



CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

INVESTIGACIÓN

Obtención de vinagre de naranja en proceso semicontinuo, a escala laboratorio

Ferreya, María M.; Schwab, María del C.; Davies, Cristina V.; Gerard, Liliana M.; Solda, Carina A.

Resumen

El vinagre es el producto de la fermentación acética del vino. El sistema semicontinuo es el más común en la industria vinagrera; consiste en el desarrollo de ciclos discontinuos de acetificación. El vinagre y los vinos cítricos son productos típicos con características regionales. El objetivo del presente trabajo fue la obtención de vinagre de naranja en biorreactor de laboratorio en sistema semicontinuo, a dos niveles de la variable proporción de carga (vino/vinagre): 40 % y 60 % usando como respuestas velocidad de acetificación y rendimiento para elegir el mejor proceso. Cada tratamiento se realizó por duplicado. Las variables operativas fueron, 600 rpm, 0,4 vvm y 30 °C. Se demostró que la proporción carga/descarga, no afecta significativamente ($\alpha=0,05$) las respuestas durante el segundo ciclo para ninguno de los dos niveles. Se puede establecer la proporción de carga para un proceso semicontinuo en 60% y obtener mayor volumen de vinagre de naranja.

Palabras clave: tecnología alimentaria; vinagre de naranja; proceso semicontinuo

Artículo que expone resultados del proyecto de investigación Cód.8046, Facultad de Ciencias de la Alimentación (FCAL), Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER); recibido el 04/07/2014; admitido el 15/08/2014.

Autores: docentes e investigadores en la Universidad Nacional de Entre Ríos, Facultad de Ciencias de la Alimentación (Concordia, Argentina).

Contacto: ferreyram@fcal.uner.edu.ar

Orange vinegar production by semicontinuous fermentation in a laboratory scale

Abstract

Vinegar is the product obtained from wine acetic acid fermentation and is mainly produced by semicontinuous operation, which consists in developing successive discontinuous acetification cycles. Citric vinegars and wines are typical products with regional qualities. The aim of the present work was to establish the optimal values for the substrate loading proportion (wine/vinegar) at two levels (40 % and 60 %) in order to obtain orange vinegar in semicontinuous submerged culture. The results were evaluated in terms of acetification rate and fermentation yield. Experiments were carried out in duplicate. Stirring speed, air supply and temperature were maintained constant with values of 600 rpm, 0.4 vvm and 30 °C respectively. It was demonstrated that the loading proportion did not affect significantly the responses ($\alpha=0.05$) at both levels evaluated. It is feasible to develop a semicontinuous acetification process with a 60 % loading proportion and in this way, obtain greater orange vinegar volumes.

Keys Words: food technology; orange vinegar; semicontinuous process

Obtenção de vinagre de laranja em processo semicontínuo, em escala de laboratório

Resumo

O vinagre é o produto da fermentação acética do vinho. O sistema semicontínuo é o mais comum na indústria vinagreira; consiste no desenvolvimento de ciclos descontínuos de acetificação. O vinagre e os vinhos cítricos são produtos típicos com características regionais. O objetivo deste trabalho foi obter vinagre de laranja em biorreator de laboratório em sistema semicontínuo, a dois níveis da variável proporção de carga (vinho/vinagre): 40 % e 60 % utilizando-se como respostas velocidade de acetificação e rendimento para escolher o melhor processo. Cada tratamento foi realizado em duplicado. As variáveis operacionais foram 600 rpm, 0,4 vvm e 30 °C. Foi demonstrado que a proporção carga/descarga, não afeta significativamente ($\alpha=0,05$) as respostas durante o segundo ciclo para nenhum dos dois níveis. É possível estabelecer a proporção de carga para um processo semicontínuo em 60% para obter maior volume de vinagre de laranja.

Palavras chave: tecnologia de alimentos; vinagre de laranja; processo semi-contínuo

I. Introducción

El proceso biotecnológico para la obtención de vinagre consiste en una oxidación biológica, en el que un sustrato con un bajo contenido de etanol (50-100 g / l) se oxida parcialmente por medio de bacterias del ácido acético para producir ácido acético y agua. El resultado de la transformación biológica del etanol contenido en el medio inicial es una solución llamada vinagre, con un alto contenido de ácido acético (la estequiometría para la conversión de sustrato en producto es de 1:1), cantidades residuales de etanol no convertido y una amplia variedad de compuestos secundarios (de Ory *et al.*, 2002).

