

Alternative bio-acidification process to make mango vinegar

Jhossep Morales-Aredo, Ing.¹; Ricardo Vejarano, Dr.^{2*}

¹ Ingeniería Agroindustrial. Universidad Privada del Norte (UPN), Trujillo, Peru.

² Dirección de Investigación, Innovación y Responsabilidad Social. Universidad Privada del Norte (UPN), Trujillo, Peru.
ricardo.vejarano@upn.edu.pe

*Abstract– The aim of this research was to evaluate the synthesis of acetic acid (bio-acidification) during the elaboration of a mango-based vinegar with a microbial multistarter of yeasts and bacteria called SCOBY (symbiotic culture of bacteria and yeast) that is used to elaborate kombucha and that has the capacity to carry out alcoholic fermentation and acetic fermentation simultaneously. This method was compared with the bio-acidification using the traditional method of making vinegar, which uses alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and subsequent acetic fermentation with acetic acid bacteria. In the vinegars obtained, the acidity level established by the reference regulations of 50 g/L of total acidity was reached in periods of time between 26 and 42 days for the fermentations with SCOBY of kombucha, while the traditional process (fermentation alcoholic + acetic fermentation) allowed to reach that acidity between 39 and 48 days. In addition, no significant differences were found in the content of phenolic compounds between both bio-acidification methods when using fermenters with the same dimensions. These results indicate that the fermentative process with the SCOBY multistarter allows a similar production of acetic acid than the traditional method, but in less time.*

Keywords: vinegar, mango vinegar, kombucha, SCOBY, acetic fermentation

Digital Object Identifier: (only for full papers, inserted by LACCEI).
ISSN, ISBN: (to be inserted by LACCEI).
DO NOT REMOVE

Alternative bio-acidification process to make mango vinegar

Proceso alternativo de bio-acidificación para elaborar vinagre de mango

Jhossep Morales-Aredo, Ing.¹; Ricardo Vejarano, Dr.^{2*}

¹ Ingeniería Agroindustrial. Universidad Privada del Norte (UPN), Trujillo, Peru.

² Dirección de Investigación, Innovación y Responsabilidad Social. Universidad Privada del Norte (UPN), Trujillo, Peru.
ricardo.vejarano@upn.edu.pe

Abstract– *The aim of this research was to evaluate the synthesis of acetic acid (bio-acidification) during the elaboration of a mango-based vinegar with a microbial multistarter of yeasts and bacteria called SCOBY (symbiotic culture of bacteria and yeast) that is used to elaborate kombucha and that has the capacity to carry out alcoholic fermentation and acetic fermentation simultaneously. This method was compared with the bio-acidification using the traditional method of making vinegar, which uses alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and subsequent acetic fermentation with acetic acid bacteria. In the vinegars obtained, the acidity level established by the reference regulations of 50 g/L of total acidity was reached in periods of time between 26 and 42 days for the fermentations with SCOBY of kombucha, while the traditional process (fermentation alcoholic + acetic fermentation) allowed to reach that acidity between 39 and 48 days. In addition, no significant differences were found in the content of phenolic compounds between both bio-acidification methods when using fermenters with the same dimensions. These results indicate that the fermentative process with the SCOBY multistarter allows a similar production of acetic acid than the traditional method, but in less time.*

Keywords: *vinegar, mango vinegar, kombucha, SCOBY, acetic fermentation*

Resumen– *El objetivo de la investigación fue evaluar la síntesis de ácido acético (bio-acidificación) durante la elaboración de un vinagre a base de mango con un multistarter microbiano de levaduras y bacterias denominado SCOBY (symbiotic culture of bacteria and yeast) que se utiliza para elaborar kombucha y que tiene la capacidad de realizar de manera simultánea la fermentación alcohólica y la fermentación acética. Este método fue comparado con la bio-acidificación mediante el método tradicional de elaboración de vinagre, que utiliza la fermentación alcohólica y la posterior fermentación acética. En los vinegares obtenidos se alcanzó el nivel de acidez establecido por la normativa de referencia, de 50 g/L de acidez total en periodos de tiempo de entre 26 y 42 días para las fermentaciones con SCOBY de kombucha, mientras que el proceso tradicional (fermentación alcohólica + fermentación acética) permitió alcanzar dicha acidez entre los 39 y 48 días. Además, no se evidenciaron diferencias significativas en el contenido de compuestos fenólicos entre ambos métodos de bio-*

acidificación al utilizar fermentadores con iguales dimensiones. Estos resultados indican que el proceso fermentativo con el multistarter SCOBY permite una producción similar de ácido acético que el método tradicional, pero en menor tiempo.

