Estas bacterias, al respirar, consumen el alcohol etílico, produciendo ácido acético según las siguiente reacción:



Como se puede observar, más que un proceso fermentativo, la acetificación es un proceso respiratorio. Las bacterias que producen esta reacción al respirar son aerobias y sus temperaturas óptimas de desarrollo están comprendidas entre 25 y 35°C. En las fermentaciones acéticas, la concentración de nutrientes deben ser añadidas en forma específica para obtener un incremento en la biomasa y una mayor producción. (W. Crueger y A. Crueger, 1984).

Las cepas utilizadas comercialmente pertenecen a las especies *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianos*, o *A. peroxidans*. Los miembros del grupo *Gluconobacter* no son superoxidantes. Las especies *Gluconobacter oxydans* (previamente *Acetomonas oxydans*) y varias subespecies de esta especie, se utilizan comercialmente. Durante la producción aparecen cultivos mixtos, aunque se asume que el inóculo es puro, particularmente en los cultivos en superficie. Las cepas de producción parecen perder su carácter de alta producción si son transportadas sobre agar a una nueva localidad. Para evitar este problema, las cepas de producción se envían a las nuevas plantas de vinagre en pequeños fermentadores transportables. (W. Crueger y A. Crueger, 1984).

**Características morfológicas de *Acetobacter aceti*** : Pertenecen a la familia Pseudomonadaceae; son células en forma de bastón con terminaciones redondas; agrupamiento celular aislado o en cadenas largas, inmóviles, no esporogéneos, Gram-negativos. (Bryan y col. 1983).

**Características fisiológicas:** Temperatura óptima 30 °C; aerobio, ácido tolerantes; forma ácido de la glucosa, alcohol etílico, alcohol propílico y glicol.

**Características de cultivo:** En medios sólidos forman colonias grandes y brillantes; en medios líquidos forman una película gelatinosa. (Bryan y col. 1983).

Las bacterias del ácido acético son importantes por: a) oxidar alcohol etílico a ácido acético, lo que las hace útiles en la fabricación de vinagre y perjudiciales para las bebidas alcohólicas y b) su extraordinaria capacidad oxidativa. (Moon-Young 1985). 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. (Stewart y Rusel, 1971).

## 2.5 PRODUCCION COMERCIAL DE VINAGRE.

Los primeros vinagres fabricados industrialmente eran producidos en vasijas planas abiertas. Eran procesos lentos, en los que flotaba una película de bacterias sobre la superficie del vino. En el siglo diecinueve se modificaron los procesos en superficie hacia procesos más rápidos, uno de estos, el proceso del generador de goteo se utiliza todavía en la actualidad. Los procesos sumergidos se desarrollaron desde 1949. Ambos tipos de procesos, el generador de goteo y el fermentador sumergido se utilizan en todo el mundo, siendo todavía utilizados los métodos más antiguos debido al mejor sabor de los productos que se obtienen.

El proceso sumergido ha sido extensamente mejorado por la Compañía H. Frings en Alemania, como ejemplo de la escala del proceso, la producción de vinagre con 10% de acético en 1980 ascendió a  $365 \times 10^6$  litros en la Comunidad Económica Europea,  $469 \times 10^6$  litros en los Estados Unidos y  $1,600 \times 10^6$  litros en todo el mundo. (W. Crueger y A. Crueger, 1984).

En la elaboración de vinagres podemos distinguir dos tipos de métodos:

(1) Métodos lentos, como el procedimiento casero, y el método francés o de Orleáns.

(2) Métodos rápidos, como el de generadores y el procedimiento de nebulización.

En los métodos lentos no se mueve el líquido alcohólico durante la acetificación mientras que en los rápidos se mantiene en movimiento. En la mayor parte de los procedimientos lentos se utilizan jugos de frutas fermentados o licores malteados, mientras que en los métodos rápidos se aplican preferentemente a la producción de vinagre a partir de licores espirituosos (alcohol). Los jugos de frutas o malta contienen suficiente alimento para las bacterias del vinagre en los métodos de generador en los

que se usa el alcohol ( desnaturalizado con acetato de etilo o vinagre) hay que añadir un suplemento un "alimento del vinagre" que es una combinación de compuestos orgánicos e inorgánicos que varía con el fabricante, se han utilizado para este objetivo combinaciones de las siguientes sustancias: urea, fosfato amónico dibásico, aspargina, peptonas, autolizado de levaduras, glucosa, malta, almidón, dextrinas, sales y otras sustancias. (Frazier, 1981).

Métodos lentos: En el método casero se deja que un jugo de frutas, como el de manzanas, sufra una fermentación alcohólica espontánea, preferiblemente hasta alcanzar un 11 ó 13% de alcohol, lo que efectúan las levaduras presentes en dicho jugo. Entonces el líquido alcohólico en que se convirtió el jugo de frutas sufre una fermentación acética espontánea, llevada a cabo por las bacterias acéticas presentes, con lo que se obtiene el vinagre. En la superficie del líquido debe formarse una película constituida por las bacterias del vinagre, a la que se denomina "madre de vinagre" y que oxida el alcohol a ácido acético. Desgraciadamente, el rendimiento es pobre por las siguientes causas: una producción escasa de alcohol durante la fermentación de las levaduras; ausencia de cepas de bacterias del vinagre con buena productividad; oxidación del ácido acético a causa de un déficit de alcohol, o un crecimiento competitivo de mohos y levaduras en la superficie, lo que destruye el alcohol y los ácidos; asimismo, el crecimiento de bacterias contaminantes que producen sabores desagradables. El proceso es muy lento y con frecuencia el producto es de calidad muy pobre.

El método francés o de Orleáns, es un proceso continuo, aunque también se efectúa en cubas. Se introduce vinagre bruto procedente de una fabricación anterior hasta llenar alrededor de un cuarto de la capacidad de la cuba, lo que sirve para introducir un inóculo activo de bacterias del vinagre y para acidificar el vino añadido, la sidra o los licores malteados, de modo que inhiba así los gérmenes competitivos; se añade entonces una cantidad de líquido alcohólico suficiente para llenar la cuba hasta, aproximadamente, la mitad, dejando así en su parte superior un espacio libre que está en comunicación con el exterior por la espita y por dos orificios, efectuados uno a cada lado de la cuba, por encima del nivel alcanzado por el líquido. Las bacterias acéticas crecen en forma de película en la superficie del líquido y oxidan el alcohol, transformándolo en ácido acético durante algunas semanas o algunos meses.

El método se repite una y otra vez, de modo que se convierte en un procedimiento más o menos continuo. Mediante este procedimiento, más bien lento, puede producirse un vinagre de calidad excelente. Una de las dificultades ofrecidas por este método consiste en el hundimiento de la película gelatinosa de bacterias del vinagre, y el consiguiente retraso en la acetificación. Un excesivo desarrollo bacteriano reduce la acetificación. (Frazier, 1981).

Métodos rápidos: Como ha quedado dicho, los métodos rápidos de elaboración del vinagre exigen el movimiento del líquido durante el proceso de acetificación. Lo más frecuente es que se vierta éste sobre superficies en las que se han dejado crecer las bacterias del vinagre y a las que se proporciona una cantidad abundante de aire, el método más comúnmente usado en la actualidad es el del generador. El generador simple es un tanque cilíndrico, generalmente fabricado de madera, de tamaño variado, cuyo interior se halla dividido en tres partes: una sección superior, donde se introduce el líquido alcohólico; una zona media, que es la mayor, donde se permite al líquido precipitarse en forma de lluvia sobre virutas, zuros de maíz, corcho triturado, carbón vegetal, orujos o algún material que proporcione superficie abundante y no se apelmace formando una masa compacta, y la sección inferior, donde se recoge el vinagre. El líquido alcohólico penetra por la parte superior del generador con ayuda de un inyector automático o a través de alcachofas dispersantes, en forma de lluvia sobre las virutas u otros materiales mencionados, sobre los que ha formado una capa viscosa de bacterias acéticas que oxidan el alcohol a ácido acético, el aire penetra por el fondo falso de la sección media y al calentarse asciende a la zona superior, en donde se extrae. Esto se consigue ajustando la velocidad del aire y del líquido alcohólico que penetra en el generador y enfriado el segundo antes de su entrada y refrigerando el líquido, parcialmente acetificado, que vuelve de la sección inferior del tanque a la superior para sufrir de nuevo la acción de las bacterias acéticas. (Frazier, 1981).

### 2.5.1.- Generador de Frings.

#### A. Procesos en superficie.

El generador de Frings consiste en tanque cilíndrico grande, herméticamente cerrado, provisto en su parte superior de un rociador, un sistema de refrigeración en la porción inferior de la sección media, que contiene las virutas o material similar, y un dispositivo favorece la recirculación del vinagre recogido en la cámara inferior del aparato. Algunos generadores modernos de este tipo controlan automáticamente la entrada del líquido alcohólico y del aire filtrado, la temperatura y la recirculación del líquido recogido en la cámara inferior, estos generadores dejan un residuo alcohólico mínimo y dan un elevado rendimiento de ácido acético.

A pesar de los procesos sumergidos, el **generador de goteo** es todavía ampliamente utilizado en la producción del vinagre casero. Es un tanque construido de madera (ciprés o secoya) y es empaquetado con alrededor de 2,000 pies cúbicos de virutas de madera de aya. Un doble fondo soporta las virutas por arriba de un compartimento más bajo que es la 5ta. parte del

tanque, el cual es una reserva de almacenamiento de cerca de 3,500 gal. de capacidad. Una bomba recircula una mezcla de etanol-agua-ácido acético de un tubo rociador hacia el espacio del tanque directamente un refrigerante es distribuido por un tubo rociador que está en la parte alta del tanque. El flujo del líquido es impulsado directamente del tubo rociador y vira continuamente, resultando una distribución uniforme en el proceso del vinagre sobre el embalaje, el líquido gotea hacia abajo directamente al embalaje y retorna a la reserva almacenada. La temperatura del generador es regulada por la velocidad del flujo y es enfriada entre 29°C en la parte superior del generador, en el fondo del embalaje la temperatura máxima es alrededor de 35° C. Un compresor es usado para surtir aire dentro de los orificios en el doble fondo hacia arriba del embalaje. La velocidad del aire es controlada por una válvula y monitoreada por medio de un rotámetro, la parte superior del generador esta cubierta pero tiene una salida de aire. La excesiva velocidad de aire merma la cantidad de alcohol y vinagre a través del tubo de escape. Una velocidad de aire de alrededor de 80-90 pies<sup>3</sup>/hora/100 pies<sup>3</sup> del embalaje se considera adecuada. El contenido de oxígeno en el tubo de aire puede ser medida con un equipo especial para esto, si esto se hace, la velocidad de aire debe de ser regulada para mantener una concentración de oxígeno en el tubo de escape arriba del 12%. El embalaje usado en la mayoría de los generadores consiste de virutas de madera en forma de espiral con alrededor de 1 1/4 pulgadas de diámetro y alrededor de 2 pulgadas de longitud. Aunque estas espirales tienden a ablandarse un poco conforme pasa el tiempo, el grado de instalación es relativamente menor comparado al obtenido con el material más barato del embalaje, como los zuros de maíz u otras formas de virutas de madera. Las extracciones de aya de madera fresca también son más aceptadas que otras maderas. La concentración del alcohol es otro factor crítico en la operación del generador, la cantidad de alcohol adicionada debe ser suficiente para rendir una concentración deseada de ácido acético más una cantidad que permita un residuo de por lo menos 0.2% de alcohol no convertido. Si todo el alcohol adicionado es vaciado *Acetobacter* muere y el generador es inactivado. La cantidad final de vinagre retirada de la reserva debe ser limitada a una cantidad que, cuando se reemplace con la carga que contiene alcohol (masa celular) tenga una concentración de alcohol combinada de menos de 5% por volumen. Esto es especialmente importante cuando la acidificación final es del 12% o más. (Peppler y Perlman, 1979). Del alcohol que se añade, el 88-90% se convierte en ácido acético en proceso del generador de goteo. El resto del alcohol se utiliza para metabolismo primario o escapa con los gases de salida. El tiempo necesario para producir ácido acético del 12 % en este proceso es de unos tres días. (W. Crueger y A. Crueger, 1984).

### 2.5.2.- Cultivo sumergido.

En este método (Hromatka y Ebner, 1949) se inocula un medio que se mantiene en agitación y que contiene de 8 a 12% de alcohol (sidra, vino, malta fermentada o destilados) con *Acetobacter acetigenum*, y se mantiene a temperaturas de 24.4 a 29.4 °C, con aeración controlada, que se efectúa con aire finamente dividido. Las bacterias crecen en una suspensión de pequeñas burbujas de aire y líquido de fermentación. El acetador de Frings, es un ejemplo de tipo de aparatos que se emplean para llevar a cabo este método. (Frazier, 1981).

Los vinos de fruta y mezclas especiales con bajas concentraciones totales de alcohol fueron utilizadas por primera vez en cultivos sumergidos. En tales procesos de bajo rendimiento la aeración no era crítica, pero en los procesos actuales de alto rendimiento, que producen 13% de ácido acético en volúmenes de hasta 50 m<sup>3</sup>, la aeración debe de estar fuertemente regulada. Los tanques están contruidos de acero inoxidable y están agitados desde el fondo. El aparato de aeración consiste en un rotor de succión que introduce el aire desde la parte superior del fermentador a través de una tubería. Normalmente deben de ser instalados intercambiadores de calor para el control de la temperatura y eliminadores de la espuma. El vinagre casero (13% de ácido acético) se produce en forma discontinua, en un proceso completamente automático, en condiciones continuas de agitación y aeración, partiendo de un material que contiene 7-10 g de ácido acético/100 ml y 5% de etanol. La concentración de etanol se mide continuamente durante el proceso y cuando la concentración cae a 0.05-0.03 % (aproximadamente 35 horas) se saca el 50-60% de la solución y se reemplaza con una nueva mezcla que contiene 0-2g de ácido acético/100 ml y 10-15% de etanol. Se han descrito procesos totalmente continuos con rendimientos del 98% a 40°C (Greenshields y Schmith, 1974). Con el proceso de cultivo sumergido la velocidad de producción por m<sup>3</sup> es 10 veces más alta que con la fermentación en superficie y aproximadamente 5% más alta que con el proceso de generador de goteo. Otras ventajas son: una inversión más baja de capital por cantidad producida, solamente se requiere para su instalación el 20% del área de la planta, la capacidad de conversión a otros sustratos en un tiempo corto y el bajo costo en personal debido al control completamente automático.

Los materiales de partida con bajo contenido en etanol, como vino, suero de leche, malta o sidra no requieren ningún componente adicional para constituir una solución completa de nutrientes. Sin embargo, si se utilizan alcohol técnico o licores de patata o de grano, deben ser añadidos nutrientes en muchos casos, para obtener el crecimiento y producción de ácido acético óptimos. En fermentación sumergida la concentración de los nutrientes debe

ser cinco veces más alta debido a la biomasa que se saca del reactor con el vinagre. El inóculo pueden ser cultivos puros o vinagre de los lotes previos. (W. Crueger y A. Crueger, 1984).

#### 2.4.2.1.- Acetador de Frings.

El generador más usado para los cultivos sumergidos de vinagre es el Acetador de Frings (Ebner, 1976) producido por la Compañía Heinrich Frings de Bon, Alemania, representado en la fig No. 3. En este tipo de generador las bacterias crecen en una suspensión de pequeñas burbujas de aire y líquido de fermentación. Es un fermentador muy eficiente construido de acero inoxidable con un agitador de alta velocidad en el fondo del tanque, control de temperatura (termómetro regulador) y un eliminador de espuma. La única característica de este equipo, es un método altamente eficiente de suministro de aire. Esto es ejecutado por medio de un rotor succionador de alta velocidad en el fondo del tanque que extrae el aire directamente por un tubo que está conectado a un rotámetro que mide la cantidad de aire que penetra en el tanque a cada minuto, y una válvula de control de salida de aire. El rotor succiona el aire, lo acelera, después de mezclarlo perfectamente con agua, distribuyendo la suspensión uniformemente sobre toda la sección del tanque, esta acción es altamente esencial, por si ocurre una limitación de oxígeno en cualquier momento evitando que los organismos de *Acetobacter* sean adversamente afectados. La temperatura de este tipo de generadores es controlada con un refrigerante que circula directamente dentro de una espiral. Con la velocidad rápida de producción que se obtiene en este tipo de generadores, es necesario un medio adecuado de dispersión de calor de oxidación. La temperatura de operación es generalmente alrededor de 30 °C, aunque la temperatura óptima parece variar inversamente con la concentración total de alcohol y ácido en la masa. Algunas cepas de *Acetobacter* son más tolerantes que otras a las altas temperaturas de operación, pero la mayoría de las cepas morirían alrededor de los 38 °C.

La formación de la espuma es un problema común en los generadores de fermentación sumergida, por lo tanto los mecanismos que se emplean para evitar la formación de espuma son esenciales. En el Acetador es usada una centrifuga desespumante que es automatizada por un electrodo que percibe tanto el tipo como el volumen de la espuma. El Acetador es operado por un tipo de lote que puede ser regulado por medio de un instrumento llamado Alkograph, que constantemente monitorea la concentración de alcohol de la masa y es usado para indicar la terminación del ciclo de fermentación. El sistema automático puede ser disparado cuando el alcohol residual cae a 02% por volumen. (Pepler y Perlman, 1979).

Después de que se completa cada ciclo de fermentación, alrededor del 35% del producto terminado es vaciado. El tiempo que dura cada ciclo de fermentación del 12% de vinagre es alrededor de 35 hrs. La velocidad de producción puede ser diez veces más alta que la obtenida en los generadores de goteo. La producción de vinagre por proceso sumergido es extremadamente turbio, por el contenido de bacterias que lo producen. Se requiere para su filtración, filtros de gran capacidad, medios auxiliares de filtración, agentes filtrantes. En contraste, cuando el vinagre se produce en generadores de goteo se requieren de filtros de menor capacidad, ya que los organismos del vinagre son retenidos por las virutas de madera que contiene el generador.

Para iniciar el cultivo sumergido en el generador puede usarse como inóculo un vinagre bruto de una operación similar. Este es un vinagre preparado que contiene algunos organismos vivos, los cuales serán activados bajo condiciones ideales de aeración, concentración de alcohol y nutrientes. El tiempo de iniciación podría tomar de 7-21 días, la Compañía Frings manufactura fermentadores para laboratorios pequeños de (1.7 lt.) y (5 lt.) para planta piloto, los cuales pueden ser usados para iniciar los cultivos de bacterias a partir de cultivos liofilizados de productos ácidos probados. En este tipo de operación, donde la bacteria es apartada con el vinagre final, se requiere una concentración considerablemente alta de nutrientes.

Los aspectos más convenientes y las ventajas de un Acetador sobre un generador de goteo son numerosos, sin embargo podemos citar las siguientes: (1) el espacio requerido para producir una cantidad igual de vinagre es de alrededor de uno a seis; (2) el capital invertido comparado con la capacidad de producción es mucho más bajo que para la operación completa del generador; (3) la eficiencia en el acetador es muy alta, y el rendimiento es arriba del 5-8%; (4) es muy fácil transferir un tipo de vinagre a otro y poner en marcha una máxima producción; (5) los generadores pueden ser altamente automatizados. (Peppler y Perlman, 1979).

### **2.5.3.- Procesamiento del vinagre.**

La composición del vinagre depende del material utilizado en su fabricación, los vinagres procedentes de frutas y licores malteados poseen reminiscencias del aroma de estos materiales, también influye poderosamente el método de fabricación. Los vinagres elaborados por los métodos lentos son menos ásperos que los fabricados por los métodos rápidos porque durante su preparación han sufrido un proceso de envejecimiento. Los vinagres de fabricación rápida mejoran considerablemente su sabor y adquieren más cuerpo cuando se les permite

envejecer en tinas o barriles. El vinagre debe ser muy claro; se clarifica mediante filtración y refinado, que consiste en la decantación de los materiales en suspensión añadidos. Gran parte del vinagre que en la actualidad se vende en el mercado es un vinagre previamente pasteurizado, en masa o embotellado. La fuerza del vinagre se expresa en gramos, es decir diez veces el número de gramos de ácido acético por 100 ml de vinagre. Un vinagre de 40 gramos contiene 4 gramos de ácido acético por 100 ml. de vinagre a 20 °C. (Frazier, 1981).

Filtración y clarificación.- El vinagre destilado de los generadores de filtro de goteo esta relativamente libre de material insoluble, por lo que los filtros de pequeña capacidad son suficientes. Sin embargo, otros vinagres provenientes de procesos de goteo y todos los vinagres de procesos sumergidos requieren para su clarificación el uso de filtros y agentes purificantes, debido a la presencia de bacterias. Cuando se desea decolorar el producto final se utiliza Ferrocianuro de potasio ( $K_4(Fe(CN)_6)$ ) sin embargo cuando estos aditivos son usados, se requieren filtros de gran capacidad. (Peppler y Perlman, 1979).

Envasado.- Una forma de evitar el crecimiento bacteriano posterior al envasado, es la pasteurización. Las botellas son llenadas y cerradas herméticamente, calentadas de 60° a 65°C, y se mantiene esta temperatura por 30 minutos antes de enfriar, a este proceso se le llama pasteurización rápida. Uno de los procedimientos menos convenientes y poco usados, consiste en calentar el vinagre de 65°C a 70°C llenar las botellas con el vinagre caliente y sellarlas inmediatamente. (Peppler y Perlman, 1979).

Concentración del vinagre.- El vinagre puede concentrarse por un proceso de congelación. El vinagre es congelado a medio derretir, el cual es centrifugado para separar el vinagre concentrado del líquido con bajo contenido de ácido. El agua de este hielo derretido contiene alrededor de 1-2% y puede ser usado para diluir etanol de 190°C y preparar inóculo para el generador. (Peppler y Perlman, 1979).