Se definen dos métodos para la producción de vinagre: el tradicional (lento) y el sumergido (rápido). Este último puede realizarse en proceso discontinuo, semicontinuo o continuo (Tefaye *et al.*, 2000). El sistema semicontinuo es el modo de operación más común en la industria vinagrera; consiste en el desarrollo de ciclos discontinuos de acetificación, cada uno con la conversión del etanol que contiene el medio, en ácido acético. Al final de cada ciclo, un volumen dado del reactor se descarga (producto final) y se rellena con medio inicial. Luego, comienza un nuevo ciclo de fermentación. El volumen remanente de vinagre se utiliza como cultivo iniciador del siguiente ciclo de acetificación. Esto es un factor esencial a tener en cuenta para la determinación de la duración de los sucesivos ciclos productivos: mayores proporciones descargadas requieren ciclos más largos (Tefaye *et al.*, 2003). El porcentaje de carga/descarga es variable en cada proceso pero lo más común es la remoción del 40% (Ormaechea Landa, 1991; Fregapane *et al.*, 1999) al 50% del volumen total (de Ory *et al.*, 2004; García-García *et al.*, 2007) y la posterior carga de la misma proporción de vino fresco.

El objetivo del trabajo que se expone fue la obtención de vinagre de naranja en biorreactor de laboratorio en sistema semicontinuo comparando dos niveles de la variable “proporción de carga”: 40% y 60%, y calculando en cada caso la velocidad de acetificación y el rendimiento a los fines de elegir el mejor proceso.

II. Materiales y métodos

II.1. Equipo utilizado

La acetificación del vino de naranja se realizó por el método de cultivo sumergido, a escala laboratorio, en un biorreactor New Brunswick Cientific Co., Modelo Bioflo 2000, de 2 L de volumen útil, electrodos de control de pH y temperatura, entradas para inóculo y antiespumante y dispositivo para la toma

de muestras. La temperatura es corregida por una manta de calefacción y una serpentina con circulación de agua. El aire que ingresa al biorreactor, pasa a través de un filtro hidrofóbico (\varnothing poro: $0,45 \mu\text{m}$). La agitación se realiza mecánicamente mediante dos turbinas. El aire se inyecta a través de un dispersor. El sistema de agitación se completa con cuatro placas deflectoras para generar mayor turbulencia y mejor mezclado.

Para realizar la recarga durante el proceso, se adaptó un dosificador con conexión al biorreactor, ambos estériles. Se coloca el volumen determinado de sustrato para recarga y el flujo de alimentación se regula mediante la válvula presente en la manguera de conexión (**Figura 1**).



FIGURA 1. Equipo de acetificación en sistema semicontinuo de escala laboratorio.

II.2. Proceso biotecnológico

El microorganismo utilizado para la fermentación acética fue *Acetobacter* sp. aislado en el Laboratorio de Biotecnología a partir de naranjas de la región de Salto Grande. Los cultivos fueron conservados por congelación ($-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$) en un caldo de la siguiente composición: 2 % de glucosa; 0,5 % v/v de etanol; 0,8 % de extracto de levadura; 0,5 % de peptona (Yamada *et al.*, 1999; Lisdiyanti *et al.*, 2003), usando glicerol 20 % v/v como crioprotector.

Para comenzar el proceso fermentativo, se utilizó como medio de crecimiento, 300 mL de vino de naranja diluido al 6% v/v de alcohol con una solución de minerales y fuente nitrogenada de la siguiente composición: 0,8 g/L de KH_2PO_4 ; 0,35 g/L de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$; 1,5 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Este medio de cultivo fue inoculado al 10 % con la cepa bacteriana seleccionada y se incubó a 30 °C con inyección de aire hasta lograr una concentración celular entre 3 y $5 \cdot 10^8$ bacterias/mL (de Ory *et al.*, 2004). Este sistema se utilizó como inóculo del sustrato del proceso compuesto por vino de naranja 6 % v/v con nutrientes en igual concentración que la utilizada para el inóculo.

De acuerdo a resultados obtenidos en experiencias anteriores trabajando con el mismo sustrato pero en sistema discontinuo, se concluyó que es factible emplear mayores velocidades de agitación que aumentarían la velocidad de acetificación y el rendimiento (Ferreyra, *et al.*, 2012).