## **2.6 INVESTIGACIONES REALIZADAS PARA MEJORAR LA PRODUCTIVIDAD DEL PROCESO.**

Desde 1970 muchas investigaciones sobre bioreactores han sido publicadas, en los cuales intentaban incrementar la velocidad de producción microbiana usando microorganismos inmovilizados. En esta línea de investigación (Mori, 1985) dirigió sus investigaciones sobre producción de ácido acético por

células inmovilizadas de *Acetobacter* sobre diferentes materiales de soporte. La bacteria ácido acética fijada sobre la superficie hueca de la fibra de una membrana produjo continuamente ácido acético a una velocidad de 0.2 g/l/h con una concentración de ácido acético de 30 g/l (Nanba y col. 1985). Aunque el oxígeno fue suministrado a las células ligadas dentro de la cavidad de los tubos de fibra, la velocidad de producción de ácido acético fue baja y tal vez atribuido a la baja fracción de volumen del soporte de las fibras en el medio de cultivo (5%). La velocidad de producción de ácido acético por la bacteria ácido acética ligada a monolitos de cerámica y atrapados en perlas de gel carragenina fue 10.4 g/l/h con una concentración de ácido acético de 23 g/l (Osuga y col. 1984), respectivamente. Sin embargo no obstante las velocidades altas de producción que fueron obtenidas en las dos últimas investigaciones, la concentración de ácido acético fue baja para la producción de vinagre. La producción de ácido acético absorbidas sobre oxido de titanio hidratado alcanzó 5 g/l/h sobre una concentración alta de 69 g/l (Kennedy y col. 1980). Como las especies de *Acetobacter* son estrictamente bacterias aeróbicas, la región efectiva para el crecimiento celular en el soporte del gel es confinada a la proximidad de la superficie del gel a causa de la limitación difusional de oxígeno en el soporte (Mori y col. 1989). La mayor parte de células en el gel, aparte de la superficie, llegaron a ser no viables y consecuentemente perdieron la capacidad oxidativa del etanol. Sin embargo el método de inmovilización de bacterias en perlas de gel han sido bien desarrollados para obtener concentraciones altas en reactor y para reutilización de células, sin embargo es muy difícil obtener una concentración alta de células viables en todo el gel de soporte. (Fukaya y col. 1992).

(Mori y Terui, 1972) reportaron que la bacteria ácido acética presentó una correlación parabólica entre la velocidad específica de crecimiento y la velocidad específica de producción. Se concluyó que el crecimiento celular por el método de inmovilización ofrecía muchas ventajas tanto para la fermentación aeróbica como para la fermentación anaeróbica. (Osuga y col. 1984).

(Park y col. 1989) realizaron un cultivo continuo con recirculación de células para la producción de ácido acético por *Acetobacter aceti* M23 utilizando un fermentador equipado con un modulo de filtro de fibras huecas. El cultivo duro 830 h con varias velocidades de dilución, la cual fue cambiada gradualmente de lenta a alta. Las células de *Acetobacter aceti* fueron cultivadas en un fermentador con un volumen de capacidad de 600 mL (Marubish MD 250), el cual fue operado a una velocidad constante de 900 rpm y una velocidad de aeración de 0.1 vvm. La temperatura del cultivo se

mantuvo a 30 °C. La concentración celular final fue de 21.9 g peso seco/L y la máxima productividad de ácido acético fue de 17.7 g/L.h para una concentración de ácido acético de 50 g/L. Definiendo que el uso del aire rico en oxígeno es indispensable para establecer una alta productividad de ácido acético.

Hay muchas investigaciones de la fermentación de etanol que intentaron la obtención de altas productividades por medio de cultivos de alta densidad. (Park y col. 1989). El comportamiento de cultivos de alta densidad se conservó usando floculación de levaduras (Limtong y col. 1984), (Kuriyama y col. 1985), por separación de células mediante centrifugación (Taniguchi y col. 1987) y por recirculación de filtración de membranas celulares (Lee y Chang, 1984), citados por (Park y col. 1989).

El sistema de filtración de membranas celulares es muy efectivo para alcanzar altas concentraciones de células, pero algunas de estas investigaciones usando membranas para separar células son asociadas con bacterias anaeróbicas que no necesitan suministro de oxígeno.

Existen varios sistemas de bioreactores ideados para obtener altas concentraciones celulares. La fermentación del ácido láctico conducido en un fermentador de flujo con diálisis y un filtro de flujo cruzado. (Taniguchi y col. 1987) reportó que la productividad del ácido láctico por *Streptococcus cremoris* fue incrementado tan alto como 19 veces mas relativamente comparado con el cultivo por lote convencional (Park y col. 1989).

### **2.6.1.- Variables que intervienen en el crecimiento de microorganismos.**

Así como las bacterias varían ampliamente en relación a sus necesidades nutricionales, también muestran respuestas diversas a las condiciones físicas del medio. Dicho de otra manera, para un buen cultivo de las bacterias se necesita combinar apropiadamente los nutrientes necesarios y las condiciones físicas adecuadas.

Temperatura.- Ya que el proceso de desarrollo de las bacterias depende de reacciones químicas y la velocidad con que se efectúan estas reacciones es influenciada por la temperatura, el patrón de desarrollo bacteriano puede ser influido profundamente por esta condición. La temperatura puede, en parte determinar la velocidad de crecimiento y el grado total de desarrollo de los microorganismos, las variaciones en la temperatura también pueden influir en los procesos metabólicos y en la morfología celular. Cada especie de bacterias crece a temperaturas que están dentro de ciertos límites. Las bacterias acéticas las podemos identificar dentro del grupo de las *Mesófilas*, las cuales son bacterias que crecen mejor en límites de temperatura que están entre 25 y 40 °C. La temperatura de incubación que

permite el desarrollo bacteriano en un período corto (12 a 24 h), se llama *temperatura óptima de crecimiento*. Aunque cabe señalar que la temperatura óptima de crecimiento así definida, puede no serlo para otras actividad celulares, para las bacterias acéticas la temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C.

Necesidades de gases. - Los gases principales que afectan el desarrollo bacteriano, son el oxígeno y el dióxido de carbono. Las bacterias presentan una respuesta amplia y variable al oxígeno libre, podemos identificar a las bacterias acéticas dentro del grupo de las Aerobias, bacterias que se desarrollan en presencia de oxígeno libre.

Acidez o alcalinidad (pH). - En la mayor parte de las bacterias el pH óptimo de crecimiento está entre 6.5 y 7.5, aunque algunas bacterias pueden desarrollarse a pH extremos, en la mayor parte de las especies los límites mínimos y máximos corresponden a cualquier punto entre pH 4 y pH 9. Cuando se cultivan bacterias en un medio que originalmente se ajustó a un pH determinado, por ejemplo, a pH 7, es muy probable que este pH cambie como resultado de las sustancias producidas por los microorganismos, las cuales pueden ser ácidas o básicas. El cambio de pH puede ser tan notable que el desarrollo posterior de los microorganismos acabe por inhibirse. Estos cambios tan radicales en el pH se pueden prevenir mediante la incorporación de un elemento paliativo (amortiguador) en el medio de cultivo. (Pelczar y col. 1982).

### 2.6.2.- Efecto del pH sobre las bacterias acéticas.

Las bacterias acidófilas, neutrófilas, basófilas tienen un equilibrio constante en el pH intracelular (pH) alrededor de 6.5, 7.5 y 9.5 respectivamente (Padan y col. 1981). Además del rol establecido de la conservación de la energía (Mitchel, 1979), las bombas de protones de las procariotas primarias mantienen un equilibrio dinámico del pH interno de los organismos. (Padan y col. 1981; Padan y col. 1976), el rol fisiológico el cual es probablemente cuidar la estabilidad de las enzimas citoplasmáticas y su actividad (Laugworthy, 1978).

En relación al pH, las bacteria *acéticas*, tienen un rango óptimo de crecimiento de 5.0 - 6.5, aunque muestra gran capacidad de supervivencia a un pH de entre 3 y 4. (Romero y col.1995).

Para *Acetobacter aceti* el límite de pH inferior es de 4.0-4.5 ; el pH óptimo de 5.4-6.3 ; y el límite de pH superior es de 7.8-8.0. (Pelczar y col. 1982).

Menzel y Gottschalk (1985), presentaron un trabajo sobre el pH intracelular de *Acetobacterium weringae* y *Acetobacter aceti* durante su crecimiento y producción de ácido acético. El pH intracelular fue medido durante el crecimiento de *Acetobacterium weringae* y *Acetobacter aceti* con un método de distribución del equilibrio-ácido. El pH extracelular de *Acetobacter aceti* disminuyó de 6.2 a 3.5 y el intracelular de 5.8 a 3.9, paralelamente. Esto demostró que el acetogen aeróbico no fue capaz de mantener una diferencia de potencial alto de pH en presencia de altas concentraciones de ácido acético.

Los resultados muestran por otro lado que *Acetobacter aceti* se adapta muy bien en un medio ambiente bastante ácido. Los organismos crecieron hasta un pH extracelular de 4.0 y continuaron produciendo ácido acético hasta un pH de 3.6. Sin embargo el crecimiento de *Acetobacter aceti* se detuvo cuando el pH del medio se excedió a un valor de 6.8.

Fueron sorprendentes los resultados obtenidos con *A. aceti*, ya que la bacteria fue capaz de mantener el pH intracelular constante. El problema general resulta de la introducción del ácido acético no marcado en el citoplasma (Kell y col. 1981) aplicable tanto a los organismos aeróbicos como a los anaeróbicos.

### 2.6.3.- Efecto del oxígeno sobre las bacterias acéticas.

El oxígeno es necesario en los primeros momentos de la fermentación alcohólica, particularmente para la producción de las células en condiciones óptimas. Para la fermentación acética, el oxígeno es un factor importante durante todo el proceso. (Presscot y Gordon, 1962).

Ha sido reconocido que la producción oxidativa microbiana de ácido acético es un proceso altamente aeróbico y el efecto del nivel de oxígeno ha sido estudiado en muchos trabajos. (Hromatka y Ebner, 1949; Mori y col. 1970; Greenshields y Smith, 1974;).

Los requerimientos específicos de oxígeno de la bacteria acetobacter son extraordinariamente altos (Hromatka y Ebner 1949). La deficiencia de oxígeno origina una fermentación turbia. Los efectos más marcados se presentan en la interrupción larga de la aeración y la alta concentración de ácido acético en el cultivo (Hromatka y col. 1953). La producción específica del material celular es extremadamente baja. Numerosos estudios publicados han sido encaminados a encontrar una conexión entre el ATP y la velocidad de crecimiento. (Forrest, 1965) y (Cole y col. 1967) concluyeron que los cambios del ATP intracelular dependen de las condiciones del cultivo. Un fenómeno bien conocido es el comportamiento de los organismos bajo

condiciones de una repentina interrupción de aeración en períodos cortos de tiempo, por ejemplo 45 segundos, resultando la muerte inmediata de la bacteria. (Hitschaman y col. 1985).

La fermentación acética es un proceso aeróbico, es también conocido que el oxígeno tiene un efecto inhibitorio sobre concentraciones arriba de 5 p.p.m. de oxígeno disuelto, considerablemente menor que el valor de saturación. En el modelo de la cinética de crecimiento de *Acetobacter aceti* en cultivo sumergido los autores estimaron que las concentraciones óptimas para el crecimiento de la bacteria fue: Etanol 13 g/l, ácido acético 10 g/l, oxígeno 1.6 p.p.m. (Romero y col. 1994).

Ha sido largamente reconocido que las bacterias ácido acéticas son aerobias estrictas, desde entonces los procesos sumergidos de fermentación acética eran desarrollados para la producción de vinagre por Horomatka y col. (1949-1951) y Schimwell (1954), las características aeróbicas de esta bacteria ha sido una noticia conveniente para la industria del vinagre. Horomatka y col. (1951) estudió la influencia de la interrupción completa de aeración sobre la velocidad de fermentación, y encontraron que 30 segundos fue un tiempo crítico, sin embargo, el incontinuo declive de productividad de ácido después de la interrupción de aeración y agitación fue variable y también dependiente del grado de concentración en el ácido acético en el tiempo de interrupción. Richardson (1967) y Takeuchi y col. (1968) señalaron la importancia del suministro continuo de oxígeno en los cultivos durante la fermentación sumergida del vinagre, sin embargo, ha habido pocos estudios bioquímicos o morfológicos con respecto a la influencia de la deficiencia de oxígeno sobre la bacteria ácido acética y la producción de ácido.

## 2.7 METODOLOGIA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.

La Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas para analizar problemas en los cuales varias variables independientes influyen a una variable independiente ó respuesta y el objetivo es optimizar la respuesta. (Box y Youle, 1955).

La Metodología de Superficie de Respuesta también puede ser definida como un método estadístico que usa datos cuantitativos de diseños experimentales apropiados para determinar y simultáneamente resolver ecuaciones multivariadas, ecuaciones que puedan ser representadas gráficamente como una superficie de respuesta, la cual puede ser utilizada para describir cómo las variables probadas afectan la respuesta, para determinar las interacciones entre ellas y para describir el efecto combinado de todas las variaciones probadas en las respuestas (Giovanni, 1983).

La Metodología de Superficie de Respuesta (RSM) puede resumirse en cuatro pasos:

1.- Identificación de las variables: identificar dos o tres variables críticas del proceso bajo estudio, esto es; los factores que tienen mayor influencia sobre la respuesta analizada. Estos pueden ser determinados por experimentos preliminares, bibliografía ó por la experiencia del investigador. El número de variables estudiadas se limita generalmente de dos a tres para simplificar el modelo estadístico.

2.- Definición de los niveles de las variables: Definir los rangos a probarse para cada variables. Si estos rangos son muy amplios y el óptimo no es definido claramente por el método de superficie de respuesta, entonces se hace un segundo experimento, usando un rango más estrecho.

3.- Diseño experimental: establecer los experimentos a realizarse usando un diseño experimental adecuado. Estos diseños seleccionan un grupo de experimentos, de todos los experimentos posibles, lo cual reduce el número total de pruebas. Después de que los experimentos son especificados, son realizados y así obtenemos los datos cuantitativos que se utilizarán en el análisis estadístico.

4.- Análisis de datos: analizando los datos cuantitativos por medio de un adecuado programa de computación, las conclusiones hechas de estos análisis deberán de ser confirmados con pruebas posteriores, en donde se trabajará con los valores óptimos encontrados para las variables (Giovanni, 1983). La elaboración de gráficas de la técnica de superficie de respuesta puede usarse para determinar las condiciones óptimas de operación; y una vez que las ecuaciones de regresión han sido obtenidas, el proceso puede ser modelado para una amplia variedad de situaciones. (Bowman y Geiger, 1984).

Debido a las ventajas que representa esta técnica principalmente en cuanto a reducción de tiempo y por consiguiente de costos para la determinación de valores óptimos, se eligió esta técnica de metodología de superficie de respuesta para la optimización de pH y agitación en el crecimiento de *Acetobacter aceti*.

# HIPÓTESIS

### III.- HIPÓTESIS

El estudio de la optimización de las variables de pH y Agitación aplicadas a un cultivo con un medio de cultivo rico en nutrientes, permitirá obtener un mayor incremento de biomasa y una alta velocidad específica de crecimiento, para la bacteria *Acetobacter aceti*.

# **OBJETIVOS**

## IV.- OBJETIVOS

**4.1 Objetivo general** .- El objetivo general del trabajo fue obtener altos rendimientos de biomasa y altas velocidades de crecimiento de *Acetobacter aceti* mediante la optimización del pH inicial del medio y la agitación del cultivo empleando la Metodología de Superficie de Respuesta (RSM).

### 4.2 Objetivos específicos o etapas del trabajo.

4.2.1.- Estandarizar las técnicas analíticas.

- 1.- Determinar azúcares reductores libres (ARL) por la técnica de dicromato de potasio. (DNS).
- 2.- Establecer la técnica de titulación para determinar ácido acético.
- 3.- Determinar curva de densidad óptica vs. peso seco.

4.2.2.- Estandarizar Inóculo.

- 1.- Medio Sólido.
- 2.- Medio Líquido.

4.2.3.- Determinar pH y Agitación óptimas para el crecimiento de *Acetobacter aceti* empleando la metodología de superficie de respuesta (RSM).

4.2.4.- Validar el método matemático obtenido.

- 1.- Cinética de crecimiento con los valores determinados como óptimos.
- 2.- Determinar el porcentaje de error para las ecuaciones obtenidas.

**MATERIALES Y  
DETERMINACIONES  
ANALÍTICAS**

## V.- MATERIALES Y DETERMINACIONES ANALÍTICAS.

### 5.1 MICROORGANISMO.

*Acetobacter aceti* ssp. *Licuefacians* clasificada como **BCGC-B-051** proporcionada por el Banco de Cepas y Genes del **CIATEJ**, (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco).

### 5.2 MEDIOS.

5.2.1.- Medio Agar- Manitol.	g/l
Extracto de Levadura	5.9
Triptona	3.0
Manitol	25.0
Agar-Agar	15.0
Agua destilada	1000

5.2.2.- Medio Agar-Park.	g/l
Glucosa*	7.0
Triptona	2.0
Extracto de Levadura	5.0
Acido acético	5.2
Agar-Agar	20.0
Agua destilada	1000

5.2.3.- Caldo de Cultivo-Park.	g/l
Glucosa*	10.0
Triptona	10.0
Extracto de Levadura	10.0
Acido acético	5.2
Agua destilada	1000

\* La glucosa fue esterilizada 15lb./15min. por separado y adicionada posteriormente a los demás componentes.

### 5.3 VARIABLES A OPTIMIZAR:

**X1=pH X2=Agitación (rpm).**

Para el primer diseño factorial un rango de:

x <sub>1</sub>	5.0	-----6.0-----	7.0
	(-)	(0)	(+)
x <sub>2</sub>	100	-----200-----	300
	(-)	(0)	(+)

Para el segundo diseño factorial:

x <sub>1</sub>	4.60	-----	7.4
	- 2		+ 2
x <sub>2</sub>	60	-----	340
	- 2		+ 2

### 5.4 REACTIVOS.

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

### 5.5 EQUIPO.

Agitador Fisherbrand.  
 Autoclave Mod. 316762 Man-Olv.  
 Balanza analítica GA2000 OHAUS.  
 Balanza granataria PE1600 Mettler.  
 Campana de flujo laminar VECO.  
 Centrifuga clínica Mod. J-12 Feco.  
 Espectrofotometro uv/vis Lambda 2 Perkin Elmer.  
 Estufa de incubación Mod. 133 Felisa.  
 Limpiador de Ultrasonido Mod. ME L5.5 Canitator.  
 Micropipetas Gilson.  
 Orbital rotatorio Mod. G25 New Brunswick.  
 Placa magnética y de calentamineto Corning.  
 Potenciometro pH O 50 Beckman.

## 5.6 TÉCNICAS.

### 5.6.1.- Técnica para la determinación de Azúcares Reductores Libres por el método DNS ( Miller, 1959).

Reactivos utilizados:

	g/l
a) Hidróxido de sodio	10
b) Acido,3.5 dinitrosalisílico (DNS)	10
c) Tartrato de sodio y potasio	200
d) Fenol	2
e) Metabisulfito de sodio	0.5

Preparación de la solución de DNS.:

Disolver los reactivos en aproximadamente 600 ml. de agua destilada dejando al último el ácido 3,5 dinitrosalisílico, el cual se debe ir adicionando poco a poco hasta lograrse su completa disolución, posteriormente aforar a 1litro con agua destilada.

Procedimiento:

Adicionar en tubos de ensayo 0.5 ml. de muestra, añadirle 1.5 ml. de solución DNS, agitar, colocar los tubos en baño de agua a punto de ebullición durante 15 min. enfriar a temperatura ambiente, agregar 8 ml. de agua destilada y agitar. Leer la absorbancia a 550 nm.

### 5.6.2.- Técnica para la determinación de etanol por el método de Dicromato de potasio. (Bohringer y Jakob, 1964).

Reactivos utilizados:

	g/l
a) Dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ )	33.77
b) Acido sulfúrico ( $H_2SO_4$ )	325.00

Preparación de la solución de dicromato de potasio:

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; por último se afora a 1 litro con agua destilada.

Procedimiento:

A 1 ml. de muestra se agregan 2 ml. de solución de dicromato de potasio, agitar y dejar reposar durante 10 min. posteriormente agregar 5 ml. de agua destilada, agitar nuevamente y leer la absorbancia a 585 nm.

### 5.6.3.- Determinación de la concentración de ácido acético por el método de titulación.

Reactivos utilizados:

- |                       |        |
|-----------------------|--------|
| a) Hidróxido de sodio | 0.1 N. |
| b) Fenofaleína        | 5 %    |

Procedimiento:

Adicionar en tres matraces de 125 ml. de volumen, 10 ml. de muestra, agregar 1 gota de Fenofaleína, al 5% (indicador), posteriormente se titula con Hidróxido de sodio 0.1 N. Para sacar la concentración de ácido acético se aplica la siguiente formula:

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

### 5.6.4.- Técnica para la determinación de peso seco.

Procedimiento:

La muestra se centrifuga a 5,000 r.p.m. durante 30 min., el sedimento se resuspende en agua destilada, se centrifuga dos veces más a las mismas condiciones para lavar las células, finalmente se resuspende el paquete celular y se deposita en charolas de aluminio previamente puestas a peso constante y se colocan en una estufa a 80 °C hasta evaporar completamente el agua (aproximadamente 8 hrs.), y obtener las células secas.

El peso seco se determina por la diferencia de pesos aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Peso seco (g/l)} = \frac{\text{Peso final muestra} - \text{Peso charola}}{\text{ml. de muestra}} \times 1000$$

## 5.7 CALCULOS.

### 5.7.1.- Respuestas analizadas (variables dependientes):

Los cálculos para las respuestas analizadas se realizaron aplicando las fórmulas siguientes:

#### RENDIMIENTO EN BIOMASA CON RESPECTO AL SUSTRATO:

$$Y_{x/s} = \frac{x_f - x_0}{s_0 - s_f}$$

#### INCREMENTO DE BIOMASA:

$$\Delta x \text{ (g/l)} = x_f - x_0$$

#### VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO:

$$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)} = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt}$$

#### TIEMPO DE DUPLICACION:

$$td \text{ (h)} = \frac{\ln 2}{\mu}$$

#### DONDE:

$x$  = representa la concentración de Biomasa en g/l.

$s$  = representa la concentración de Sustrato (azúcares reductores libres ) en g/l.

$\mu$  = representa la velocidad específica de crecimiento.

El subíndice "o" indica el valor de la concentración tomado al tiempo inicial.

El subíndice "f" corresponde a la concentración final al momento de estabilizar el crecimiento.

**5.7.2.- Ajuste de modelos matemáticos.**

Ecuación de una línea recta:  $y = m(x) = b$

Ecuación de un polinomio de 1er. orden:  $y = k + Ax_1 + Bx_2$

Ecuación de un polinomio de 2do. orden:  $y = k + A(x_1) + C(x_1)^2 + B(x_2) + D(x_2)^2 + E(x_1x_2)$

**DONDE:**

**m=** pendiente de la línea.

**b=** punto de corte al origen.

**k=** coeficiente constante.

**A=** coeficiente lineal para  $x_1$

**B=** coeficiente lineal para  $x_2$

**C=** coeficiente cuadrática para  $x_1$

**D=** coeficiente cuadrática para  $x_2$

**E=** coeficiente para la interacción de  $x_1$  y  $x_2$

**Y=** variable dependiente.

**X,  $X_1$  y  $X_2$ =** variables independientes.

# **METODOLOGÍA**

## **VI.- METODOLOGÍA**

### **6.1 ESTANDARIZACION DE TECNICAS ANALÍTICAS.**

#### **6.1.1.- Curva de calibración para la determinación de Azúcares Reductores Libres (ARL).**

Se realizó una curva de calibración para determinar azúcares reductores libres por medio de la técnica DNS usando una solución patrón de glucosa anhidra a una concentración de g/l. El rango de concentración a probar fue de 0.1 a 1 g/l., para obtener una ecuación mediante un análisis de regresión lineal que prediga la cantidad de azúcares reductores libres presentes en una muestra a partir de una absorbancia dada.

#### **6.1.2.- Curva de calibración para la determinación de etanol.**

Se realizó una curva de calibración para determinar etanol por medio de la técnica de dicromato de potasio, usando una solución patrón de 20 g/l. El rango de concentración a probar fue de 2 a 20 g/l. de etanol para obtener una ecuación mediante un análisis de regresión lineal que predijera la cantidad de etanol presente en una muestra a partir de una absorbancia dada.

#### **6.1.3.- Curva de correlación de densidad óptica vs. peso seco.**

Se realizó una curva de correlación para densidad óptica vs. peso seco usando un inóculo de un matraz de propagación con una absorbancia final de 6.08 y peso seco total de 1.420 g/l. El rango de densidad óptica a probar fue de 0.122 a 1.165, para obtener una ecuación mediante un análisis de regresión lineal que prediga el peso seco presente, en una muestra a partir de una absorbancia dada.

## **6.2 ESTANDARIZACION DE INOCULO.**

El crecimiento de *Acetobacter aceti*, se llevó a cabo en fase sólida y fase líquida en medio de cultivo sintético.

### **6.2.1.- Determinación de crecimiento óptimo de *Acetobacter aceti* en medio sólido.**

Como se ejemplifica en la fig. No. 4 a partir de un tubo crecido en medio agar Park (proveniente de la resiembra de una caja de conservación de la cepa crecida en medio Agar-Manitol), se sembraron ocho tubos con el mismo medio, incubándose a una temperatura de 30 °C, por un período de 32 hrs., para lo cual, se muestreo el crecimiento en una suspensión celular obtenida a diferentes tiempos. La suspensión celular se preparó adicionando a cada tubo crecido, 5 ml. de solución fisiológica estéril para resuspender las células bacterianas para finalmente leer la absorbancia a 570 nm y construir una gráfica de crecimiento con respecto al tiempo.

### **6.2.2.- Determinación de crecimiento óptimo de *Acetobacter aceti* en medio líquido.**

Se inoculó un matraz Erlenmeyer con 10 ml. de suspensión celular obtenida de cinco tubos crecidos el tiempo determinado como óptimo; posteriormente el matraz fue incubado a 30 °C y una agitación de 250 rpm. Se determinó crecimiento cada 2 hrs. por 14 hrs. consecutivas. Se realizó una segunda estandarización correspondiente al segundo pase de propagación en medio líquido, partiendo de un inóculo de 30 ml. del primer matraz de propagación se inoculó un segundo matraz Erlenmeyer de 500 ml. conteniendo 70 ml. de medio de crecimiento, el cual se incubó a las mismas condiciones 30 °C/250 rpm por 12 hrs., determinándose el crecimiento bacteriano cada dos horas. El esquema de trabajo se ilustra en la fig. No. 5.

## **6.3 OPTIMIZACION DE pH Y AGITACION EMPLEANDO LA METODOLOGIA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA.**

### **6.3.1.- Primer Diseño Factorial.**

Se utilizó un diseño experimental factorial  $2^n$ , siendo n igual a 2. Esto es se probaron 2 variables (pH y agitación) a dos niveles con 3 puntos centrales y un modelo polinomial de primer orden de acuerdo con el diseño que se muestra en el cuadro No. 1, siendo las respuestas analizadas incremento de biomasa, velocidad de crecimiento, rendimiento y tiempo de duplicación.

Las variables codificadas (+1,-1,0) se calcularon en base a la siguiente formula:

$$X^* 1 = \frac{X'1 - P.C}{\Delta}$$

Por ejemplo para el caso de pH (X1) y agitación (X2) las fórmulas serían:

$$X^* 1 = \frac{X'1 - 6.0}{5.0} \quad X^* 2 = \frac{X'2 - 200}{100}$$

Se realizó la propagación de la cepa con dos pases sucesivos (fig. No. 5) y a partir del segundo matraz de propagación se inoculó con 60 ml. un matraz Erlenmeyer de 1000 ml. conteniendo 140 ml. de medio para las cinéticas de crecimiento.

Las condiciones para las cinéticas de crecimiento fueron constantes: temperatura 30 °C y variables: los valores de pH y agitación de acuerdo al cuadro No. 1.

En cada cinética de crecimiento, se tomaron muestras cada 2 hrs. durante 24 hrs. para determinar: pH y densidad óptica la cual fue posteriormente convertida a peso seco con la ecuación obtenida en el inciso 6.1.4.

Los resultados del primer diseño factorial, se sometieron a un análisis de regresión múltiple y a un análisis de varianza, para probar su ajuste al modelo lineal.

\* variable codificada que se sustituirá por +1,-1 y 0.

' valor real a probar para la variable, valor buscado.

P . C punto central para rango de la variable.

$\Delta$  incremento del extremo del rango (+1 ó -1) al punto central.

### 6.3.2.- Segundo Diseño Factorial.

Se completó el diseño experimental introduciendo los términos rotatables (cuadro No. 2 donde el número de experimentos son: 8,9,10 y 11) y posteriormente los resultados de los 11 experimentos se sometieron a una regresión múltiple para un modelo de segundo orden, obteniéndose los modelos matemáticos para cada una de las respuestas ya mencionadas, con estas ecuaciones se generaron las superficies de respuesta correspondientes.

Los niveles de las variables en unidades codificadas fueron:

$$\pm \sqrt{2} = \frac{X_1 - 7.40}{4.58} \quad \pm \sqrt{2} = \frac{X_2 - 340}{60}$$

El esquema de trabajo (fig. No. 5) se realizó de la misma forma que el objetivo descrito en el primer diseño factorial.

### 6.3.3.- Validación de las ecuaciones obtenidas para el incremento de biomasa.

Se realizaron tres experimentos numerados como 12,13, 14, para la validación del modelo. Los valores probados para la variable  $X_1$  (pH) fueron 7.7, 4.5, 5.0; y para la variable  $X_2$  (agitación) fue 400 rpm para los tres experimentos.

El esquema de trabajo se realizó de la misma forma que el objetivo descrito anteriormente. Los valores experimentales se confrontaron con los teóricos predichos por las ecuaciones obtenidas y se calculó el porcentaje de error para cada una de ellas.

Por último se realizaron dos experimentos (No. 15 y 16) con un pH 4.5 y agitación a 400 rpm variando el medio de cultivo al cual se le cambió la concentración de glucosa, 3g/l en medio sólido para ambos experimentos y 10/l y 2g/l en medio líquido para el exp. No. 15 y 16 respectivamente.

# **RESULTADOS**

## VII.- RESULTADOS

### 7.1 ESTANDARIZACION DE TECNICAS ANALITICAS.

7.1.1.- La curva de calibración utilizada para la determinación de ARL se muestra en la fig. No. 6. La ecuación obtenida fue  $Y=4.386667 \text{ E-}02 + 0.8161212 (x)$  y es aplicable en los rangos de absorbancia de 0.032 a 0.765 que correspondieron a una concentración de 0.1 a 1 g/l, con un coeficiente de correlación de 0.99965 para 10 puntos.

7.1.2.- La curva de calibración utilizada para la determinación de alcohol etílico se muestra en la fig. No 7. La ecuación obtenida fue  $Y=1.555455 \text{ E-}02 + 5.111061 (x)$  y es aplicable en los rangos de absorbancia de 0.1215 a 0.9355 que correspondieron a una concentración de 0 a 18 g/l, con un coeficiente de correlación de 0.99919 para 9 puntos.

7.1.3.- La curva de correlación utilizada para la determinación de peso seco en base a la densidad óptica se muestra en la fig. No. 8. La ecuación obtenida fue  $Y=9.1061 \text{ E-}03 + 4.323406 (x)$  y es aplicable en los rangos de absorbancia de 0.122 a 0.998 que correspondieron a una concentración de 0 a 1.416 g/l, con un coeficiente de correlación de 0.99900 para 10 puntos.

### 7.2 ESTANDARIZACION DE INOCULO.

#### 7.2.1.- Medio Sólido:

La fig. No. 9 ilustra la curva de crecimiento celular de *Acetobacter aceti* durante 28 hrs. en medio sólido, donde se puede apreciar que presenta una fase de adaptación de 8 a 10 hrs. iniciando su fase logarítmica a las 12 hrs. y alcanzando una población máxima a las 26 hrs. que corresponden al final de su crecimiento y comenzando en ese punto su fase estacionaria.

#### 7.2.2.- Medio Líquido:

La fig. No. 10 ilustra la curva de crecimiento celular durante 14 hrs. en medio líquido para el primer pase de propagación de la cepa *Acetobacter aceti*, donde presenta una fase exponencial durante las primeras 8 hrs. de cultivo y

alcanza una población máxima a las 10 hrs. que corresponden al final de su crecimiento y comenzando en ese punto su fase estacionaria.

La fig. No. 11 ilustra la curva de crecimiento celular durante 12 hrs. en medio líquido para el segundo pase de propagación de la cepa *Acetobacter aceti*, donde se puede apreciar una fase de adaptación del tiempo 0-2 hrs. y el crecimiento exponencial inicia inmediatamente después de las 4 hrs. alcanzando su fase logarítmica hasta las 12 hrs.

### 7.3 DISEÑO EXPERIMENTAL.

#### 7.3.1.- Primer diseño factorial.

De acuerdo con el primer diseño factorial se realizarón siete experimentos con diferentes valores para las variables (X1) pH y (X2) agitación especificados en el cuadro No. 1. En los experimentos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, cuyas gráficas están representadas en las figuras 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18 podemos observar el crecimiento de la cepa *Acetobacter aceti* así como el consumo de glucosa como fuente de carbono y el pH del medio.

En los experimentos No. 1 y 3 (fig. No. 12, 14) podemos apreciar una fase de adaptación en las primeras 6 hrs., seguidas de una fase exponencial que finaliza entre 10 y 12 hrs. de crecimiento respectivamente donde podemos apreciar que el pH del medio se mantuvo estable de las 2 a las 12 hrs., sin embargo a partir de las 12 hrs. se observa un incremento en el pH del medio, en ambos experimentos podemos observar que el consumo de glucosa se mantiene estable las primeras 6 hrs. pero a partir de este tiempo la concentración de glucosa del medio comienza a disminuir debido al crecimiento bacteriano. En el experimento No. 4 (fig. 15) podemos apreciar una fase de adaptación de 10 hrs. seguidas de una fase exponencial que finaliza a las 20 hrs. de crecimiento en este experimento observamos que el pH del medio se mantuvo estable de las 2 a las 14 hrs. pero a partir de este tiempo disminuye la acidez del medio hasta las 24 hrs. asimismo observamos que la concentración de glucosa se mantiene estable durante 6 hrs. sin embargo a partir de este tiempo la concentración de esta disminuye hasta 1.5 g/l. En el experimento No. 2 (fig. No. 13) podemos apreciar que la fase exponencial inicia a partir de las 0 hrs. terminando a las 10 hrs. tiempo en el cual alcanza su fase estacionaria de crecimiento, observamos que el pH del medio aumenta su acidez durante la fase exponencial hasta las 8 hrs. tiempo en el cual disminuye la acidez, se observo que la concentración de glucosa disminuye de las 0 hrs. hasta las 12 hrs. tiempo en el cual la cepa se encontraba en su fase estacionaria. En los experimentos No. 5, 6 y 7 (fig. No. 16, 17 y 18) podemos apreciar una fase de adaptación de 2 hrs.

respectivamente seguidas de una fase exponencial que finaliza a las 10 hrs. de crecimiento, entrando posteriormente a una fase estacionaria hasta el final del muestreo que fue de 12 hrs. asimismo podemos observar que el pH del medio en los tres experimentos se mantuvo estable durante 10 hrs. tiempo en el cual la cepa alcanzo su fase experimental respectivamente, en los exp. No. 5 y 7 (fig. No. 16 y 18) podemos apreciar que la concentración de la glucosa del medio desciende a partir de las 0 hrs. debido al crecimiento bacteriano, sin embargo en el exp. No. 6 (fig. No. 17) observamos que el consumo de glucosa fue mínimo debido al escaso incremento de biomasa que se obtuvo.

Las cinéticas de crecimiento para la cepa *Acetobacter aceti* alcanzarón valores de peso seco calculado de 0.1801- 1.7090 g/l.

Los resultados del primer diseño factorial, tomando como respuesta el incremento de biomasa en g/l, velocidad de crecimiento en h<sup>-1</sup>, rendimiento y tiempo de duplicación en h., así como los valores reales de X1 y X2 (determinados experimentalmente) se muestran en el cuadro No. 3 donde podemos observar que el valor más alto para el incremento de biomasa ( $\Delta x$ ) lo obtuvimos en el exp. No. 4 con 1.5289 g/l de peso seco calculado y el valor más bajo lo obtuvimos en el experimento No. 1 con 0.1249 g/l de peso seco calculado, asimismo podemos observar que el valor más alto para la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) lo obtuvimos en el experimento No. 3 con un valor de 0.1627 h<sup>-1</sup> y el valor más bajo lo obtuvimos en el experimento No. 1 con un valor de 0.0445 h<sup>-1</sup>, el valor más alto para el rendimiento (y x/s) lo obtuvimos en el experimento No. 4 y fue de 0.1770 h. y el valor más bajo en el experimento No. 1 donde obtuvimos 0.0624 h. por último en valor más alto para el tiempo de duplicación lo obtuvimos en el experimento No. 1 con 15.5 h. y el valor más bajo en el experimento No. 3 con 4.26 h.

Los resultados del primer diseño factorial se sometieron a un análisis de regresión múltiple para cada una de las respuestas obtenidas.

Para el incremento de biomasa ( $\Delta x$ ), se obtuvo un coeficiente de regresión de 0.55907 para el modelo polinomial de primer orden y la ecuación final fue:  $Y=1.587914 + 0.4036 (X1) + -0.001677 (X2)$ . (Anexo No. 1).

Para la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), se obtuvo un coeficiente de regresión de 0.4145798 para el modelo polinomial de primer orden y la ecuación final fue:  $Y=-0.055 + 0.020125 (X1) + 2.4375E-04 (X2)$ . (Anexo No. 2).

Para el rendimiento (Y x/s), se obtuvo un coeficiente de regresión de 0.6217586 para el modelo polinomial de primer orden y la ecuación final fue:  $Y=-0.1113572 + 0.0381(X1) + 0.0000525(X2)$ . (Anexo No. 3).

Para el tiempo de duplicación ( $t_d$ ), se obtuvo un coeficiente de regresión de 0.5948326 para el modelo polinomial de primer orden y la ecuación final fue:  $Y=27.68714 + -2.54(X1) + -0.0266(X2)$ . (Anexo No. 4).

Se realizaron análisis de varianza para el modelo de primer orden a las respuestas obtenidas.

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza del incremento de biomasa ( $\Delta x$ ), la velocidad decrecimiento ( $\mu$ ), el rendimiento ( $Y$  x/s) y el tiempo de duplicación ( $t_d$ ), para determinar ajuste al modelo lineal se muestran en los cuadros No. 5, 6, 7 y 8 respectivamente donde podemos observar que la F de tablas es menor que la F calculada.

#### 7.4 SEGUNDO DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se completó el diseño experimental con un segundo diseño factorial, introduciendo los términos rotables que se muestran en el cuadro No. 5 para lo cual se realizaron cuatro experimentos más (8,9,10 y 11) cuyas cinéticas de crecimiento se pueden observar en las figuras No. 19, 20, 21 y 22 donde podemos observar los diferentes tiempos de muestreo, el consumo de glucosa, el pH del medio y el crecimiento celular.

En los experimentos 8 y 10 (fig. 19 y 21) podemos apreciar una fase de adaptación en las primeras 2 hrs. seguidas de una fase exponencial que finaliza a las 10 y 8 hrs. de crecimiento respectivamente. En los experimentos 9 y 11 (fig. No. 20 y 22) podemos apreciar una fase exponencial a partir de las 0 hrs. que finaliza a las 6 y 12 hrs. respectivamente. En el exp. No. 9 (fig. No. 20) el pH del medio se mantiene estable durante 6 hrs. tiempo en el que alcanza su fase exponencial, asimismo observamos que el consumo de glucosa se incrementa durante esta fase debido al crecimiento de la cepa. En el exp. No. 11 (fig. No. 22) observamos que el pH del medio se acidifica a partir de las 2 hrs. hasta las 12 hrs. tiempo en el cual alcanza su fase estacionaria, la concentración de glucosa disminuye a partir de las 2 hrs. alcanzando al mínima concentración a las 12 hrs. tiempo en el cual la cepa entra en la fase estacionaria. Alcanzando valores de peso seco calculado de 0.1663 - 1.0984 g/l.

Los resultados del 2º diseño factorial, tomando como respuesta el incremento de biomasa en g/l, la velocidad de crecimiento  $h^{-1}$ , rendimiento y tiempo de duplicación en h, así como los valores reales de ( $X1$  y  $X2$  determinados experimentalmente) se muestran en el cuadro No. 4, en el cual podemos observar que en el experimento No. 10 (fig. No. 21) se obtuvo el mayor incremento de biomasa (0.858 g/l), la más alta velocidad de

crecimiento ( $0.27335 \text{ h}^{-1}$ ) y el menor tiempo de duplicación que fué de ( $2.54 \text{ h}$ ) donde las variables tuvieron un valor de pH inicial  $6.0$  y una agitación de  $340 \text{ rpm}$ ; en el experimento No. 8 (fig. No. 19) se obtuvo el rendimiento más alto ( $0.2042 \text{ h}$ ) donde las variables tuvieron un valor de pH  $7.4$  y una agitación de  $200 \text{ rpm}$ . Los valores obtenidos en los dos diseños factoriales, se sometieron conjuntamente a un análisis de regresión múltiple para cada una de las respuestas obtenidas .

Para el incremento de biomasa ( $\Delta x$ ) se obtuvo un coeficiente de regresión de **0.8332192** para el modelo polinomial de segundo orden y la ecuación final fué:  $Y = -0.1446769 + -0.5252815 (X1) + 9.94021E-03 (X2) + 0.1214822 (X1^2) + 1.993978 E-05 (X2^2) + -0.002984 (X1X2)$ . (Anexo No. 5).

Para la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) se obtuvo un coeficiente de regresión de **0.8338047** para el modelo polinomial de segundo orden y la ecuación final fué:  $Y = -0.3365267 + 6.308005E-02 (X1) + 1.019857E-03 (X2) + 3.524269E-03 (X1^2) + 3.666298E-06 (X2^2) + -3.4725E-04 (X1X2)$ . (Anexo No. 6).

Para el rendimiento ( $Y \text{ x/s}$ ) se obtuvo un coeficiente de regresión de **0.8710991** para el modelo polinomial de segundo orden y la ecuación final fué:  $Y = -0.4863526 + 0.1200615 (X1) + 0.0011862 (X2) + -2.991671E-03 (X1^2) + -3.821348E-08 (X2^2) + -0.000192 (X1X2)$ . (Anexo No. 7).

Para el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) se obtuvo un coeficiente de regresión de **0.9455777** para el modelo polinomial de segundo orden y la ecuación final fué:  $Y = 92.28368 + -19.58156 (X1) + -0.1627131 (X2) + 0.8937027 (X1^2) + -9.293189E-05 (X2^2) + 0.03005 (X1X2)$ . (Anexo No. 8).

La figura No. 28 muestra la forma de la superficie de respuesta para las variables de pH ( $X1$ ) y agitación ( $\text{rpm}$ ) ( $X2$ ) con respecto al incremento de biomasa la cual pertenece a una meseta en forma invertida. La figura No. 29 muestra los contornos de esta superficie donde observamos que el punto estacionario corresponde a un punto de respuesta mínima en la cual se puede apreciar el área donde se alcanza un incremento de biomasa de  $0.6$  a  $5.0 \text{ g/l}$ . En esta gráfica se puede observar que dentro de un rango de pH de  $4.5$  a  $5.5$ , con un rango de agitación de  $100$  a  $270 \text{ rpm}$  se obtiene el incremento de biomasa más bajo que es de  $0.5 \text{ g/l}$ . Sin embargo conforme se toman valores altos de agitación y un pH bajo aumenta el incremento de biomasa es decir dentro de un rango de pH de  $4.5$  a  $6.5$  con un rango de agitación de  $600$  a  $700 \text{ rpm}$  se obtiene un incremento de biomasa de  $5.0 \text{ g/l}$ .

y en general con agitaciones por arriba de 400 rpm se obtienen altos incrementos de biomasa en todo el rango de pH probado. Ejerciendo la variable de agitación la mayor influencia en la respuesta.

La figura No. 30 muestra la forma de la superficie de respuesta para las variables de pH (X1) y agitación (rpm) (X2) con respecto a la velocidad de crecimiento la cual pertenece a una meseta invertida. La figura No. 31 muestra los contornos de esta superficie donde podemos observar que el punto estacionario corresponde a un punto de respuesta mínima, donde observamos el área en la cual se alcanzan velocidades de crecimiento de 0.06 a 0.36 h<sup>-1</sup>. En esta gráfica se observa que en un rango de 60 a 180 rpm y dentro de un rango de pH de 4.0 a 5.0 obtenemos las más bajas velocidades de crecimiento; sin embargo dentro de los rangos de 300 - 400 rpm y pH 4.0 a 6.5 se obtienen las más altas velocidades de crecimiento ejerciendo nuevamente la variable de agitación la mayor influencia en la respuesta.