A partir de estos resultados se definieron las variables operativas para el proceso semicontinuo, 600 rpm, 0,4 vvm. En cuanto a la temperatura de proceso, atendiendo a que en la mayoría de las industrias vinagreras la temperatura óptima para el crecimiento bacteriano es de 30 °C (Lu *et al.*, 1999), este valor fue el que se empleó para los ensayos.

Las condiciones iniciales del sustrato, en todos los tratamientos, fueron: pH: $3,03 \pm 0,15$, volumen del sustrato: 2 L, concentración de alcohol: 6% v/v y concentración de ácido acético: $9,99 \pm 0,91$ g/L.

Dependiendo, entre otros factores, del tiempo en que el biorreactor es descargado, el volumen descargado y la forma en que se recarga, el medio de cultivo puede sufrir mayores o menores cambios temporales que pueden alterar la concentración y la actividad de la población bacteriana (García-García *et al.*, 2007). Debido a la escasa capacidad útil (2 L) del biorreactor disponible en el laboratorio para la acetificación y con la finalidad de obtener mayor volumen de vinagre en el menor tiempo, se decidió realizar los ensayos en sistema semicontinuo comparando dos niveles de la variable “proporción de carga”: 40 % (800 mL) y 60 % (1200 mL). Las respuestas analizadas fueron la velocidad de acetificación y el rendimiento.

El proceso fue ensayado en dos etapas: cuando la concentración de ácido acético alcanzó valores entre 41-46 g/L, se consideró completo el primer ciclo de acetificación y se comenzó la rápida descarga del volumen establecido de vinagre como producto final. Una vez concluida, se inició el agregado de sustrato (vino diluido con nutrientes) en igual volumen que vinagre descargado. En la **Figura 2** se esquematiza el procedimiento desarrollado.