La figura No. 32 muestra la forma básica de la superficie de respuesta para las variables de pH (X1) y agitación (rpm) (X2) con respecto al rendimiento la cual corresponde a una meseta mínima (silla de montar). La figura No. 33 muestra los contornos de la superficie de respuesta donde podemos observar rendimientos de 0.10 a 0.25. En esta gráfica se observan respuestas mínimas para la zona de 4.5 - 6.0 de pH inicial y de 100 - 500 rpm y de 6.5 - 8.0 pH inicial con 400 - 800 rpm obteniendo el mayor rendimiento a un pH inicial de 4.5 - 5.0 con agitaciones de 700 - 800 rpm o con un pH inicial de 7.0 - 8.5 y agitaciones de 100 - 250 rpm y en donde ambas variables ejercen igual influencia.

La figura No. 34 muestra la forma básica de la superficie de respuesta para las variables de pH (X1) y agitación (rpm) (X2) con respecto al tiempo de duplicación la cual corresponde a una meseta mínima (silla de montar). La figura No. 35 muestra los contornos de la superficie de respuesta donde podemos observar que el punto estacionario corresponde a un punto mínimo, donde se aprecia el área en la cual se alcanzan valores de tiempo de duplicación de 0.2 a 7.0 h; así mismo se observa el tiempos de duplicación altos para la zona de 4.5 - 6.5 pH inicial y de 50 - 350 rpm y de 7.0 - 8.0 de pH inicial con 150 - 400 rpm obteniendo el menor tiempo de duplicación a un pH inicial de 4.5 y una agitación de 380 rpm y pH inicial de 7.5 y una agitación de 80 rpm.

## 7.5 VALIDACION DE LA ECUACION FINAL OBTENIDA PARA INCREMENTO DE BIOMASA, VELOCIDAD DE CRECIMIENTO, RENDIMIENTO Y TIEMPO DE DUPLICACION.

En las figuras No. 23, 24 y 25 se muestran las cinéticas de crecimiento de *Acetobacter aceti* que corresponden a los experimentos 12, 13 y 14 donde podemos observar un comportamiento similar a los descritos anteriormente. El valor obtenido experimentalmente para cada una de las respuestas se comparan con los valores predichos por el modelo matemático donde también se muestra el porcentaje de error obtenido para los experimentos 12,13 y 14 (cuadros No. 9,10,11 y 12).

El incremento de biomasa predicho fue 1.65 g/l para el experimento No. 12, 1.75 g/l para el experimento No. 13 y 1.46 g/l para el experimento No. 14 contra el incremento de biomasa experimental 0.9969, 1.0733 y 0.9182 g/l; obteniendo un porcentaje de error de 39.58, 38.66 y 37.10 %, respectivamente, como lo muestra el cuadro No.9.

La velocidad de crecimiento predicha fue 0.2050 h<sup>-1</sup>, para el experimento No. 12, 0.3882 h<sup>-1</sup> para el experimento No. 13 y 0.3670 h<sup>-1</sup> para el experimento No. 14; contra la velocidad de crecimiento experimental 0.3152, 0.1213 y 0.1269 h<sup>-1</sup>; obteniendo un porcentaje de error de 34.96, 68.75, 65.42 %, respectivamente, como lo muestra el cuadro No. 10.

El rendimiento predicho fué 0.2221 para el experimento No. 12, 0.1161 para el experimento No. 13 y 0.1231 para el experimento No. 14, contra el rendimiento experimental 0.1600, 0.1984 y 0.1893; obteniendo un porcentaje de error de 27.96, 41.48 y 34.75 %, respectivamente, como lo muestra el cuadro No. 11.

El tiempo de duplicación predicho fué 1.85 h para el experimento No. 12, 3.60 para el experimento No. 13 y 3.13 h para el experimento No. 14 contra el tiempo de duplicación experimental 2.20, 5.71 y 5.46 h, obteniendo un porcentaje de error de 15.90, 36.95 y 42.67 %, respectivamente como lo muestra el cuadro No. 12.

Finalmente en el experimento No. 15 y 16 (fig. No. 26 y 27) podemos apreciar una fase de adaptación de 2 y 4 hrs. seguidas de una fase exponencial que finaliza a las 20 y 22 hrs. de crecimiento respectivamente, en el exp. No. 15 (fig. No. 26) observamos que el pH del medio se mantiene estable durante 10 hrs. y posteriormente tiende a alcalinizarse hasta las 17 hrs. tiempo en el cual

observamos un descenso hasta las 22 hrs. asimismo podemos apreciar que la concentración de la glucosa disminuye a partir de las 0 hrs. a las 22 hrs. en la que se observa una concentración de 2.6 g/l en el medio.

En el experimento No. 16 (fig. No. 27) observamos en el pH del medio 2 picos los cuales nos indican que el pH del medio tiende a alcalinizarse durante el crecimiento de la cepa, por otro lado la concentración de glucosa disminuye de las 0 a las 8 hrs. posteriormente el consumo de la misma tiende a estabilizarse hasta alcanzar 0.94 g/l.

# **DISCUSIÓN**

## VIII .- DISCUSIÓN

### 8.1 ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS.

Las curvas de calibración utilizadas para la determinación de azúcares reductores libres, etanol y peso seco vs. densidad óptica son confiables para determinar la concentración de una muestra a partir de una absorbancia dada; debido a que se obtuvieron coeficientes de regresión de 0.99965, 0.99900 para 10 puntos y 0.99919 para 9 puntos respectivamente, según el cuadro No. 13 que muestra los coeficientes de regresión mínimos aceptables de acuerdo con el número de puntos probados para considerar un buen ajuste al modelo lineal con un 99 y 95 % de confianza, el coeficiente mínimo aceptable para estos puntos fué de 0.7079 para la determinación de azúcares reductores libres y peso seco vs. densidad óptica y 0.7348 para etanol, la ecuación encontrada para cada uno de estos casos representarán un 99% de confiabilidad para determinar la concentración a partir de un absorbancia dada. Por lo tanto se puede concluir que existe una buena correlación entre la concentración y la absorbancia para tales determinaciones.

### 8.2 ESTANDARIZACIÓN DE INÓCULO.

#### 8.2.1.- Medio sólido.

Ya que el objetivo principal del trabajo fue el incremento de biomasa era de primordial importancia conocer el tiempo óptimo en el cual las células alcanzaran la máxima densidad.

En la cinética de crecimiento de la cepa *Acetobacter aceti* (fig. No.9) Se determinó las 26 hrs. como el tiempo óptimo de crecimiento de la cepa en medio sólido sintético, dado que ha este tiempo llego al final del crecimiento exponencial por lo tanto es el momento en que se obtiene una buena densidad celular además de un estado fisiológico adecuado ya que su sistema enzimático se encuentra activo.

#### 8.2.2.- Medio líquido.

En la cinética de crecimiento de la cepa *Acetobacter aceti* en el primer pase

de propagación en medio líquido sintético durante 20 hrs. (fig. No. 10) se observó que a las 10 hrs. finaliza la fase logarítmica pues a partir de este momento se realizó el segundo pase de propagación. Determinando así que a las 10 hrs. de incubación es el tiempo que requiere esta cepa para alcanzar su máxima población, ya que a partir de este momento se realizó el segundo pase de propagación.

La fig. No. 11 muestra el crecimiento celular correspondiente al segundo pase de propagación en el que se observó que hasta las 12 hrs. la cepa aun seguía creciendo no habiéndose observado la fase estacionaria definiéndose tomar 12hrs. como el tiempo adecuado para el segundo pase de propagación tomando en cuenta que el cultivo presentaba una buena densidad celular así como también el pH adecuado para el crecimiento de la cepa. Para *Acetobacter aceti* el límite de pH inferior es de 4.0-4.5 ; el pH óptimo de 5.4-6.3 ; y el límite de pH superior es de 7.8-8.0. (Pelczar y col. 1982).

### **8.3 OPTIMIZACIÓN DE pH Y AGITACIÓN EMPLEANDO LA METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA (RSM).**

En base a trabajos realizados por (Laugrowrthy, 1978) y (Padan, 1976-1981); donde concluyen que los organismos procariotas primarios mantienen un equilibrio constante en el pH intracelular el cual el rol fisiológico es probablemente cuidar la estabilidad y actividad de las enzimas citoplasmáticas. Así como también ha sido reconocido que la producción oxidativa microbiana de ácido acético es un proceso altamente aeróbico (Hromatka y Ebner 1949; Mori y col. 1970; Greenshields y Smith 1974); puesto que el pH y la agitación son factores muy importantes y determinantes para lograr un buen incremento de biomasa, se decidió determinar mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM), los valores óptimos de estas dos variables con el fin de obtener altos incrementos de biomasa. Por otro lado, en otros experimentos realizados por Menzel y Gottschalk (1985). demostraron que *Acetobacter aceti* se adapta muy bien en un medio ambiente bastante ácido, sin embargo el crecimiento de la bacteria se detuvo cuando el pH del medio se excedió a un valor de 6.8. En cuanto a los efectos de la deficiencia de oxígeno se demostró que esta origina una baja producción de material celular. Tomando como base las referencias bibliográficas se definieron los rangos a probar para estas variables.

### 8.3.1.- Primer diseño factorial.

Como ya se mencionó en los antecedentes, una de las ventajas de la metodología de superficie de respuesta es que emplea un diseño factorial que relaciona un grupo de experimentos (combinación de valores inferiores, superiores y centrales del rango seleccionado), de todos los experimentos posibles lo cual reduce grandemente el número total de experimentos a realizar, para encontrar así los valores óptimos.

Los resultados obtenidos para las respuestas: incremento de biomasa g/l, velocidad de crecimiento  $h^{-1}$ , rendimiento y tiempo de duplicación  $h$ , para las variables de pH (5.0-7.0) y agitación (100-300 rpm) del primer diseño factorial (cuadro No. 3) al ser sometidos a un análisis de regresión múltiple (anexos No. 1,2,3 y 4) se obtuvieron coeficientes de regresión de 0.5590714, 0.4145798, 0.6217586 Y 0.5948326 respectivamente lo cual demuestran falta de ajuste a un modelo lineal confirmandose esto con el análisis de varianza realizado donde la F calculada fue menor que la F tablas con lo cual se acepta la hipótesis nula de que no hay un ajuste al modelo lineal, lo cual demostró que estábamos en una región cercana al óptimo donde existe curvatura.

### 8.4 SEGUNDO DISEÑO FACTORIAL.

En base a los resultados en el primer diseño factorial se decidió realizar un segundo diseño factorial incluyendo los términos rotables (cuadro No. 2) para hacer el ajuste a un modelo de segundo orden, la región explorada se amplió de 4.58 a 7.40 para pH inicial y para agitación de 60 a 340 (rpm), con el objetivo de localizar la zona óptima.

El análisis de regresión múltiple de los resultados mostraron un ajuste al modelo polinomial de segundo orden (anexos 5, 6, 7, 8 y 9) con un coeficiente de regresión de **0.8332192** para el incremento de biomasa, **0.8338047** para la velocidad de crecimiento, **0.8710991** para rendimiento y **0.9455777** para el tiempo de duplicación, con lo cual se pudo observar que existía un ajuste al modelo de segundo orden para las cuatro respuestas lo cual indicó que nos encontrábamos en la región de los valores óptimos.

En las fig. No. 28 se puede observar la gráfica tridimensional de la superficie de respuesta obtenida para el incremento de biomasa donde se puede apreciar una meseta invertida que corresponde a un punto de respuesta mínima, en la fig. No. 29 podemos observar los contornos de esta superficie donde se puede apreciar que a un pH inicial de 4.5 y una agitación de 100 (rpm) se obtienen los valores más bajos para el incremento de biomasa; sin

embargo a un pH inicial de 5.5 y una agitación de 700 (rpm) se obtiene el valor más alto para el incremento de biomasa, ejerciendo en esta zona la variable de agitación, la mayor influencia, ya que si mantenemos constante el valor del pH inicial ejem: 4.5 y aumentamos las agitaciones (600 rpm) se observa claramente un incremento de biomasa. Ha sido largamente reconocido que las bacterias ácido acéticas son aerobias estrictas, desde entonces los procesos sumergidos de fermentación acética eran desarrollados para la producción de vinagre por Horomatka y col. (1949-1951). Park y col. (1989) realizaron un cultivo continuo con recirculación de células para la producción de ácido acético por *Acetobacter aceti* M23 utilizando un fermentador equipado con un modulo de filtro de fibras huecas. El cultivo duro 830 h con varias velocidades de dilución, la cual fue cambiada gradualmente de lenta a alta. Las células de *Acetobacter aceti* fueron cultivadas en un fermentador con un volumen de capacidad de 600 mL (Marubish MD 250), el cual fue operado a una velocidad constante de 900 rpm y una velocidad de aeración de 0.1 vvm. La temperatura del cultivo se mantuvo a 30° C. La concentración celular final fue de 21.9 g peso seco/L y la máxima productividad de ácido acético fue de 17.7 g/L.h para una concentración de ácido acético de 50 g/L. Definiendo que el uso del aire rico en oxígeno es indispensable para establecer una alta productividad de ácido acético.

En la fig. No. 30 se puede observar la gráfica tridimensional de la superficie de respuesta obtenida para la velocidad de crecimiento donde se puede apreciar una meseta invertida que corresponde a un punto de respuesta mínima, en la fig. No. 31 podemos observar los contornos de esta superficie donde se puede apreciar que a un pH inicial de 4.0 y una agitación de 60 (rpm) se obtiene las menor velocidad de crecimiento; sin embargo con un pH inicial de 4.5 y una agitación de 400 (rpm) se obtiene la mayor velocidad de crecimiento, ejerciendo nuevamente la variable de agitación la mayor influencia en la respuesta ejem: si mantenemos constante el valor de la variable X1 (pH inicial 4.0) y aumentamos el valor de la variable X2 (400 rpm) se obtienen mayor velocidad de crecimiento.

En la fig. No. 32 se puede observar la gráfica tridimensional de la superficie de respuesta obtenida para el rendimiento donde se puede apreciar la forma de una silla de montar que corresponde a un punto silla, en la fig. No. 33 podemos observar los contornos de esta superficie donde se puede apreciar que a un pH inicial de 6.5 y una agitación de 400 (rpm) obtenemos la más baja eficiencia del rendimiento; sin embargo con un pH inicial de 4.5 y una agitación de 800 (rpm) se obtiene el más alto rendimiento, en donde ambas variables ejercen igual influencia, ejem: si aumentamos tanto la variable X1

(pH inicial de 7.0 a 8.5) como la variable X2 (100 a 250 rpm) observamos que el rendimiento es mayor.

En la fig. No 34 se puede observar la gráfica tridimensional de la superficie de respuesta obtenida para el tiempo de duplicación donde se puede apreciar la forma de una silla de montar que corresponde a un punto silla, en la Fig. No. 35 podemos observar los contornos de esta superficie donde se puede apreciar que a un pH inicial de 6.6 y una agitación de 250 (rpm) obtenemos la más baja eficiencia del tiempo de duplicación; sin embargo con un pH inicial de 4.5 y un agitación de 400 (rpm) se obtienen la más alta eficiencia para el tiempo de duplicación ejerciendo nuevamente ambas variables igual influencia, ejem: si mantenemos constante el valor del pH inicial 4.5 y el valor de las agitaciones 380 rpm., obtenemos el menor tiempo de duplicación.

Así mismo a partir de estas figuras, se puede observar que la variable X2 (agitación) es la que tiene mayor influencia en cada una de las respuestas analizadas, ya que si mantenemos fijo el pH inicial y vamos variando las agitaciones (rpm) vamos cayendo en diferentes zonas para el incremento de biomasa. En caso contrario, si mantenemos fija las agitaciones (rpm) y vamos variando el pH inicial podemos apreciar que prácticamente estaremos siempre en una misma zona para cada una de las respuestas analizadas. Aunque ambas variables tienen un efecto muy importante para cada una de estas.

Las gráficas para cada una de la respuestas son muy útiles para poder visualizar el efecto que tendrán las variables sobre las respuestas así como para determinar en que zona de las respuestas nos encontramos con diferentes valores para las variables probadas.

## **8.5 VALIDACIÓN DE LAS ECUACIONES FINALES OBTENIDAS PARA EL INCREMENTO DE BIOMASA, VELOCIDAD DE CRECIMIENTO, RENDIMIENTO Y TIEMPO DE DUPLICACIÓN.**

Las ecuaciones finales obtenidas en la regresión múltiple para el segundo diseño factorial para cada una de las respuestas analizadas representa el modelo matemático con el cual se puede predecir las respuestas que se alcanzan según los valores asignados para las variables X1 y X2.

Se probó este modelo eligiendo los valores de 7.7, 4.5 y 5.0 para el pH inicial y 130 y 400 (rpm) para agitación ya que tanto nuestra ecuación al igual que los contornos de superficie de respuesta obtenida indicaban que dentro de estos rangos se encontraban las mas altas respuestas. En los cuadros No. 9,10,11 y 12 podemos observar los valores predichos de los experimentos No.

12, 13 y 14 contra los valores alcanzados experimentalmente donde podemos apreciar que obtuvimos un porcentaje de error muy grande para cada una de las respuestas esto pudo haber sido debido a la degeneración de la cepa *Acetobacter*, pues se observó que repitiendo incluso algunos de los experimentos del diseño las respuestas fueron menores y el crecimiento incluso en cajas de Petri había disminuido. La bibliografía (Carr J., 1968 citado por Bar y col. 1987) reporta que la bacteria *Acetobacter aceti* tiene una frecuencia muy alta de mutación lo que podría explicar el hecho de que los resultados fueron mucho más bajos que los predichos por las ecuaciones y por lo tanto alto el porcentaje de error, ya que la metodología de superficie de respuesta ha sido empleada exitosamente en numerosos trabajos (fuentes: Rodríguez Buenfil y col. 1993a., 1993b.; 1995) donde se ha comprobado su eficiencia habiéndose obtenido ecuaciones con porcentajes de error inferiores al 10%. En base a esto sería recomendable adquirir nuevamente una cepa original de *Acetobacter aceti* y realizar nuevamente una validación de las ecuaciones.

Aunque no se obtuvieron los valores experimentales deseados estos ponen de manifiesto que el análisis de resultados mediante la metodología de superficie de respuesta es efectiva (siempre y cuando se tengan consideraciones biológicas que el modelo no interpreta).

Sin embargo, la aplicación estricta de estos modelos matemáticos en un contexto industrial no es posible, ya que al hacer el escalamineto como lo demostró (Fuentes O., 1990), aumenta el porcentaje de error; sin embargo los valores óptimos encontrados sirven como un marco de referencia para una optimización final con el método de evolución operativa, con el cual lo que se logra es un ajuste fino sin cambiar drásticamente los valores de producción y con muy pocos experimentos, lo cual es fundamental, ya que en una planta industrial no se puede detener la producción para hacer muchas pruebas experimentales pues esto significaría una pérdida considerable en las ganancias.

Se realizaron dos experimentos comparativos No. 15 y 16 (fig. No. 26 y 27) con el objeto de conocer la reacción de la cepa ante la concentración de la glucosa del medio de cultivo tanto en sólido (3 g/l para ambos experimentos) como en líquido 10 g/l para el exp. No. 15 y 2 g/l para el exp. No. 16 en cual obtuvimos el mas alto incremento de biomasa del total de los experimentos realizados obteniéndose 1.34 g/l de peso seco experimental donde pudimos constatar que es posible la disminución de la concentración de glucosa en el medio a 2g/l en base al artículo publicado por (Nazir y col. 1970) sobre los requerimientos nutricionales de la bacteria del vinagre en el que se reporta que se obtuvieron óptimos resultados empleando el 2% de glucosa.

# **CONCLUSIONES**

## IX.- CONCLUSIONES

1.- Las curvas de calibración empleadas para la determinación de etanol, azúcares reductores libres y peso seco son confiables en un 95 y 99% respectivamente y por lo tanto pueden ser utilizadas para predecir la concentración a partir de una absorbancia.

2.- El tiempo óptimo de crecimiento en medio sólido sintético para la cepa *Acetobacter aceti* ssp. *Licuefacians* fue de 26 hrs.

3.- El tiempo óptimo de crecimiento en medio líquido sintético para la cepa *Acetobacter aceti* ssp. *Licuefacians* fue de 10 hrs. tanto para el primero como para el segundo pase de propagación.

4.- Mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM) se encontró que el pH inicial y agitación (rpm) para el incremento de biomasa, velocidad de crecimiento, rendimiento y tiempo de duplicación son de 4.5 y 400 a 700 rpm.

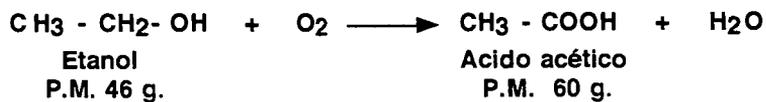
5.- La variable que tuvo mayor influencia sobre las respuestas analizadas fue la agitación.

6.- Los modelos matemáticos obtenidos no contemplan fenómenos biológicos como lo es la inhibición de crecimiento de la cepa *Acetobacter aceti* ssp. *Licuefacians* o la degeneración genética de la misma por lo que es necesario para interpretarlos tomar en cuenta este tipo de consideraciones.

7.- Es posible la disminución de la glucosa en el medio a 3 g/l ya que a esta concentración se obtuvo un mejor crecimiento de la cepa.

# FIGURAS

La oxidación de alcohol a ácido acético es una reacción aeróbica que efectúan las bacterias acéticas.



$$Y_{p/s} = 60/46 = 1.3$$

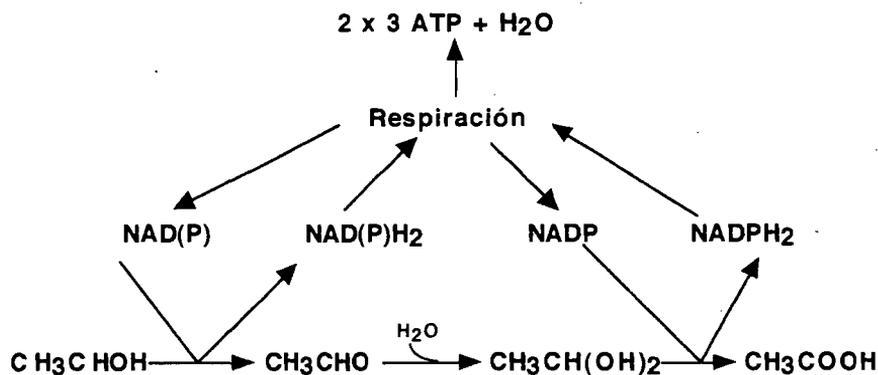


Fig. No. 1 Síntesis de la oxidación de etanol a ácido acético.