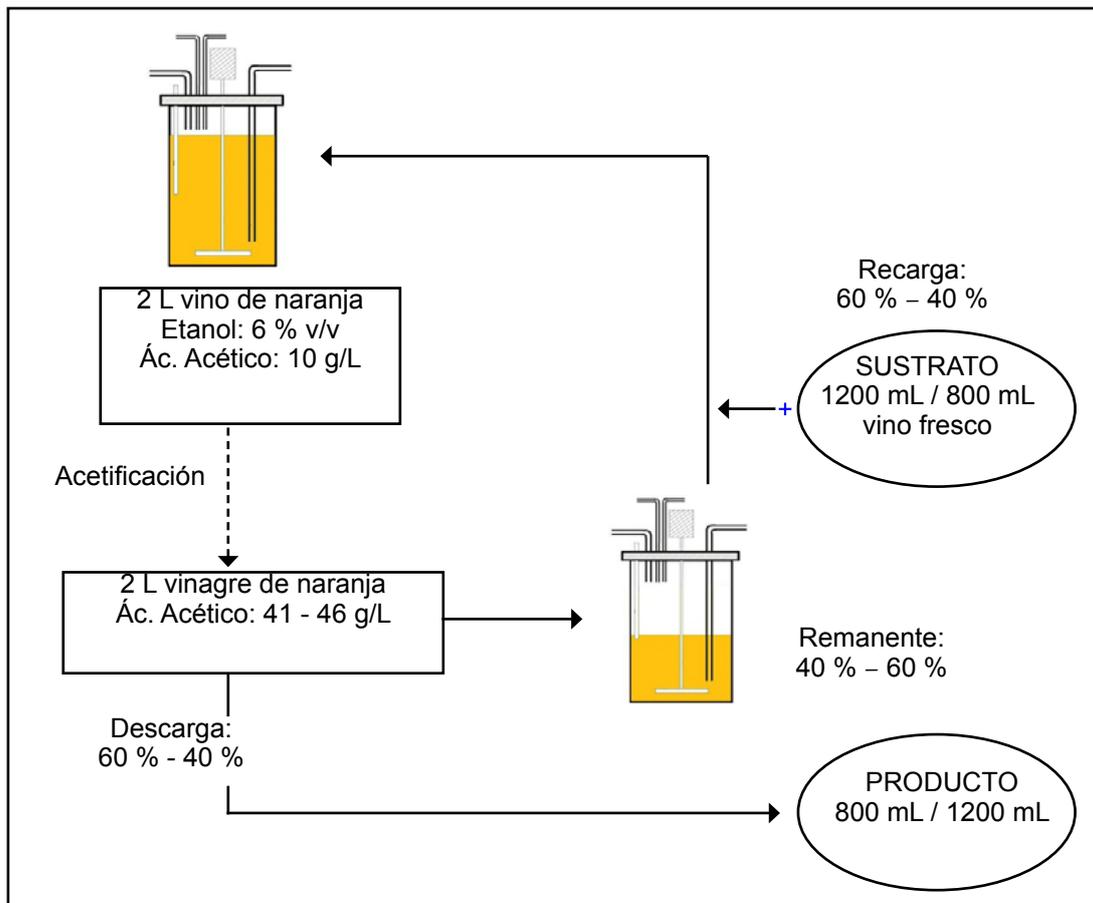


FIGURA 2. Esquema de procedimiento del proceso semicontinuo

Mientras que la descarga de producto debe hacerse lo más rápidamente posible, el agregado subsiguiente de vino fresco se recomienda que sea lento y progresivo, tratando de evitar repentinas modificaciones de las condiciones ambientales para la biomasa (concentración de etanol y ácido acético, nutrientes, temperatura, pH, etc) lo cual involucraría una nueva fase *lag* y, por consiguiente, un periodo no productivo (Bu'lock y Kristiansen, 1991; de Ory *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta las observaciones realizadas por Tesfaye *et al.* (2003), la carga del sustrato se realizó a razón de 14 mL/min, ya que a esta velocidad se mejoraba la velocidad de acetificación para un fermentador de escala laboratorio.

Una vez realizada la nueva recarga con vino fresco, comienza una nueva etapa con una elevada población de bacterias del ácido acético en fase de crecimiento exponencial. Este nuevo ciclo de acetificación se deja continuar hasta que la concentración de ácido acético se estabiliza en el orden de 60 g/L, antes de que las bacterias acéticas lo consuman por el agotamiento de sustrato alcohólico.

II.3. Control del proceso fermentativo

El monitoreo del proceso se realizó a través de muestras tomadas del fermentador cada 4 – 6 hs., mediante las siguientes determinaciones:

- pH con peachímetro marca Boeco BT-500.
- Acidez total mediante titulación con solución alcalina de NaOH y fenoftaleína como indicador, expresando el resultado como g/L de ácido acético. Se asumió que toda la acidez del medio se debe a este ácido.
- Densidad óptica (DO) por medición de la absorbancia a 540 nm, en espectrofotómetro UV-visible SHIMADZU, modelo UV 1603.
- Recuento celular: en microscopio óptico marca Leica DME, con cámara de Petroff Hauser.
- Concentración de etanol: mediante el kit enzimático de Boehringer Mannheim / R-Biopharm, Cat. N° 10176290035.

La velocidad de acetificación (p) se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$p = \frac{C_{A2} - C_{A1}}{t_2 - t_1}$$

donde: C_{A1} y C_{A2} = concentración de ácido acético (g AcH/L) para los tiempos t_1 y t_2 , respectivamente (Nieto, 1991; Tesfaye et al., 2000).

El cálculo de rendimiento real en la industria (rendimiento GK) se hace comparando la concentración total del vinagre con la concentración total del sustrato. La concentración total (GK) se define como la suma de la acidez total (expresada como g de ácido acético por 100 mL) y de la acidez que se espera obtener por transformación del alcohol presente (Ormaechea, 1991; Tesfaye et al., 2000):

$$\text{Concentración Total} = \text{Acidez Total} + (\% \text{ alcohol} \times 1,043)$$

El rendimiento(R) se calculó con la siguiente ecuación:

$$R = \frac{\text{Conc. Total del Vinagre}}{\text{Conc. Total del Vino}} \times 100$$

Cada tratamiento se realizó por duplicado y la comparación entre ambos procesos con diferente proporción de carga se realizó en función de la velocidad de acetificación y del rendimiento. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante análisis de varianza (p-valor<0,05) utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurion XV Corporate.

III. Resultados y discusión

En la **Figura 3 a)** y **b)** se representan las curvas de crecimiento de *Acetobacter sp.* durante el proceso semicontinuo de dos ciclos y la evolución de la acidez durante el proceso. En las primeras 4-6 horas se observa el desarrollo de la fase *lag*, no productiva desde el punto de vista fermentativo. Luego de esta fase, el inicio de la fase de crecimiento exponencial coincide con el aumento en la producción de ácido acético.

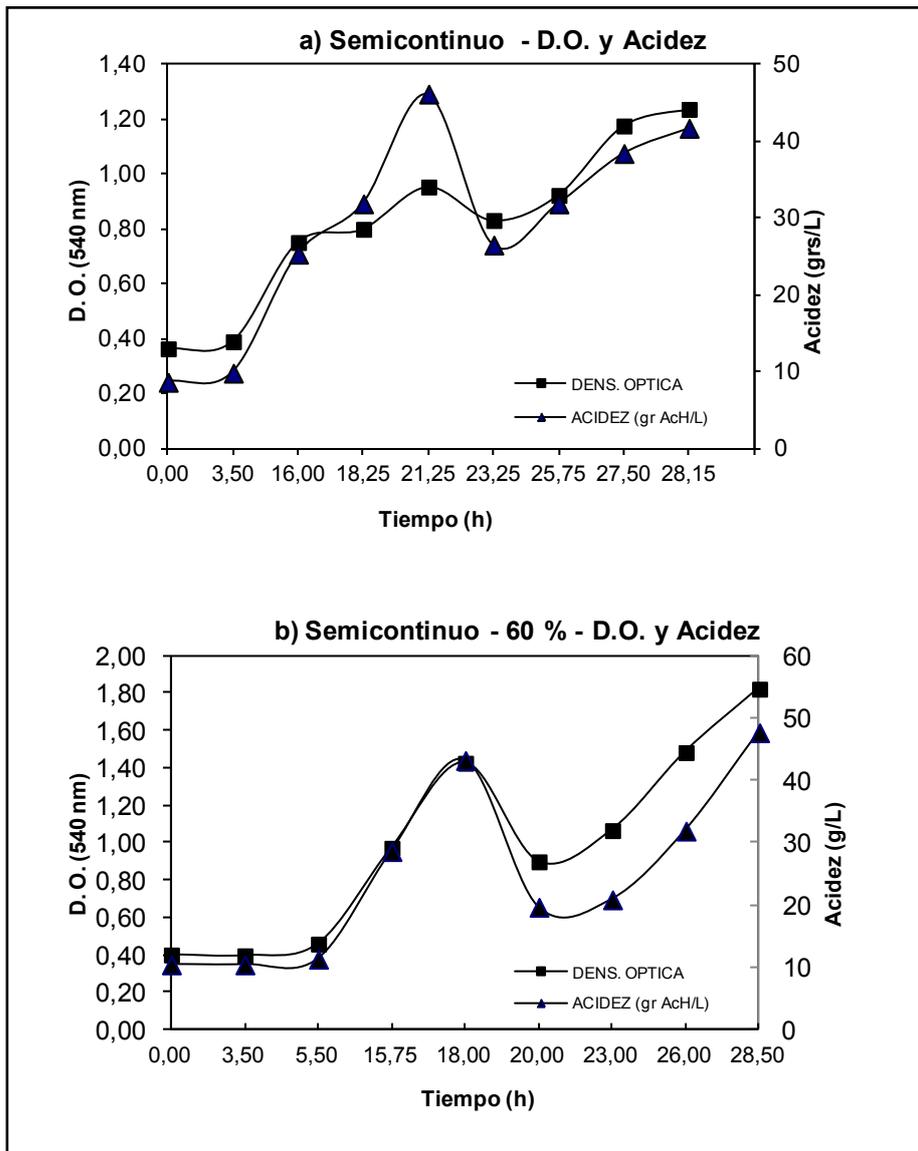


FIGURA 3. Relación entre el crecimiento microbiano y la producción de ácido acético para cada tratamiento: a) Proceso semicontinuo con 40% de descarga/carga, b) Proceso semicontinuo con 60% de descarga/carga

Al comienzo del primer ciclo, la concentración de ácido acético se eleva exponencialmente una vez que supera valores aproximados de 12 g/L, situación que coincide con la encontrada por Nanba (1984), quien observó este comportamiento a concentraciones de este ácido de 12,5 g/L. Esta relativamente baja concentración facilita la actividad celular (Jiménez Hornero *et al.*, 2009); es decir, no necesitan una concentración celular demasiado elevada para comenzar a producir ácido exponencialmente.