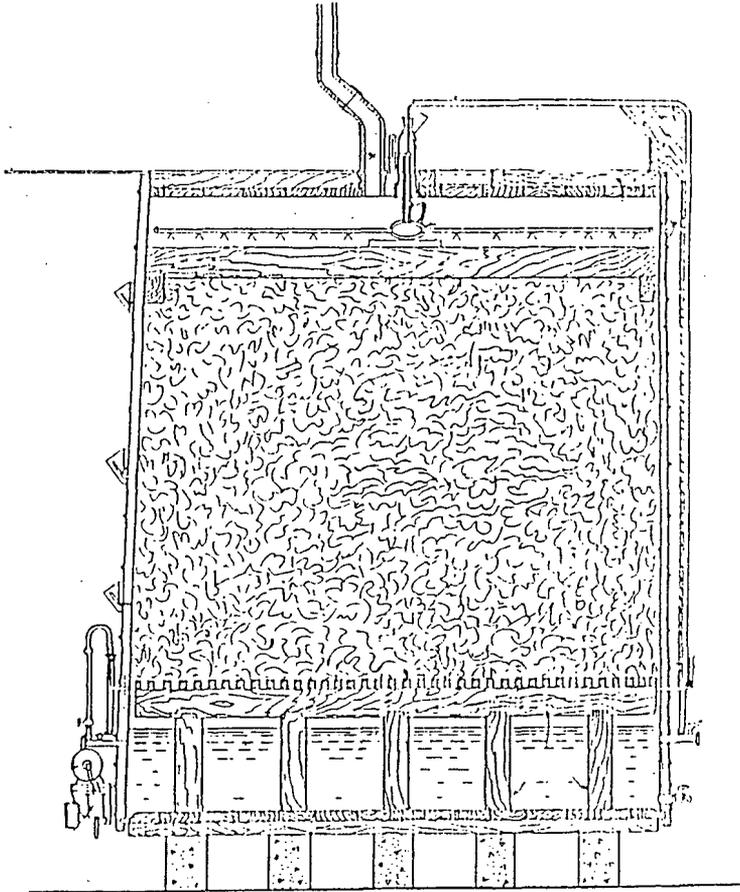


Fig. No. 2 Generador de Frings.

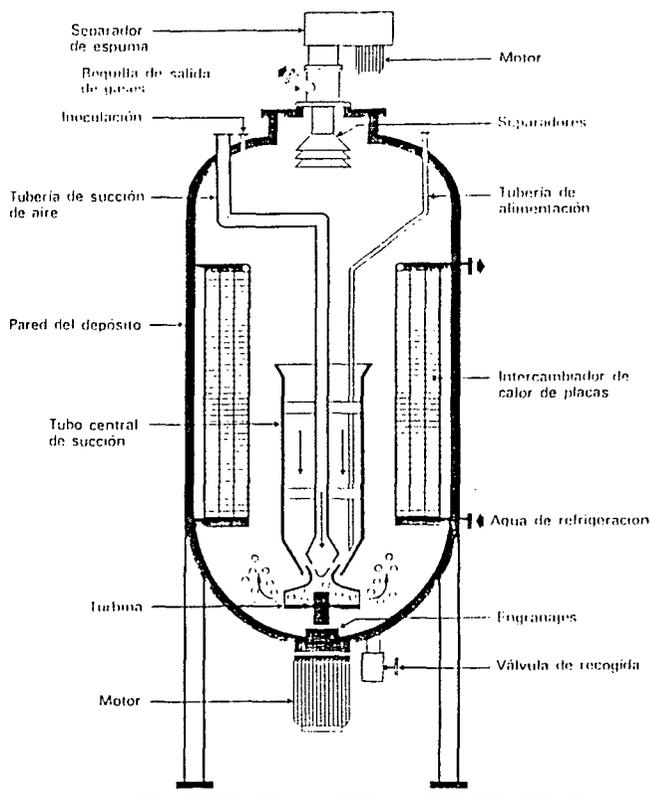


Fig. No. 3 Fermentación oxidativa sumergida (acetador de Frings).

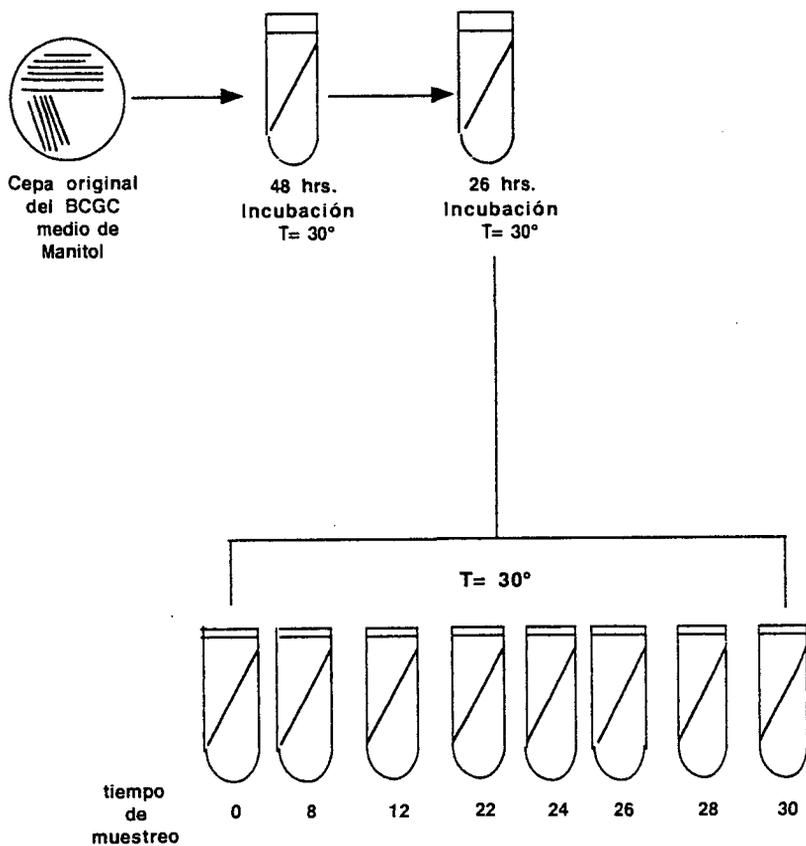


Fig. No. 4 Esquema experimental de la cinética medio sólido sintético.

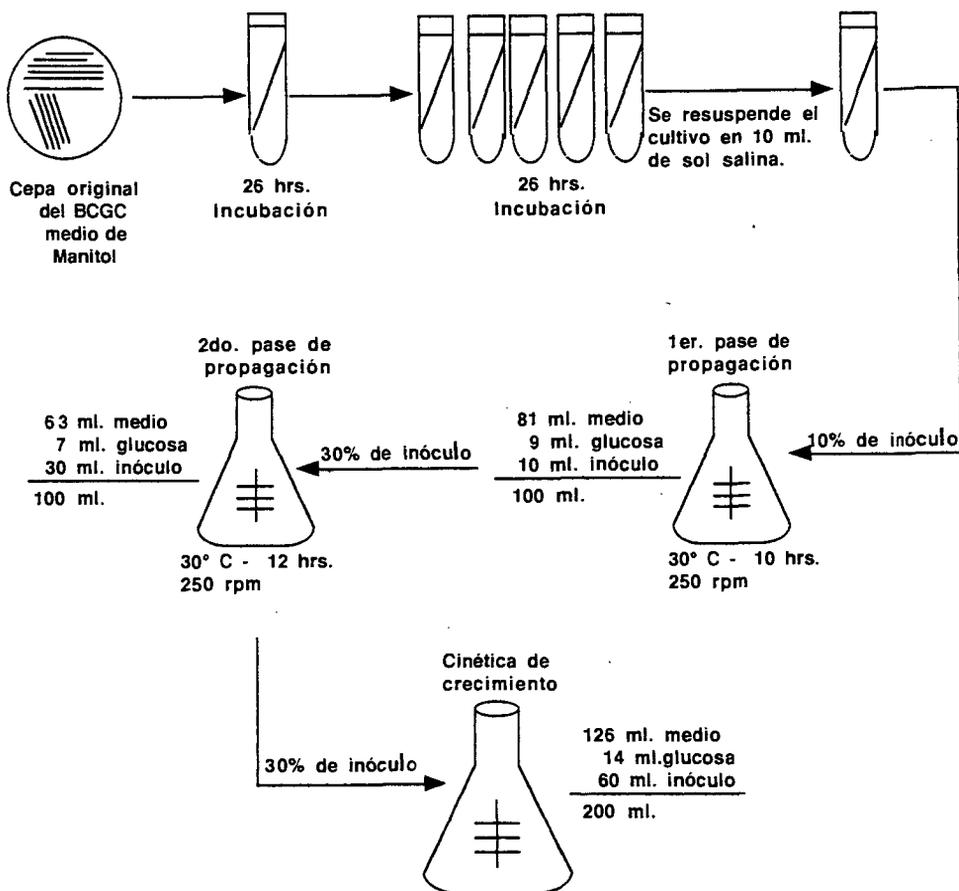


Fig. No. 5 Esquema experimental de la cinética.

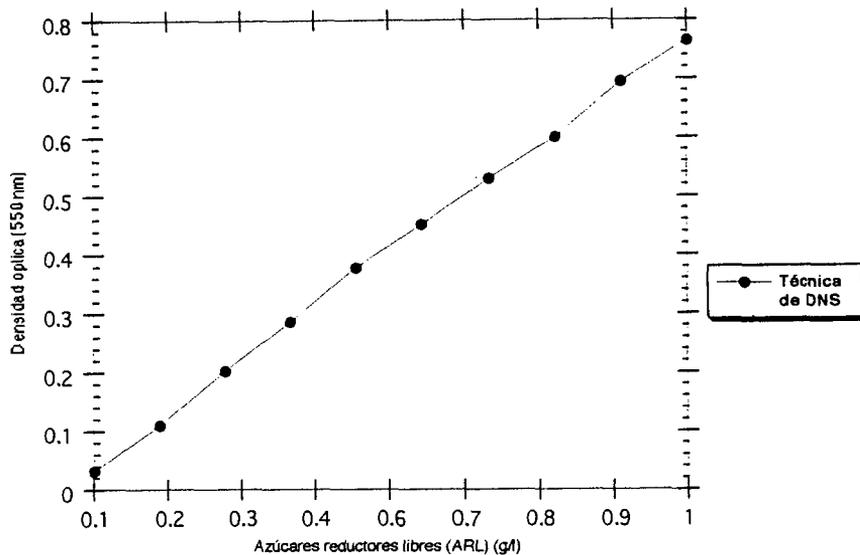


Fig. No. 6 Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores libres.

$$\text{Ecuación: } Y = 4.386667 \text{ E-02} + 0.8161212 (x)$$

Coeficiente de correlación= 0.99965

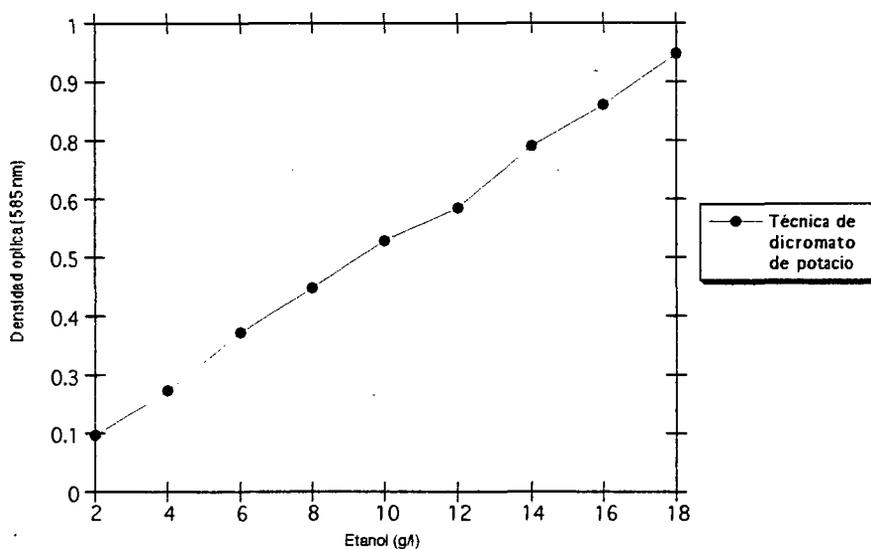


Fig. No. 7 Curva de calibración para la determinación de etanol por la técnica de dicromato de potasio.

$$\text{Ecuación: } Y = 1.555455 \text{ E-02} + 5.111061 (X)$$

Coefficiente de correlación= 0.99919

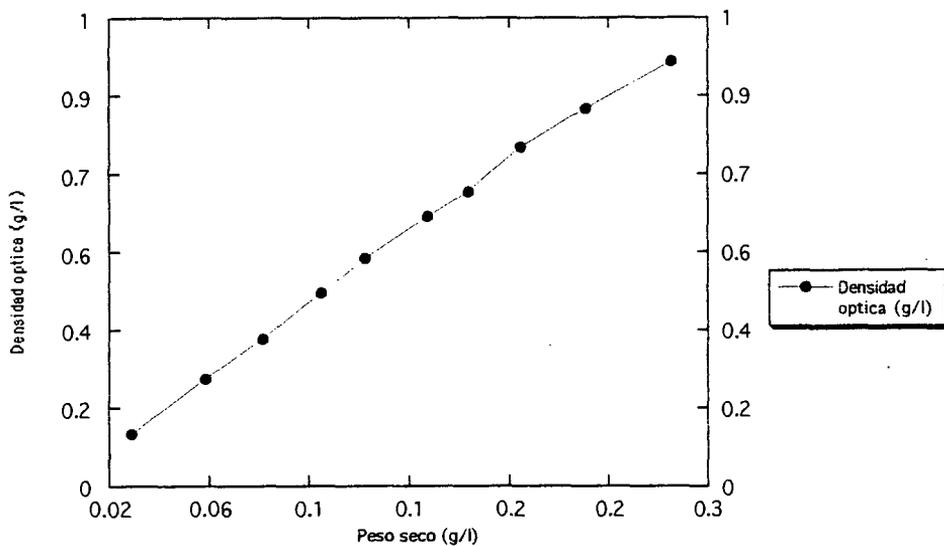


Fig. No. 8 Curva de calibración para la determinación de densidad óptica vs. peso seco.

$$\text{Ecuación: } Y = 9.1061 \text{ E-}03 + 4.323406 (X)$$

Coeficiente de correlación= 0.99900

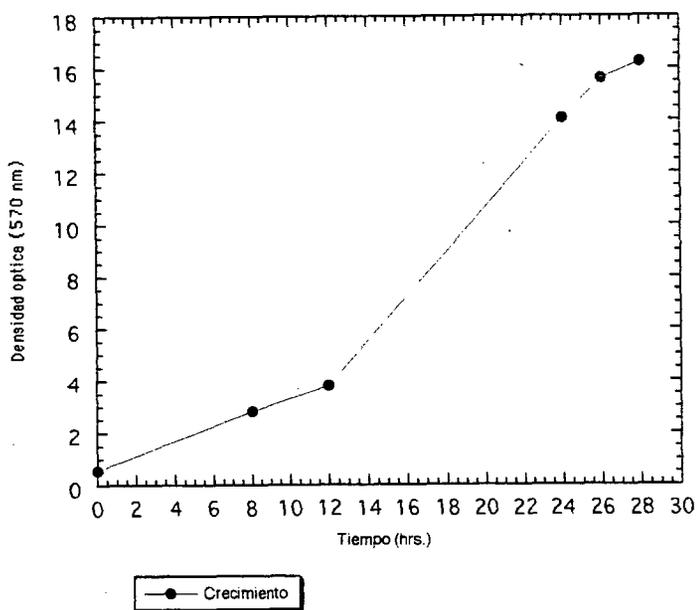


Fig. No. 9 Curva de crecimiento de la cepa *Acetobacter aceti* en medio sólido sintético, durante 28 hrs.

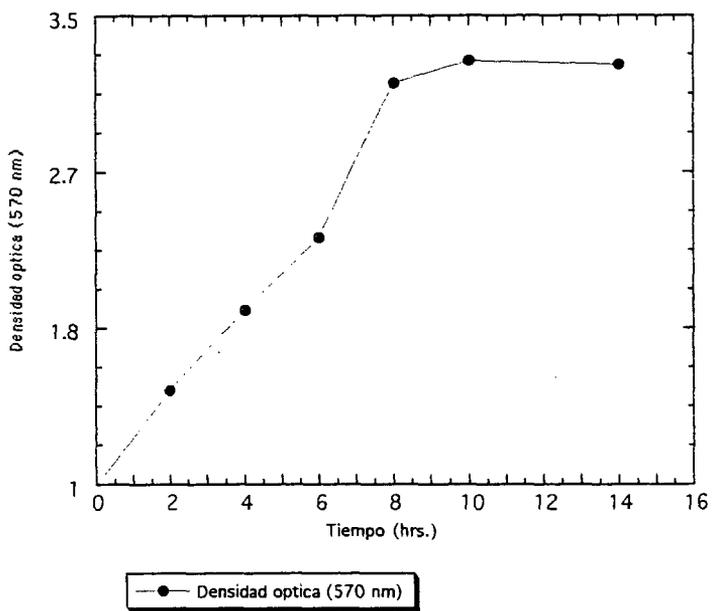


Fig. No. 10 Curva de crecimiento de la cepa *Acetobacter aceti* en medio líquido sintético, primer pase de propagación durante 14 hrs.

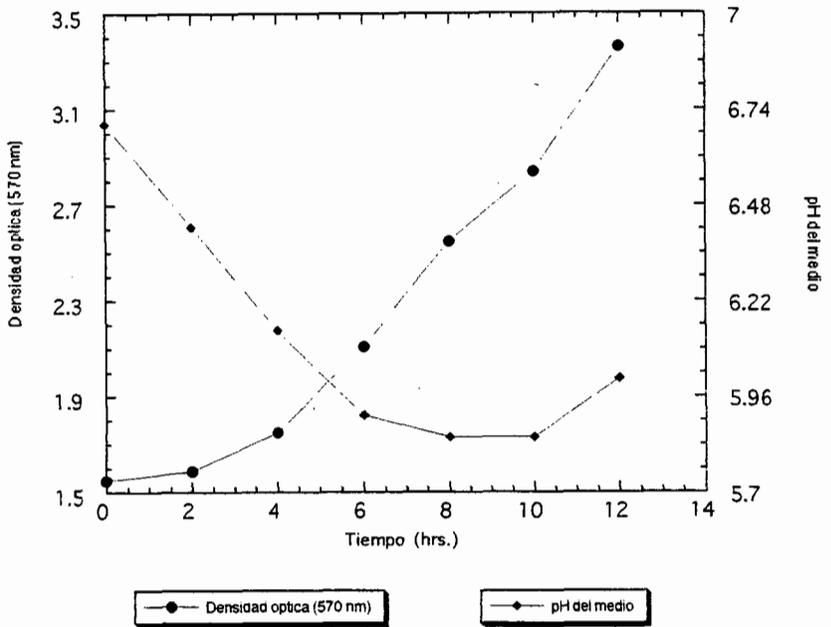


Fig. No. 11 Curva de crecimiento de la cepa *Acetobacter aceti* en medio líquido sintético segundo pase de propagación, durante 12 hrs.

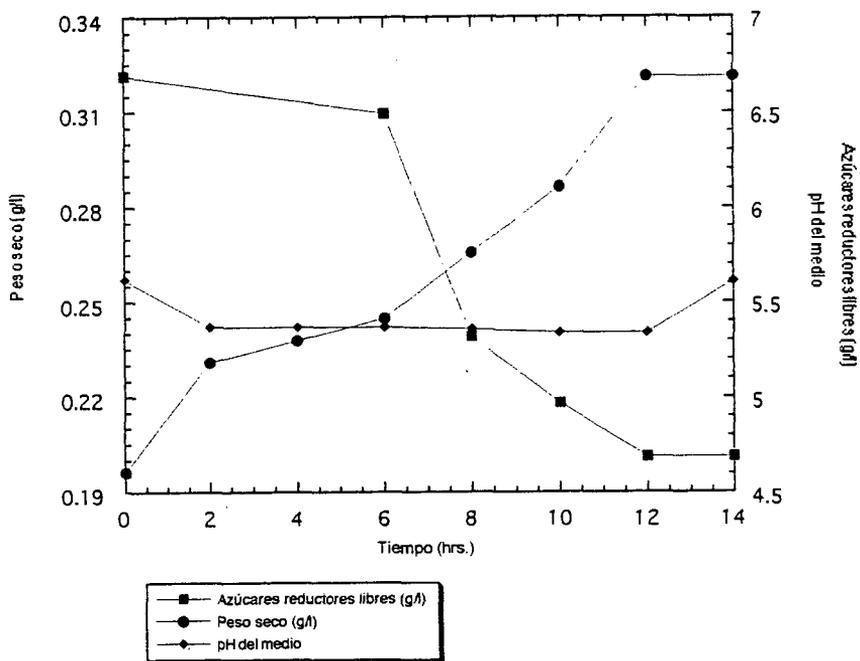


Fig. No. 12 Cinética de crecimiento de *Acetobacter aceti* (exp. No. 1).

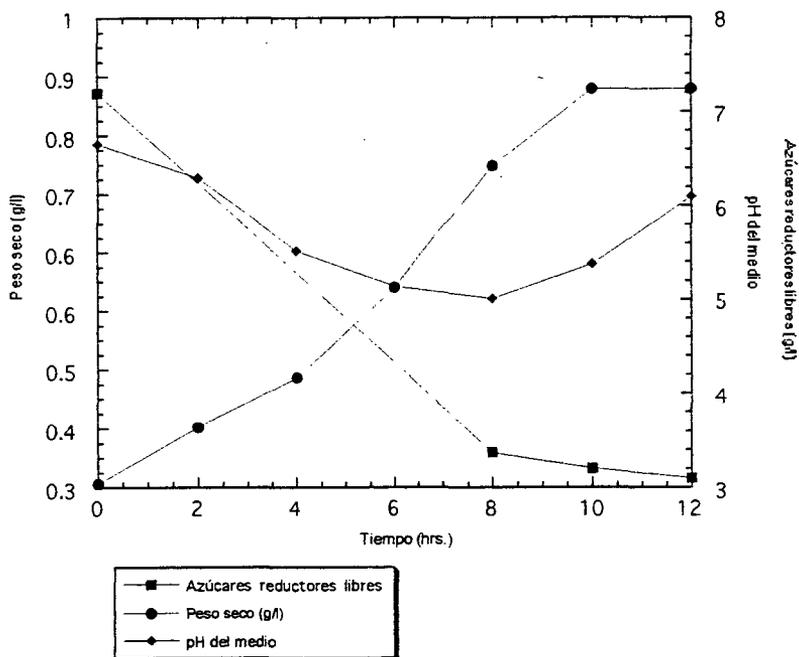


Fig. No. 13 Cinética de crecimiento de la cepa *Acetobacter aceti* (exp. No. 2).