Una vez realizada la descarga de vinagre/carga de vino de naranja, no se aprecia una fase lag bien definida, posiblemente debido a dos factores: elevada concentración celular existente aún luego de la dilución con vino fresco ($1 \cdot 10^9 - 5 \cdot 10^9$ cel/mL) y adaptación microbiana a las elevadas concentraciones de ácido acético presentes. Si bien en trabajos reportados por de Ory y colaboradores (2002 y 2004) se informó sobre la existencia de una fase de latencia en presencia de alrededor de $5 \cdot 10^8$ cel/mL, Ndoye *et al.* (2007) encontraron que, luego de la primer recarga las bacterias acéticas crecían sin observarse una fase lag.

Es de hacer notar la diferencia de duración del primer ciclo con respecto a la del segundo para todos los tratamientos: mientras que el primero presentó una duración de 18-22 horas, el último se logró en 7-10 horas. Según Tesfaye *et al.* (2003), el primer ciclo de un sistema semicontinuo es siempre más largo que los restantes, ya que la biomasa presente se aclimata progresivamente al medio. El resultado es que el cultivo aumenta su habilidad para la fermentación y por lo tanto, la velocidad de acetificación (de Ory *et al.*, 2004).

En la **Tabla 1** se especifican las velocidades promedios de acetificación y los rendimientos para cada ciclo de cada tratamiento. Puede observarse que, dentro de cada proceso, las velocidades de producción de ácido acético aumentan notablemente en el siguiente ciclo, sin importar cuál haya sido el porcentaje de carga/descarga. Nuevamente, este importante incremento podría explicarse en términos de adaptación celular al cultivo en las condiciones fermentativas actuales.

TABLA 1. Datos promedio de los ensayos de acetificación en sistema semicontinuo con 40 % y 60 % de carga/descarga

Proceso	Veloc. acetif. 1º ciclo [g/L/h]	Veloc. acetif. 2º ciclo [g/L/h]	Rend. 1º ciclo [%]	Rend. 2º ciclo [%]
40 %	1,65	3,90	83,65	88,51
60 %	1,69	3,57	82,98	85,05

Ya que el primer ciclo de cada uno de los tratamientos se comporta como un proceso discontinuo, el análisis de varianza se realizó sobre la velocidad de acetificación y el rendimiento correspondientes al segundo ciclo, en el cual se puede observar la influencia de la proporción de carga.

Los resultados del análisis de varianza realizado a partir de los datos experimentales demuestran que la proporción de carga, en los niveles evaluados, 40 % y 60 %, no afecta significativamente la velocidad de acetificación y el rendimiento durante el segundo ciclo, con un nivel del 95% de confianza.

De acuerdo a la **Tabla 1**, la velocidad promedio de acetificación en el segundo ciclo, para el tratamiento con 40% de descarga, es de 3,90 g/L/h, en tanto que, para el 60%, este valor es de 3,57 g/L/h. De acuerdo a experiencias realizadas por Macías y colaboradores (1997), para descargas de vinagre a concentraciones de 40 g/L de ácido acético, la velocidad de acetificación promedio era próxima a 4,5 g/L/h cuando la proporción de carga era de 40% y de 4,0 g/L/h si se descargaba el 60%, mientras que, si la concentración de ácido acético era de 50 g/L/h, para ambas proporciones la velocidad de acetificación promedio se mantenía cercana a 4,5 g/L/h. Es decir que, aunque las velocidades obtenidas en el presente trabajo son levemente inferiores a las de aquellos, los resultados son similares en el sentido comparativo de los procesos.

En un trabajo publicado por Tesfaye *et al.* (2000) se aplicó un diseño factorial para determinar bajo qué condiciones de velocidad de agitación, volumen de trabajo y proporción de carga se obtenía el mejor rendimiento en producto y a la mayor velocidad de acetificación. Encontraron que, con una proporción de carga 1:1, es decir del 50 %, se obtenían mejores rendimientos que utilizando proporciones 2:1 (67 % de descarga) si bien las velocidades de agitación ensayadas (250 y 450 rpm) fueron diferentes a las empleadas en nuestra experiencia y, como se sabe, una mayor velocidad de agitación implica una mayor probabilidad de pérdidas por evaporación.

De esta manera, podría decirse que, ya que con una descarga/carga del 60% no se ven significativamente afectadas la velocidad de producción y el rendimiento respecto de una descarga del 40%, se puede establecer la proporción de carga para un proceso semicontinuo en 60% y así obtener mayor volumen de producto.

Referencias bibliográficas

- BU'LOCK, J.; KRISTIANSEN, B. (1991). *Biotecnología Básica*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- DE ORY, I.; ROMERO, L.E.; CANTERO, D. (2002). Optimum starting-up protocol of a pilot plant scale acetifier for vinegar production, en: *Journal of Food Engineering*, 52(1): 31-37.
- DE ORY, I.; ROMERO, L.E.; CANTERO, D. (2004). Operation in semi-continuous with a closed pilot plant scale acetifier for vinegar production, en: *Journal of Food Engineering*, 63(1): 39-45.
- FERREYRA M ; SCHVAB M; DAVIES C;GERARD L; HOURS R. (2012). Influencia del caudal de aire, temperatura y velocidad de agitación en el proceso discontinuo de acetificación para la obtención de vinagre de naranja (*Citrus sinensis* var.W. Navel), en: *Scientia Agropecuaria*, 3(1): 61- 65.
- FREGAPANE, G.; RUBIO-FERNANDEZ, H.; NIETO, J.; SALVADOR, M.D. (1999). Wine vinegar production using a noncommercial 100-litre bubble column reactor equipped with a novel type of dynamic sparger, en: *Biotechnology and Bioengineering*, 63 (2): 141-146.
- GARCÍA-GARCÍA, I.; CANTERO-MORENO, D.; JIMÉNEZ-OT, C.; BAENA-RUANO, S.; JIMÉNEZ-HORNERO, J.; SANTOS-DUEÑAS, I.; BONILLA-VENCESLADA, J.; BARJA, F. (2007). Estimating the mean acetification rate via on-line monitored changes in ethanol during a semi-continuous vinegar production cycle, en: *Journal of Food Engineering*, 80(2): 460-464.
- JIMÉNEZ-HORNERO, J.E.; SANTOS-DUEÑAS, I.M.; GARCÍA-GARCÍA, I. (2009). Optimization of biotechnological processes. The acetic acid fermentation. Part I: The proposed model, en: *Biochemical Engineering Journal*, 45(1): 1-6.
- LISDIYANTI, P.; KATSURA, K.; POTACHAROEN, W.; NAVARROL, R.; YAMADA, Y.; UCHIMURA, T.; KOMAGATA, K. (2003). Diversity of Acetic Acid Bacteria in Indonesia, Thailand and Philippines, en: *Microbiology and Culture Collections*, 19(2): 91-99.
- LU SF, LEE FL, CHEN HK. (1999). A thermotolerant and high acetic acid-producing bacterium *Acetobacter* sp. 114-2, en: *Journal of Applied Microbiology*, 86: 55-62.
- MACÍAS, M.; CARO, I; CANTERO, D. (1997). Optimum operating conditions in closed-system industrial acetifiers (semi-continuous operation): a study by computer simulation, en: *Chemical Engineering Journal*, 65(3): 201-207.
- NANBA, A.; TAMURA, A.; NAGAI, S. (1984). Synergistic effects of acetic acid and ethanol on the growth of *Acetobacter* sp., en: *Journal of Fermentation Technology*, 62(6): 501-505.

- NDOYE, B.; LEBECQUE, S.; DESTAIN, J.; GUIRO, A.T.; THONART, P. (2007). A new pilot plant scale acetifier designed for vinegar production in Sub-Saharan Africa, en: *Process Biochemistry*, 42(11): 1561-1565.
- NIETO, F.J. (1991). Algunos aspectos de la tecnología de la fermentación acética. (pp. 69-103). En: LLAGUNO, C., POLO, M.C. (Eds.). *El vinagre de vino*. Madrid: CSIC.
- ORMAECHEA LANDA, A.R. (1991). Proceso industrial de elaboración de vinagre. (pp.49-68). En: LLAGUNO, C., POLO, M.C. (Eds.). *El vinagre de vino*. Madrid: CSIC.
- TESFAYE, W.; GARCÍA-PARRILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. (2000). Set up and optimization of laboratory scale fermenter for the elaboration of wine vinegar, en: *Journal of the Institute of Brewing*, 106 (4): 215-219.
- TESFAYE, W.; MORALES, M.L.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. (2003). Optimising wine vinegar production: fermentation and ageing, en: *Applied Biotechnology, Food Science and Policy*, 1(2): 109-114.
- YAMADA Y., HOSONO R., LISDYANTI P., WIDYASTUTI Y., SAONO S., UCHIMURA T. Y KOMAGATA K. (1999). Identification of acetic acid bacteria isolated from Indonesian sources, especially of isolates classified in the genus *Gluconobacter*, en: *Journal of General and Applied Microbiology*, 45(1): 23-28.