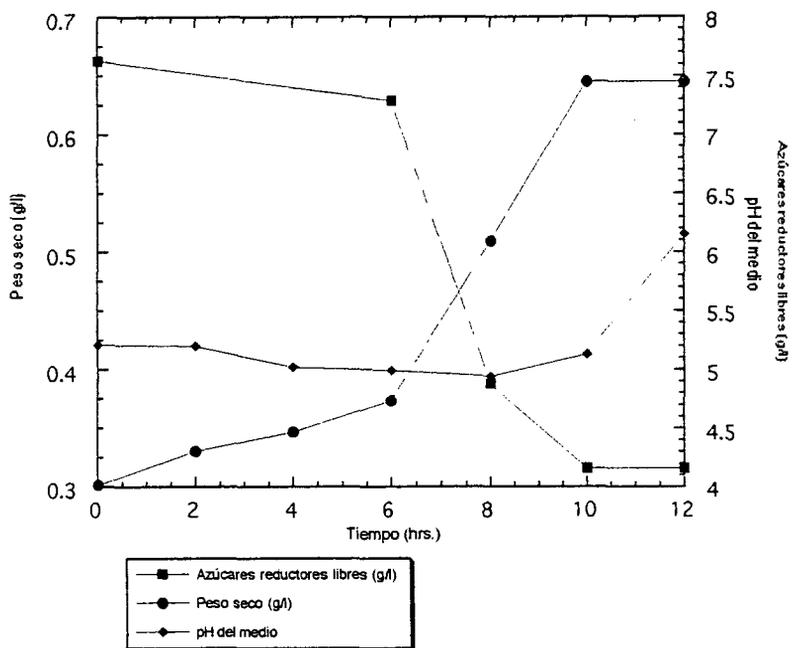


Fig. No. 14 Cinética de crecimiento de la cepa *Acetobacter aceti* (exp. No. 3).

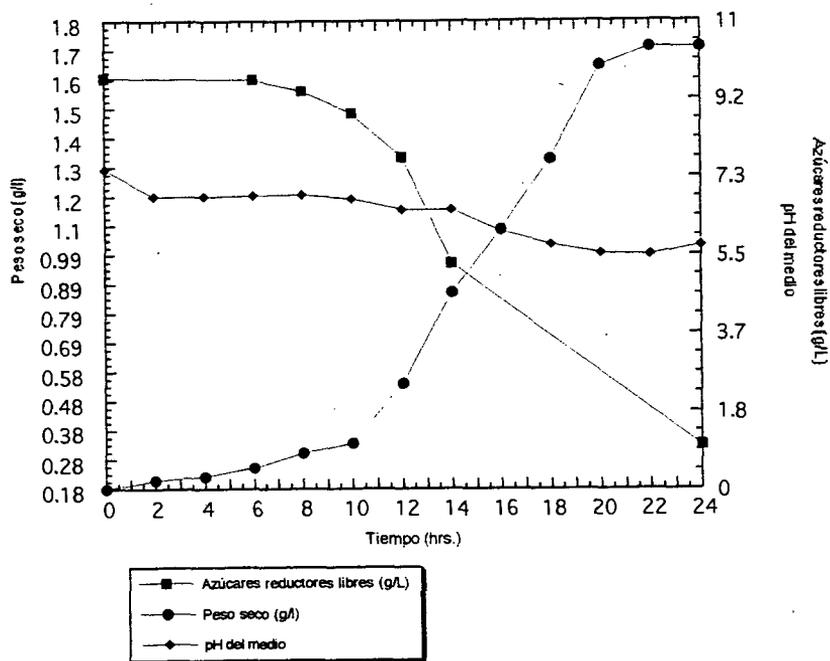


Fig. No. 15 Cinética de crecimiento de la cepa *Acetobacter aceti* (exp. No. 4).

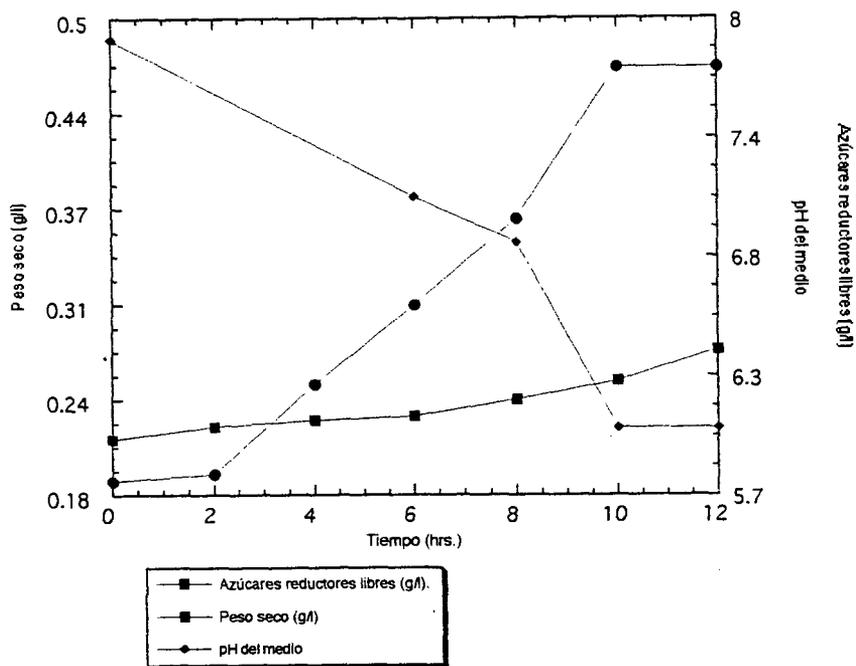


Fig. No. 16 Cinética de crecimiento de la cepa *Acetobacter aceti* (exp. No. 5).

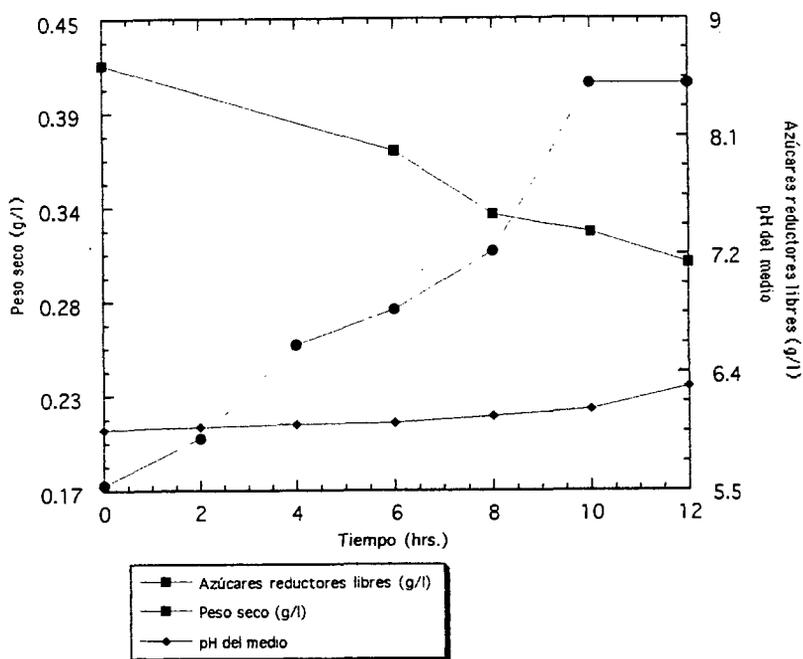


Fig. No. 17 Cinética de crecimiento de la cepa *Acetobacter aceti* (exp. No. 6).

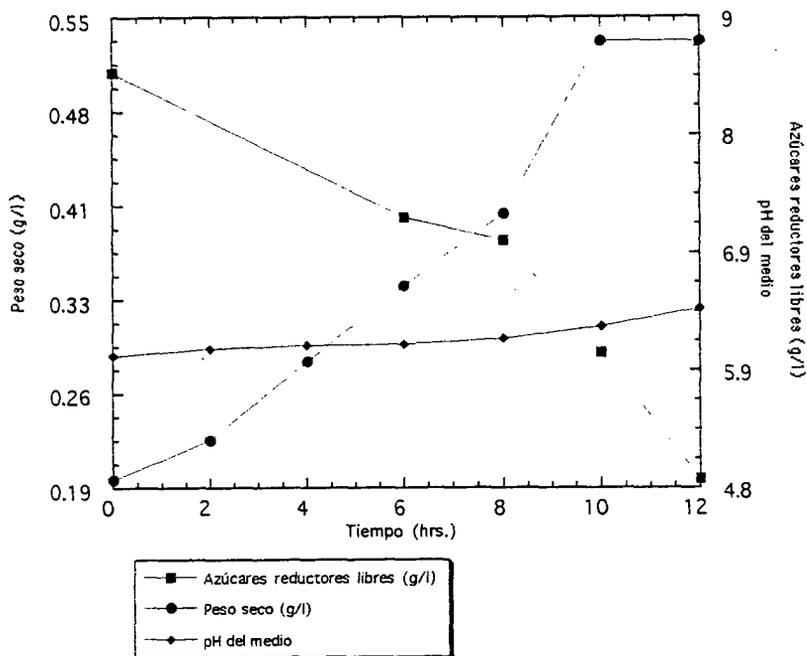


Fig. No. 18 Cinética de crecimiento de la cepa *Acetobacter aceti* (exp. No. 7).

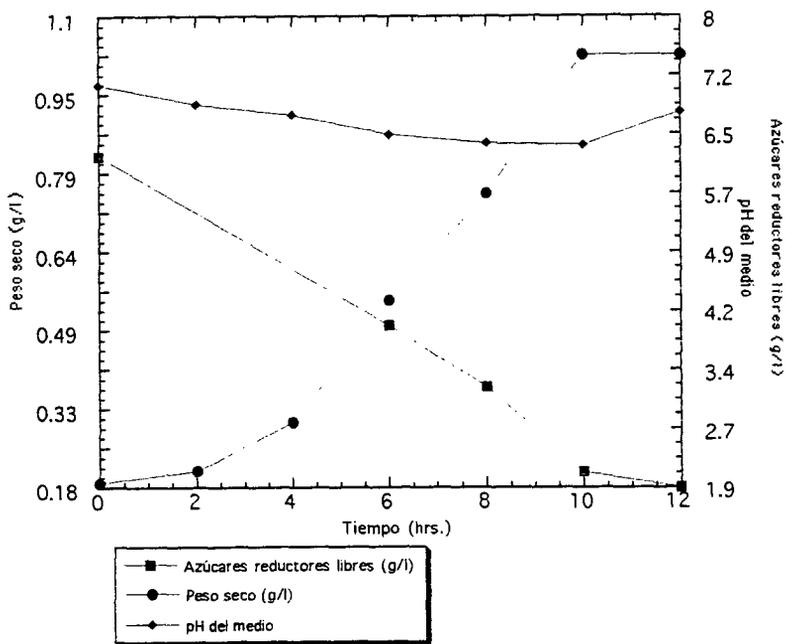


Fig. No. 19 Cinética de crecimiento de la cepa *Acetobacter aceti* (exp. No. 8).

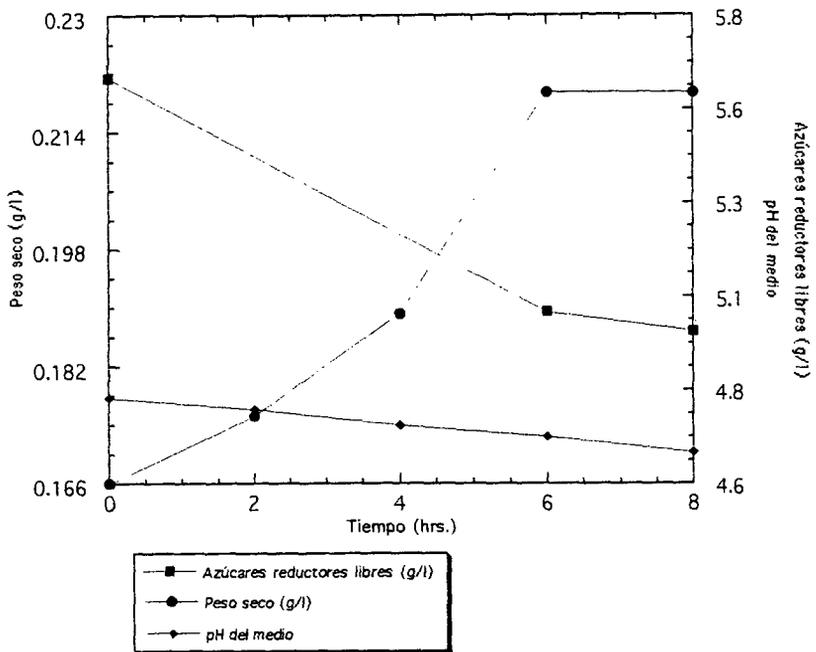


Fig. No. 20 Cinética de crecimiento de la cepa *Acetobacter acetii* (exp. No. 9).

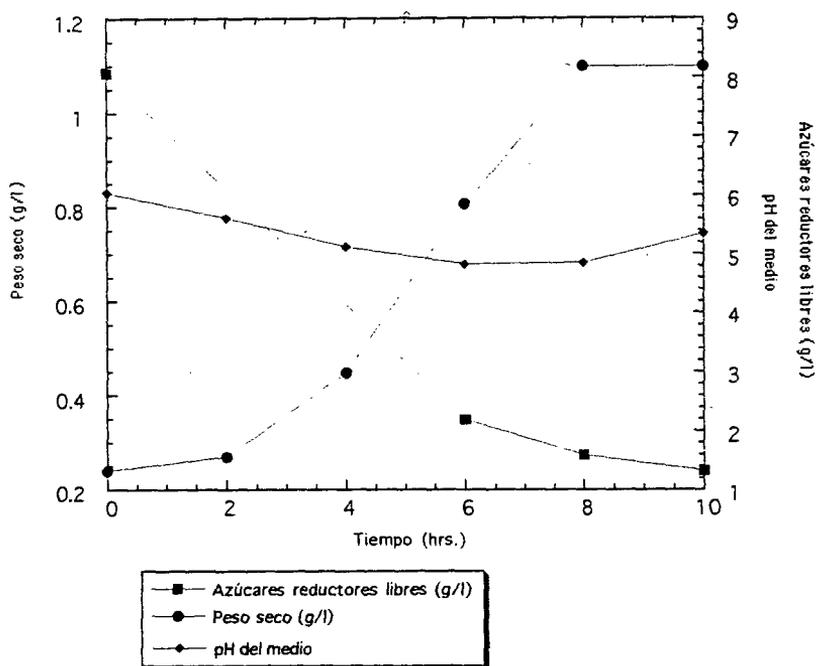


Fig. No. 21 Cinética de crecimiento de la cepa *Acetobacter aceti* (exp. No. 10).

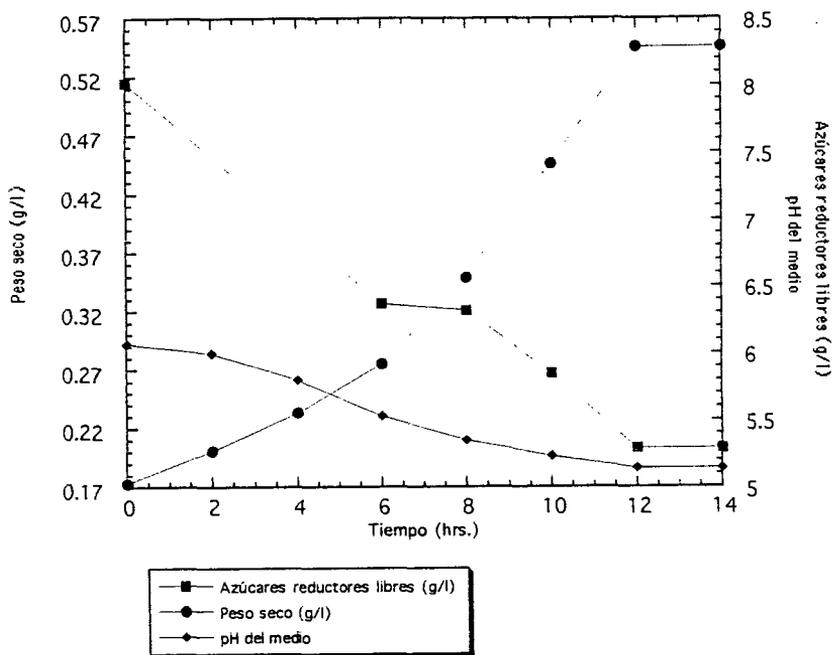


Fig. No. 22 Cinética de crecimiento de la cepa *Acetobacter aceti* (exp. No. 11).

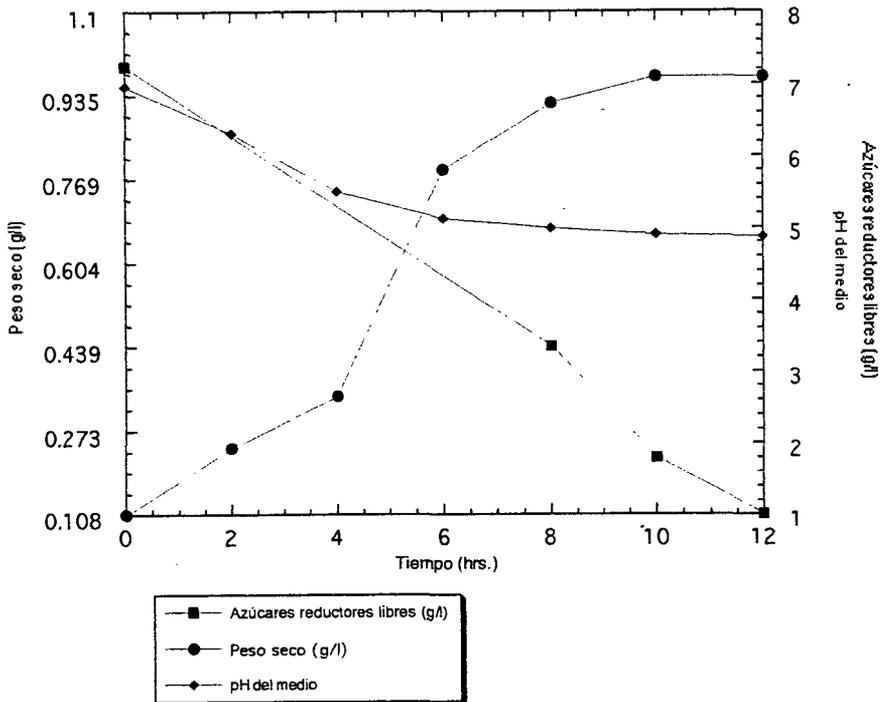


Fig. No. 23 Cinética de crecimiento de la cepa *Acetobacter aceti* (exp. No. 12).

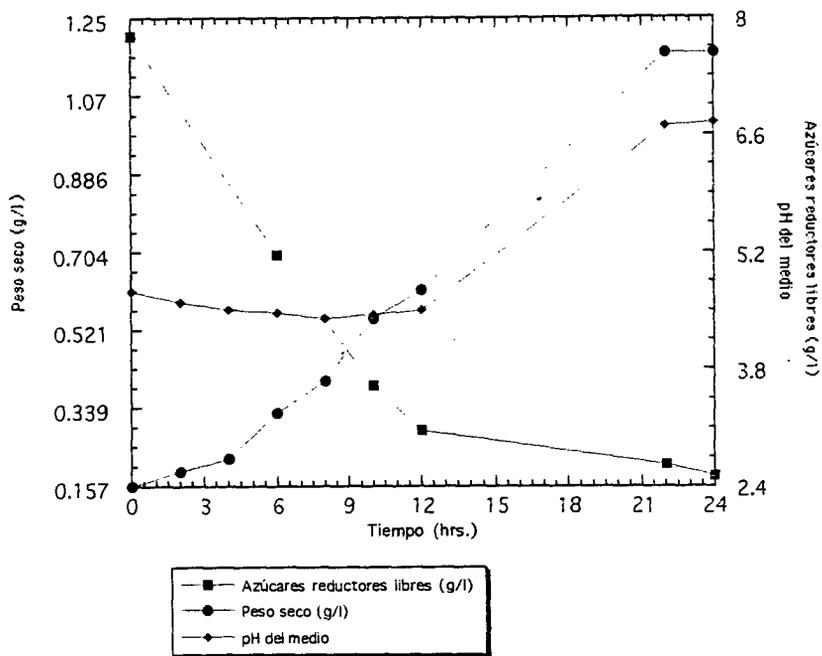


Fig. No. 24 Cinética de crecimiento de la cepa *Acetobacter aceti* (exp. No. 13).

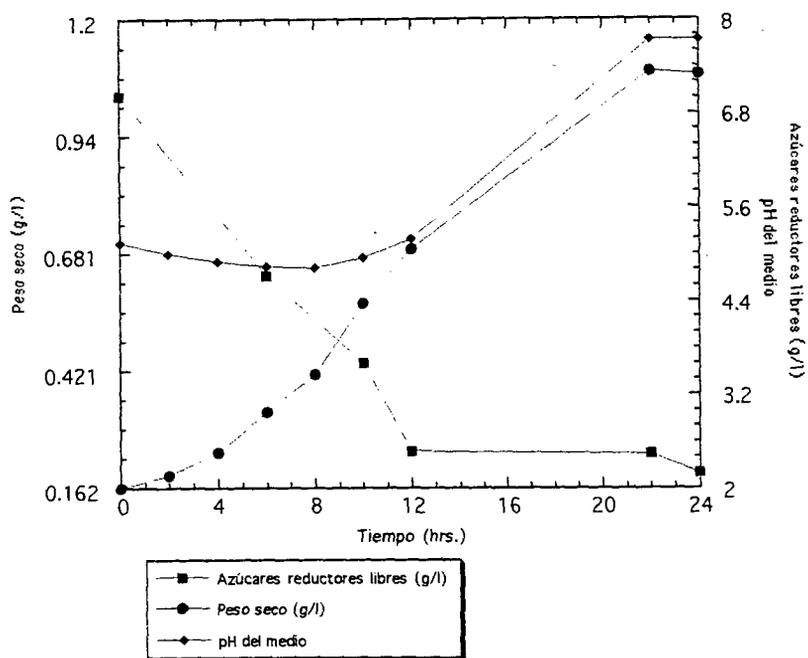


Fig. No. 25 Cinética de crecimiento de la cepa *Acetobacter aceti* (exp.No. 14).

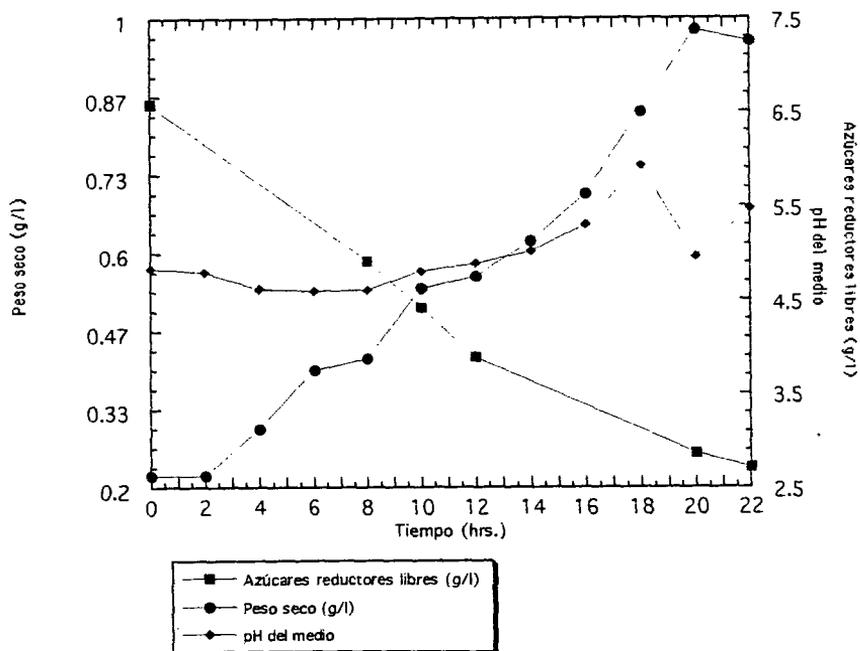


Fig. No. 26 Cinética de crecimiento de *Acetobacter acetii*. (exp. No. 15).

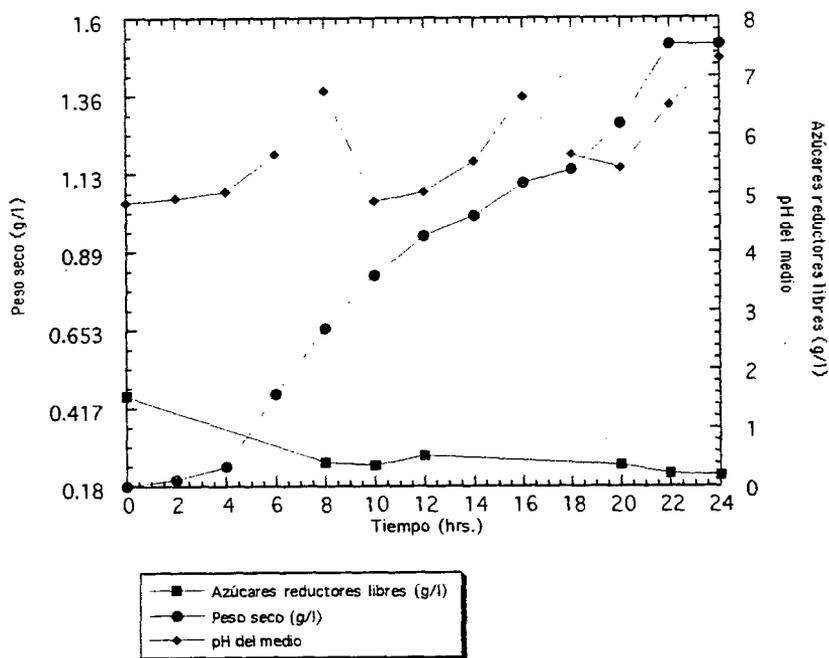


Fig. No. 27 Cinética de crecimiento de la cepa *Acetobacter aceti* (exp. No. 16).

## Plot of BIOMASA

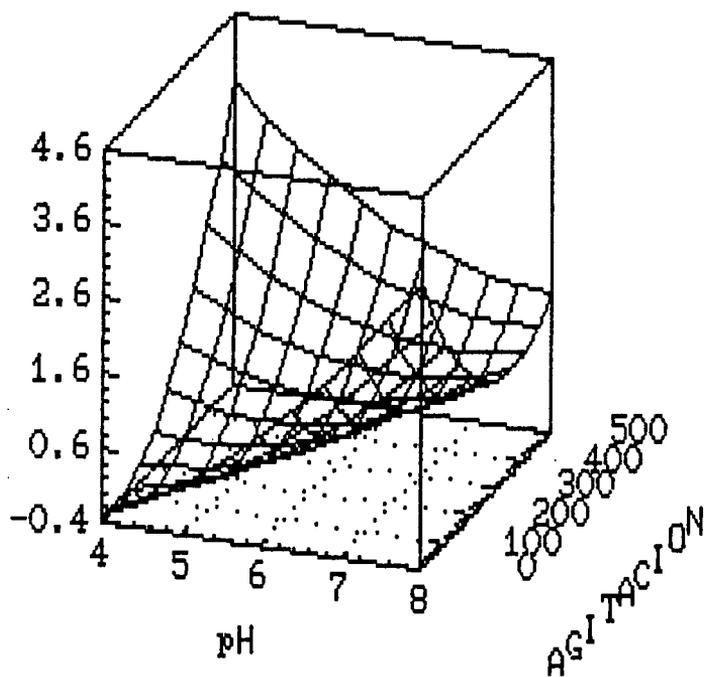


Fig. No. 28 Superficie de respuesta del incremento de biomasa

## Plot of BIOMASA

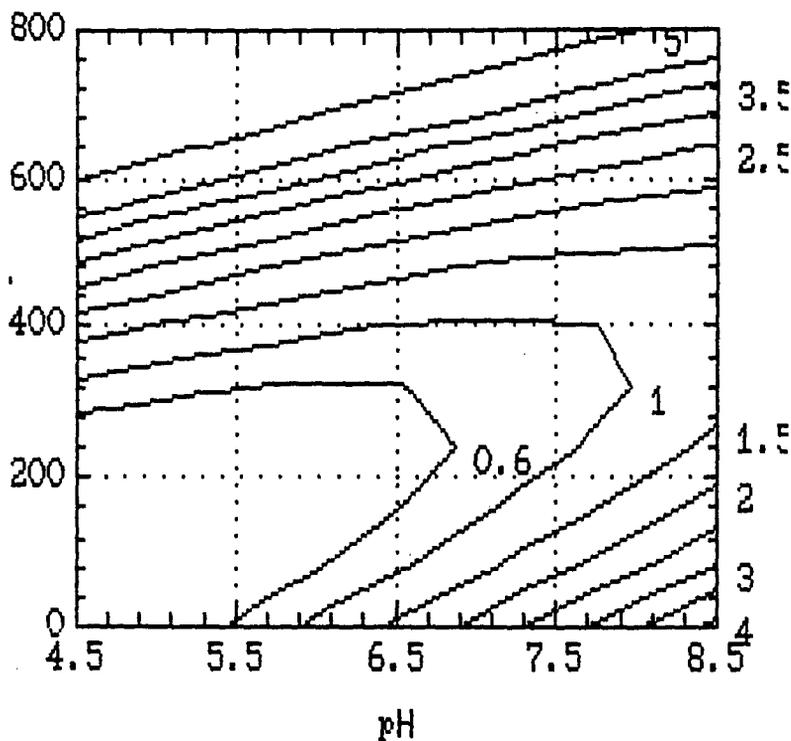


Fig. No. 29 Gráfica de contornos de la superficie de respuesta para el incremento de biomasa.

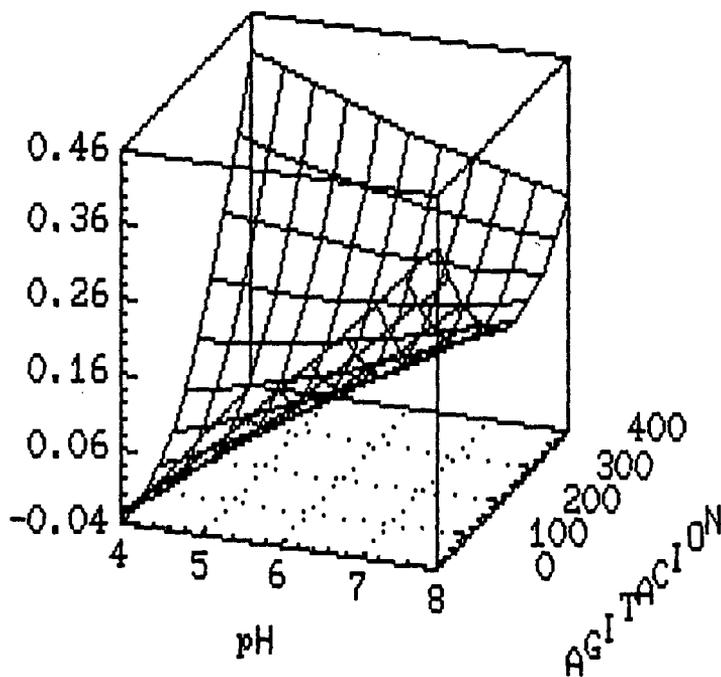
Plot of  $\mu$ 

Fig.No. 30 Superficie de respuesta para la velocidad de crecimiento.

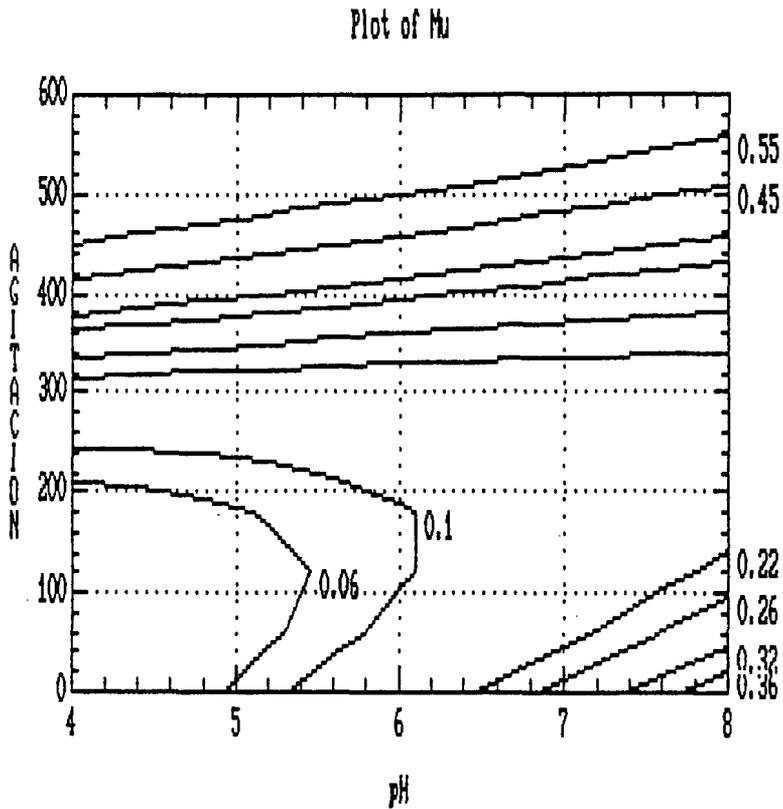


Fig. No. 31 Gráfica de contornos de la superficie de respuesta para la velocidad de crecimiento.

Plot of Yxs

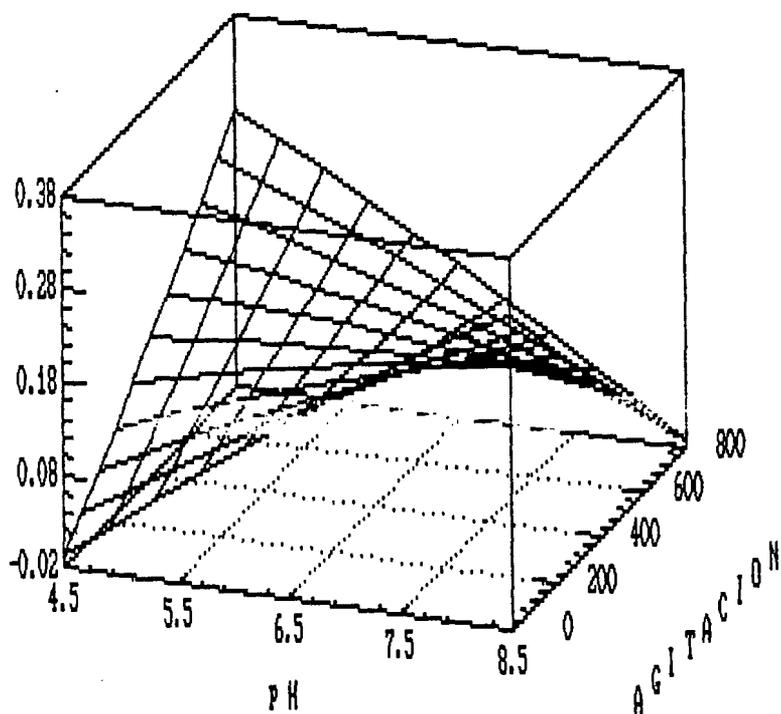


Fig. No. 32 Superficie de respuesta para el rendimiento.

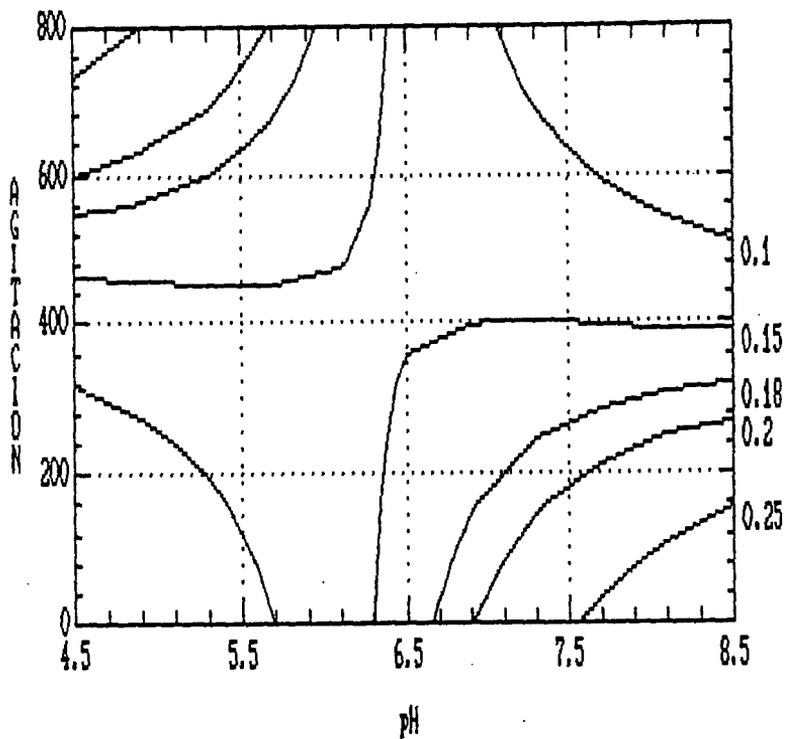
Plot of  $Y_{xs}$ 

Fig. No. 33 Gráfica de contornos de superficie de respuesta para el rendimiento.

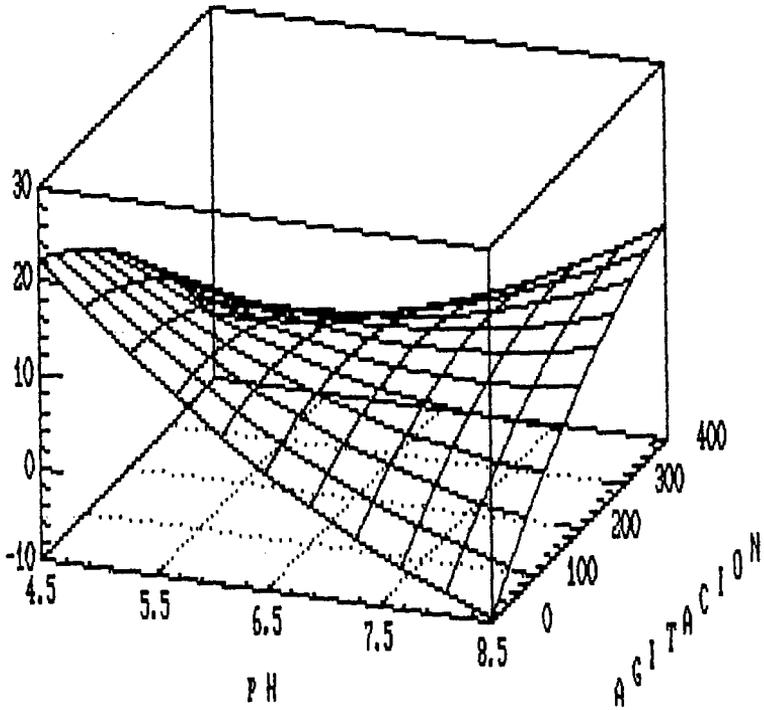
Plot of  $T_d$ 

Fig. No. 34 Superficie de respuesta para el tiempo de duplicación.

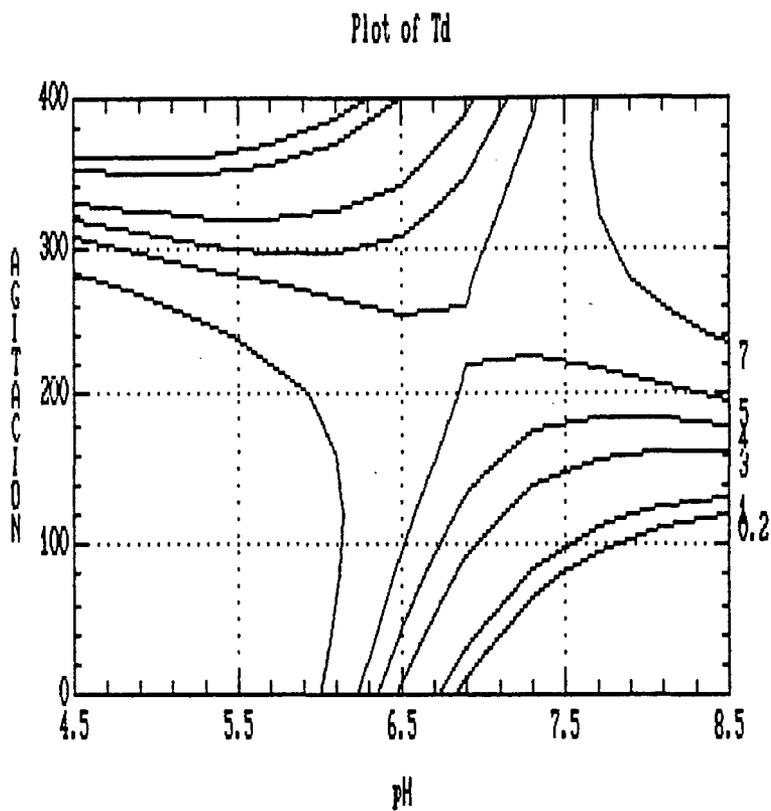


Fig. No. 35 Gráfica de contornos de superficie de respuesta para el tiempo de duplicación.

# **CUADROS**

Cuadro No. 1 Primer diseño factorial.

NUMERO DE EXPERIMENTOS	VARIABLES CODIFICADAS		VARIABLES SIN CODIFICAR	
	X1	X2	pH	AGITACION
1	-	-	5.0	100
2	+	+	7.0	300
3	-	+	5.0	300
4	+	-	7.0	100
5	0	0	6.0	200
6	0	0	6.0	200
7	0	0	6.0	200

Cuadro No. 2 Segundo diseño experimental.

NUMERO DE EXPERIMENTOS	VARIABLES CODIFICADAS		VARIABLES SIN CODIFICAR	
	X1	X2	pH	AGITACION
8	$+\sqrt{2}$	0	7.40	200
9	$-\sqrt{2}$	0	4.58	200
10	0	$+\sqrt{2}$	6.0	340
11	0	$-\sqrt{2}$	7.0	60

Cuadro No. 3 Resultados del primer diseño experimental.

NUMERO DE EXPERIMENTOS	VARIABLES		RESPUESTAS			
	pH	AGITACION	$\Delta x$ (g/l)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Y X/S	td (h)
1	5.0	100	0.1249	0.0445	0.0624	15.59
2	7.0	300	0.5967	0.1335	0.1491	5.19
3	5.0	300	0.3863	0.1627	0.1113	4.26
4	7.0	100	1.5289	0.1542	0.1770	4.50
5	6.0	200	0.2776	0.1059	0.0982	6.54
6	6.0	200	0.2383	0.0987	0.1621	7.02
7	6.0	200	0.3353	0.1020	0.1341	6.79

Cuadro No. 4 Resultados del segundo diseño experimental.

NUMERO DE EXPERIMENTOS	VARIABLES		RESPUESTAS			
	pH (h)	AGITACION	$\Delta x$ (g/l)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Y X/S	td
8	7.40	200	0.835	0.2021	0.2042	3.43
9	4.58	200	0.0886	0.0559	0.0532	12.39
10	6.0	340	0.858	0.2733	0.1321	2.54
11	6.0	60	0.372	0.1151	0.1364	6.02

**Cuadro No. 5 Análisis de varianza para el incremento de biomasa de la cepa *Acetobacter aceti*.**

<b>FUENTE DE VARIACION</b>	<b>SUMA DE CUADRADOS</b>	<b>GRADOS DE LIBERTAD</b>	<b>MEDIA DE CUADRADOS</b>	<b>F CALCULADA</b>	<b>F TABLAS</b>
<b>TOTAL</b>	1.3666680	6			
<b>MODELO</b>	0.7640650	2	0.3820325	2.5358820	6.94
<b>ERROR</b>	0.6026030	4	0.1506507		

**HIPOTESIS NULA:**  
**FCAL < FTAB**

No hay ajuste al modelo lineal.  
 Por lo tanto se acepta la hipótesis  $H_0$  que muestra que la F CAL es menor que la F TAB

**Cuadro No. 6 Análisis de varianza para la velocidad de crecimiento de la cepa *Acetobacter aceti*.**

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
TOTAL	0.0096402	6			
MODELO	0.0039966	2	0.0019983	1.4163502	6.94
ERROR	0.0056436	4	0.0014109		

HIPOTESIS NULA:  
 $F_{CAL} < F_{TAB}$

No hay ajuste al modelo lineal.  
 Por lo tanto se acepta la hipótesis  $H_0$  que muestra que la  $F_{CAL}$  es menor que la  $F_{TAB}$ .

**Cuadro No. 7 Análisis de varianza para rendimiento de la cepa *Acetobacter aceti*.**

<b>FUENTE DE VARIACION</b>	<b>SUMA DE CUADRADOS</b>	<b>GRADOS DE LIBERTAD</b>	<b>MEDIA DE CUADRADOS</b>	<b>F CALCULADA</b>	<b>F TABLAS</b>
<b>TOTAL</b>	0.0095161	6			
<b>MODELO</b>	0.0059167	2	0.0029583	3.2876279	6.94
<b>ERROR</b>	0.0035994	4	0.0008998		

**HIPOTESIS NULA:**

**FCAL < FTAB**

No hay ajuste al modelo lineal.

Por lo tanto se acepta la hipótesis  $H_0$  que muestra que la F CAL es menor que la F TAB.

**Cuadro No. 8 Análisis de varianza para tiempo de duplicacion de la cepa *Acetobacter aceti*.**

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F CALCULADA	F TABLAS
TOTAL	90.964743	6			
MODELO	54.108800	2	27.054400	2.936232	6.94
ERROR	36.855943	4	9.213986		

HIPOTESIS NULA:  
 $F_{CAL} < F_{TAB}$

No hay ajuste al modelo lineal.  
 Por lo tanto se acepta la hipótesis  $H_0$  que muestra que la  $F_{CAL}$  es menor que la  $F_{TAB}$ .

**Cuadro No. 9 Validación del modelo para el incremento de biomasa.**

<b>NUMERO DE EXPERIMENTO</b>	<b>X1 pH</b>	<b>X2 AGITACION</b>	<b><math>\Delta</math> BIOMASA g/l PREDICHA</b>	<b><math>\Delta</math> BIOMASA g/l EXPERIMENTAL</b>	<b>% ERROR</b>
<b>12</b>	7.7	130	1.65	0.9969	39.58
<b>13</b>	4.5	400	1.75	1.0733	38.66
<b>14</b>	5.0	400	1.46	0.9182	37.10

Valores predichos por el modelo contra valores determinados experimentalmente.

**Cuadro No. 10 Validación del modelo para la velocidad de crecimiento.**

<b>NUMERO DE EXPERIMENTO</b>	<b>X1 pH</b>	<b>X2 AGITACION</b>	<b><math>\mu</math> VEL. CREC. h-1 PREDICHA</b>	<b><math>\mu</math> VEL. CREC. h-1 EXPERIMENTAL</b>	<b>% ERROR</b>
12	7.7	130	0.2050	0.3152	34.96
13	4.5	400	0.3882	0.1213	68.75
14	5.0	400	0.3670	0.1269	65.42

Valores predichos por el modelo contra valores determinados experimentalmente.

**Cuadro No. 11 Validación del modelo para rendimiento.**

<b>NUMERO DE EXPERIMENTO</b>	<b>X1 pH</b>	<b>X2 AGITACION</b>	<b>RENDIMIENTO y x/s PREDICHO</b>	<b>RENDIMIENTO y x/s EXPERIMENTAL</b>	<b>% ERROR</b>
12	7.7	130	0.2221	0.1600	27.96
13	4.5	400	0.1161	0.1984	41.48
14	5.0	400	0.1235	0.1893	34.75

Valores predichos por el modelo contra valores determinados experimentalmente.

**Cuadro No. 12 Validación del modelo para el tiempo de duplicación.**

<b>NUMERO DE EXPERIMENTO</b>	<b>X1 pH</b>	<b>X2 AGITACION</b>	<b>T. DUPLICACION td PREDICHO</b>	<b>T. DUPLICACION td EXPERIMENTAL</b>	<b>% ERROR</b>
12	7.7	130	1.85	2.20	15.90
13	4.5	400	3.60	5.71	36.95
14	5.0	400	3.13	5.46	42.67

Valores predichos por el modelo contra valores determinados experimentalmente.

GRADOS LIBERTAD	0.05	0.01
1	.99692	.999877
2	.95000	.990000
3	.8783	.95873
4	.8114	.91720
5	.7545	.8745
6	.7067	.8343
7	.6664	.7977
8	.6319	.7646
9	.6021	.7348
10	.5760	.7079
11	.5529	.6835
12	.5324	.6614
13	.5139	.6411
14	.4973	.6226
15	.4821	.6055
16	.4683	.5897
17	.4555	.5751
18	.4438	.5614
19	.4329	.5487
20	.4227	.5368
25	.3809	.4869
30	.3494	.4487
35	.3246	.4182
40	.3044	.3932
45	.2875	.3721
50	.2732	.3541
60	.2500	.3248
70	.2319	.3017
80	.2172	.2830
90	.2050	.2673

FUENTE: Fisher and F. Yates, statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research, 4a., Oliver & Boyd, Edimburgo.

Cuadro No. 13 Valores de r a los niveles de confianza de 0.05 y 0.01.

# **ANEXOS**

## XI.- ANEXOS

### ANEXO No. 1

**REGRESION MULTIPLE PARA EL AJUSTE A UN MODELO DE PRIMER ORDEN PARA EL INCREMENTO DE BIOMASA ( $\Delta X$ ).**

**REGRESION No. 1.**

$$Y = 0.4982857$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 0.4772609

**REGRESION No. 2.**

$$Y = -1.923314 + 0.4036 (X_1)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0.4767594

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 0.3781789

**SOLUCION FINAL.**

**REGRESION No. 3.**

$$Y = -1.587914 + 0.4036 (X_1) + -0.001677 (X_2)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0.5590714

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 0.3881376

**ANEXO No. 2**

**REGRESION MULTIPLE PARA EL AJUSTE A UN MODELO DE PRIMER ORDEN PARA LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO ( $\mu$ ).**

**REGRESION No. 1.**

$$Y = 0.1145$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION = 0

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 4.008362E-02

**REGRESION No. 2.**

$$Y = -6.249998E-03 + 0.020125 (X1)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION = 0.1680529

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 4.005026E-02

**SOLUCION FINAL.**

**REGRESION No. 3.**

$$Y = -0.055 + 0.020125 (X1) + 2.4375E-04 (X2)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION = 0.4145798

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 0.0375618

**ANEXO No. 3**

**REGRESION MULTIPLE PARA EL AJUSTE A UN MODELO DE PRIMER ORDEN PARA RENDIMIENTO (Y X/S).**

**REGRESION No. 1.**

$$Y = 0.1277429$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 3.982474E-02

**REGRESION No. 2.**

$$Y = -0.1008571 + 0.0381 (X1)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0.610173

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 2.723827E-02

**SOLUCION FINAL.**

**REGRESION No. 3.**

$$Y = -0.1113572 + 0.0381 (X1) + 0.0000525 (X2)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0.6217586

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 2.999736E-02

**ANEXO No. 4**

**REGRESION MULTIPLE PARA EL AJUSTE A UN MODELO DE PRIMER ORDEN PARA TIEMPO DE DUPLICACION (td).**

**REGRESION No. 1.**

$$Y = 7.127143$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION = 0

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 3.893686

**REGRESION No. 2.**

$$Y = 22.36714 + -2.54 (X1)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION = 0.2836965

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 3.60994

**SOLUCION FINAL.**

**REGRESION No. 3.**

$$Y = 27.68714 + -2.54 (X1) + -0.0266 (X2)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION = 0.5948326

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA = 3.035455

## ANEXO No. 5

### REGRESION MULTIPLE PARA EL AJUSTE A UN MODELO DE SEGUNDO ORDEN PARA EL INCREMENTO DE BIOMASA ( $\Delta X$ ).

#### REGRESION No. 1.

$$Y = 0.5128728$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 0.4231889

#### REGRESION No. 2.

$$Y = -1.493332 + 0.3344689 (X_1)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0.4982505

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 0.3159777

#### REGRESION No. 3.

$$Y = -1.495757 + 0.3344689 (X_1) + -1.212121E-05 (X_2)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0.498257

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 0.3351429

#### REGRESION No. 4.

$$Y = 0.7821019 + -0.4413102 (X_1) + 1.212121E-05 (X_2) + 6.471911E-02(X_1^2)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0.5125757

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 0.3531335

#### REGRESION No. 5.

$$Y = 3.436123 + -1.122081 (X_1) + -7.963791E-03 (X_2) + 0.1214822(X_1^2) + 1.993978E-05 (X_2^2)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0.6343401

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 0.3303675

#### SOLUCION FINAL.

#### REGRESION No. 6.

$$Y = -0.1446769 + -0.5252815 (X_1) + 9.94021E-03 (X_2) + 0.1214822(X_1^2) + 1.993978E-05 (X_2^2) + -0.002984 (X_1X_2)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= **0.83321**

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 0.2444119

**ANEXO No. 6****REGRESION MULTIPLE PARA EL AJUSTE A UN MODELO DE SEGUNDO ORDEN PARA LA VELOCIDAD DE CRECIMIENTO ( $\mu$ ).****REGRESION No. 1.**

$$Y = 0.1316382$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 6.538488E-02

**REGRESION No. 2.**

$$Y = -8.394343E-02 + 3.594116E-02 (X1)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0.24101

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 6.004463E-02

**REGRESION No. 3.**

$$Y = -0.1645187 + 3.594116E-02 (X1) + 4.028763E-04 (X2)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0.5416964

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 4.948904E-02

**REGRESION No. 4.**

$$Y = -0.4078177 + 0.1188025 (X1) + 4.028763E-04 (X2) + -6.912677E-03(X1^2)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0.5485393

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 5.250955E-02

**REGRESION No. 5.**

$$Y = 8.017334E-02 + -6.369954E-03 (X1) + -1.063643E-03 (X2) + 3.524269E-03(X1^2) + 3.666298E-06 (X2^2).$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0.7209837

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 4.458785E-02

**SOLUCION FINAL.****REGRESION No. 6.**

$$Y = -0.3365267 + 6.308005E-02 (X1) + 1.019857E-03 (X2) + 3.524269E-03(X1^2) + 3.666298E-06 (X2^2) + -3.4725E-04 (X1X2).$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= **0.8338047**

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 3.769657E-02

## ANEXO No. 7

## REGRESION MULTIPLE PARA EL AJUSTE A UN MODELO DE SEGUNDO ORDEN PARA RENDIMIENTO (Y X/S).

## REGRESION No. 1.

$$Y = 0.1291$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 4.581709E-02

## REGRESION No. 2.

$$Y = -0.1456171 + 4.580007E-02 (X1)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0.7970437

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 2.175743E-02

## REGRESION No. 3.

$$Y = -0.1494 + 4.580007E-02 (X1) + 1.891414E-05 (X2)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0.7983935

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 2.300037E-02

## REGRESION No. 4.

$$Y = -0.2508663 + 8.035685E-02 (X1) + 1.891414E-05 (X2) + -2.882888E-03(X1^2)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0.8008173

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 2.444018E-02

## REGRESION No. 5.

$$Y = -0.2559526 + -8.166151E-02 (X1) + 3.419953E-05 (X2) + -2.991671E-03(X1^2) + -3.821348E-08 (X2^2)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0.8008554

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 2.639588E-02

## SOLUCION FINAL.

## REGRESION No. 6.

$$Y = -0.4863526 + 0.1200615 (X1) + 0.0011862 (X2) + -2.991671E-03(X1^2) + -3.821348E-08 (X2^2) + -0.000192 (X1X2)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0.8710991

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 2.326325E-02

## ANEXO No. 8

### REGRESION MULTIPLE PARA EL AJUSTE A UN MODELO DE SEGUNDO ORDEN PARA TIEMPO DE DUPLICACION (td).

#### REGRESION No. 1.

$$Y = 6.751818$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 3.912153

#### REGRESION No. 2.

$$Y = 23.9099 + -2.860547 (X1)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0.4264532

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 3.123049

#### REGRESION No. 3.

$$Y = 27.82707 + -2.860547 (X1) + -1.958586E-02 (X2)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0.6249617

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 2.678604

#### REGRESION No. 4.

$$Y = 68.59308 + -16.74438 (X1) + -1.958586E-02 (X2) + 1.158254(X1^2)$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0.6786256

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 2.650771

#### REGRESION No. 5.

$$Y = 56.22367 + -13.57156 (X1) + 0.0175869 (X2) + 0.8937027(X1^2) + -9.293189E-05 (X2^2).$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= 0.7095746

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 2.721807

#### SOLUCION FINAL.

#### REGRESION No. 6.

$$Y = 92.28368 + -19.58156 (X1) + -0.1627131 (X2) + 0.8937027(X1^2) + -9.293189E-05 (X2^2) + 0.03005 (X1X2).$$

COEFICIENTE DE DETERMINACION= **0.9455777**

DESVIACION ESTANDAR ESTIMADA= 1.290682

# **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- A. Hitschiman and H. Stockinger., (1985).** Oxygen deficiency and its effect on the adenylate system in *Acetobacter* in the submerge acetic fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 22: 46-49.
- A. Mori., (1985).** Production of vinegar by immobilized cells. *Process Biochemistry* 6, 67-74.
- A. Mori, G. Terui., (1972).** *J. Ferment. Technol.*, 50, 70, 518.
- A. Mori, N. Konno and G. Terui., (1970).** *J. Ferment. Technol.*, 48,203.
- A. Mori , N. Matsumoto and C. Imai., (1989).** Growth behavior of immobilized acetic acid bacteria. *Biotechnology Letters* 11, 183-188.
- A. Nanba, A. Tamura and S. Nagai., (1984).** Synergistic Effects of Acetic Acid and Ethanol on the Growth of *Acetobacter* sp. *J. Ferment. Technol* , 62(6) : 501-505.
- A. Nanba, K. Kimura and S. Nagai., (1985).** Vinegar production by *Acetobacter rancens* cells fixed on a hollow fiber module. *Journal of Fermentation Technology* 63, 175-179.
- C. Ghommidh, J. M. Navarro and G. Durand., (1982).** A study of acetic acid production by immobilized *Acetobacter* cells: oxygen transfer. *Biotechnology Bioengineering* 24, 605-617.
- C. W. Lee and H. N. Chang., (1987).** *Biotechnol. Bioeng.*, 29,1105.
- DB. Kell, MW. Peck, G. Rodger and JG. Morris., (1981).** On the permeability to weak acids and bases of the cytoplasmic membrane of *Clostridium pasteurianum*. *Biochem Biophys Res Commun* 99:81-88.
- Ebner H., (1976).** *Ullmans Encyklo. Tech. Chemi.* 11, 41-55.
- E. L. Romero, J.M. Gómez, I. Caro and D. Cantero., (1994).** A kinetic model for growth of *Acetobacter aceti* in submerged culture. *The Chemical Engineering Journal*, 54: B15-B24.

- E. Padan, D. Zilberstein and H. Rottenberg., (1976).** The proton electrochemical gradient in *Escherichia coli* cells. *Eur J Biochem* 63: 533-541.
- E. Padan, D. Zilberstein and S. Schuldiner., (1981).** pH-Homeostasis in bacteria. *Biochim Biophys Acta* 650: 151- 166.
- Frazier C. W., (1981).** *Microbiología de Alimentos*. Ed. Acribia, Zaragoza España. p. 389-397.
- Forrest WW., (1965).** Adenosine triphosphate pool during the grow cycle in *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol* 90: 1013-1018.
- G. Box and P.V. Youle., (1955).** The Exploration and the Explotation of Response Surfase. *Biometrics*. Vol. 11, 1-4, p. 287-325.
- Giovanini M., (1983).** Response Surface Methodology and Product Optimization. *Food Technology* 31(11):41-46.
- G.G. Stewart and I. Rusel. (1971).** The Biology of *Sacharomyces*. In: "Biology of Industria Micoorganims", biotechnology series, p515-536.
- H. A. Bryan, Ch. A. Bryan y Ch. G. Bryan., (1983).** *Bacteriología*. Ed. CECSA 14:211-213.
- H. Muraoka, Y. Watabe and N. Ogasawara., (1982).** Effect of Oxygen Deficiency on Acid Production and Morphology of Bacterial Cells in Submerged Acetic Fermentation by *Acetobacter aceti*. *J. Ferment. Technol.*, 60(3) : 171-180.
- HW Cole, JWT Wimpenny and DE Hughes., (1967).** The ATP pool in *E. coli*. *Biochim Biophys Acta* 143: 445-453.
- I. Rodríguez Buenfil, L. Pinal Zuaso, F. Peraza Luna y J. González Cárdenas., (1993).** "Optimización de la Producción de Alcohol en un Ingenio Azucarero del Estado de Jalisco, México". *Memorias en extenso del Seminario Internacional de Azúcar y Derivados de la Caña*. La Habana, Cuba.
- I. Rodríguez Buenfil, S. Romo Hernández y A. Castillo Vargas., (1993).** "Optimización de Nutrientes para la Producción de Alcohol a partir de melazas de caña empleando una cepa de *Sacharomyces cervisiae*". *Biotechnología* Vol. 3 No. 1-2.

**I. Rodríguez Buenfil y L. Nuñez Vallejo., (1995).** "Optimización de las Condiciones de Temperatura y pH empleando la metodología de superficie de respuesta para la producción de alcohol con *Sacharomyces cervisiae* inmovilizada. Memorias en extenso del XVI Encuentro Nacional de la Academia y Docencia en Ingeniería Química, A. C.

**J.F. Kennedy, J. D. Humphrey and S. A. Barker., (1980).** Application of living immobilized cells to the acceleration of the continuous conversion of ethanol (wort) to acetic acid (vinegar)-hydrous titanium (IV) oxide-immobilized *Acetobacter species*. *Enzyme and Microbial Technology* 2, 209-216.

**J. H. Pepler and P. Perlman., (1979).** *Microbial Technology*. Academic Press. 2: 155-171.

**J. Osuga, A. Mori and J. Kato., (1984).** Acetic Acid Production by Immobilized *Acetobacter aceti* cells entrapped in a k-carrageenan gel. *J. Ferment. Technol.*, 62(2): 139-149.

**K. Roebuck, A. Brundin and M. Johns., (1995).** Response surface optimization of temperature and pH for the growth of *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 17:75-78.

**Langworthy TA., (1978).** Microbial life in extreme pH values. In: Kushner DJ (ed) *Microbial life in extreme environments*. Academic Press, London, pp 279-314.

**L. A. Demain, N. A. Salimon and A. G. Moat., (1985).** *Biology Industrial Microorganisms*. The Benjamin/Cumming Publishing Company, INC, Cap. 6 p. 166-169.

**Lehniger A. L., (1985).** *Bioquímica*. Ed. Omega. S.A. Barcelona, España. p. 201-203.

**Madrid V. A., (1991).** *Tecnología del Vino y Bebidas Derivadas*. AMV Ediciones p. 278-296.

**M.: A. Nazir, S. U.: F. H. Shad., (1970).** Nutritional requirements of vinegar bacteria. *Pak. J. Biochem*, 3(1-2), 24-8.

**M. Fukaya, Y.S. Park and K. Toda., (1992).** Improvement of acetic acid fermentation by molecular breeding and process development. *Journal of Applied Bacteriology* 73: 447-454.

- Miller L. G., (1959).** Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* Vol. 31, No. 3 Pp. 426-428.
- Mitchell P., (1979).** Compartmentation and communication in living cell systems. Ligand conduction: A general catalytic principle in chemical osmotic and chemiosmotic reactions. *Eur J Biochem* 95: 1-20.
- M. Taniguchi, N. Kotani and T. Kobayashi., (1987).** *J. Ferment. Technol.*, 65, 179.
- Montgomery C. D., (1991).** Análisis de Experimentos. Ed. Iberoamérica. 1: 1-11; 16: 467-470.
- Moon-Young., (1985).** "Comprehensive Biotechnology". Ed. Pergamon Press. Great Britain. p.701-727.
- N. M. Pons, L. Garrido-Sanchez, P. Dantigny and J.M. Engasser, Nancy., (1990).** pH modelling in fermentation broths. *Bioprocess Engineering* 5 : 1-6.
- O. Hromatka, H. Ebner., (1949).** *Enzymology*, 13, 369.
- O. Hromatka, G. Kastner and H. Ebner., (1951).** *Enzymology*, 16, 337.
- O. Hromatka, H. Ebner and C. Czoklich., (1953).** Über den Einfluß einer vollständigen Unterbrechung der Belüftung auf die submerse Gärung. *Enzymology* 15: 134-146.
- P. Bohringer and L. Jacob., (1964).** The Determination of Alcohol Using Chromic Acid. *Zeitschr. Flüssiges Abst.* 31, 233-226.
- Pelczar, Reid y Chan., (1982).** *Microbiología.* Ed. McGraw Hill . p. 97-99.
- Richardson K. C., (1967).** *Biotechnol. Bioeng.*, 9,171.
- R. Bar , J. L. Gainer and D. J. Kirwan., (1987).** An Unusual Pattern of Product Inhibition: Batch Acetic Acid Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 29 : 796-798.
- R. H. Müller, W. Babel., (1993).** Oxidative Capacity Determines the Growth Rate with *Acetobacter methanolicus*. *acta Biotechnol.* 13 1: 3-11.

**R.N. Greenshields and E.L. Smith., (1974).** Process Biochem. 9, 11-13, 15, 17 and 28.

**Schimwell J. L., (1954).** J. Inst. Brewing, 60, 136.

**TA. Langworthy., (1978).** Microbial life in extreme pH values. In: Kushner DJ (ed) Microbial life in extreme environments. Academic Press, London, pp 279-314.

**T. Takeuchi, S. Furukawa and R. Ueda., (1968).** J Ferment. Technol., 46,288.

**U. Menzel and G. Gottschalk., (1985).** The internal pH of *Acetobacterium wieringae* and *Acetobacter aceti* during growth and production of acetic acid. Arch Microbiol 143 : 47-51.

**W. Crueger and A. Crueger., (1984).** Biotechnology a Textbook of Industrial Microbiology. T. D. Brock, ed., 1a ed. Sanaver Associate Inc. p. 121-124.

**Y.S. Park, H. Ohtake, K. Toda, M. Fukaya, H. Okumura and Y. Kawamura, (1989).** Acetic Acid Production Using a Fermentor Equipped with a Hollow Fiber Filter Module. Biotechnology and Bioengineering. 33: 918-923.