Palabras clave: *vinagre, vinagre de mango, kombucha, SCOBY, fermentación acética.*

I. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con el Sistema Integrado de Información de Comercio Exterior (SIICEX) del Ministerio de Comercio Exterior y Turismo, Perú se ubica entre los mayores exportadores de mango en Latinoamérica, solamente superado por México y Brasil. Los formatos de exportación incluyen mango fresco, congelado, pulpa, mango deshidratado, mango en conserva, entre otros. Las campañas de cosecha de esta fruta se distribuyen entre los meses de noviembre y abril, siendo Piura la región con la mayor producción [1], correspondiendo el 70% de la producción a pequeños y medianos agricultores. No obstante, a pesar de la creciente demanda internacional, en algunas zonas productoras se genera una sobreproducción de la fruta, la cual además al no ser consumida por el mercado interno, afecta a los productores, quienes en muchas oportunidades deben desechar sus cosechas.

Entre las alternativas para aprovechar esta sobreproducción se puede considerar la elaboración de productos derivados con el fin de darle un valor agregado, por ejemplo, alimentos fermentados a base de mango, siendo el vinagre una alternativa.

I.A. El vinagre

El vinagre es un producto fermentado que tiene diversas definiciones en función de cada país y la entidad que regula su producción. Por ejemplo, en el Real Decreto Español 661 del año 2012 se define como “el líquido apto para el consumo humano resultante de la doble fermentación alcohólica y acética de productos de origen agrario”. Por su parte, en la Norma Técnica Peruana 209.020:1970 se caracteriza al vinagre como “el producto obtenido por la fermentación

Digital Object Identifier: (only for full papers, inserted by LACCEI).
ISSN, ISBN: (to be inserted by LACCEI).
DO NOT REMOVE

acética de bebidas alcohólicas o de diluciones de alcohol etílico, pudiendo ser obtenido por la fermentación acética del vino, de diluciones de alcohol etílico rectificado, o de bebidas alcohólicas de cereales, de frutas o de hidromiel”.

El vinagre se caracteriza por su acidez, debido principalmente a su contenido de ácido acético y a su contenido de compuestos aromáticos y otros componentes en función de las materias primas de las que deriva y de los procesos específicos de elaboración.

No obstante, todas las definiciones coinciden en que el vinagre es el producto de la fermentación acética de una bebida alcohólica base (“vino base”), existiendo en el mundo una amplia variedad de vinagres elaborados a partir de diversas materias primas, desde el tradicional vinagre de vino (de uva) así como vinagres a base de otras frutas, cereales, hortalizas, miel de abeja, y toda fuente con alto contenido de azúcares fermentables [2].

I.B. Elaboración de vinagre por el proceso tradicional

a. Primera etapa: Producción de la bebida alcohólica base

En esta etapa juega un papel muy importante las levaduras, siendo *Saccharomyces cerevisiae* la más usada, la cual en condiciones de anaerobiosis mediante la fermentación alcohólica convierte los azúcares, principalmente glucosa y fructosa, del medio fermentativo (mosto) en etanol y otros metabolitos [3], obteniendo de ese modo la “bebida alcohólica base” (Figura 1), que, por ejemplo, en el caso de la uva, correspondería a un vino base.

En este proceso se obtienen, además del etanol y CO₂, otros compuestos que contribuyen al sabor y aroma del vino base, como ácidos orgánicos, ésteres, alcoholes superiores, aldehídos, entre otros compuestos aromáticos [3]–[5].

Esta es la etapa en la cual se puede lograr la mayor extracción de los compuestos de interés desde la materia prima, que permitan elaborar un vino con un determinado perfil, por ejemplo, compuestos fenólicos, dado que es la etapa donde la materia prima está en contacto con el medio fermentativo, que a su vez actúa como lixivante debido a la presencia de etanol [6].

b. Segunda etapa: Elaboración del vinagre

La conversión del vino base en vinagre inicia con la oxidación del etanol del vino a acetaldehído, y posterior oxidación de este acetaldehído a ácido acético, proceso conocido como fermentación acética, que es llevado a cabo en aerobiosis por las bacterias acéticas, principalmente de los géneros *Acetobacter* y *Gluconacetobacter* [2], [7]. En la Figura 1 se resume el proceso general de elaboración de vinagre a partir de las secuenciales fermentaciones alcohólica y acética.

El ácido acético sintetizado es el que le confiere la acidez característica al vinagre elaborado, y de acuerdo con el Real

Decreto Español 661/2012 debe tener como mínimo un 5.0 % m/v de acidez total. Otras legislaciones, como la emitida por la Autoridad de Seguridad Alimentaria y Normas de la India (2012) establece un mínimo de 3.75 % m/v de acidez. Adicionalmente, en la elaboración del vinagre no está permitida la adición de ácido acético exógeno.

Además de ácido acético, durante la fermentación acética, se generan otros compuestos que son responsables del sabor y aroma del vinagre, tales como ácidos orgánicos, ésteres, cetonas, aldehídos, entre otros [8], los cuales se suman a los ya sintetizados en la etapa de fermentación alcohólica, confiriendo al vinagre una mayor complejidad aromática.

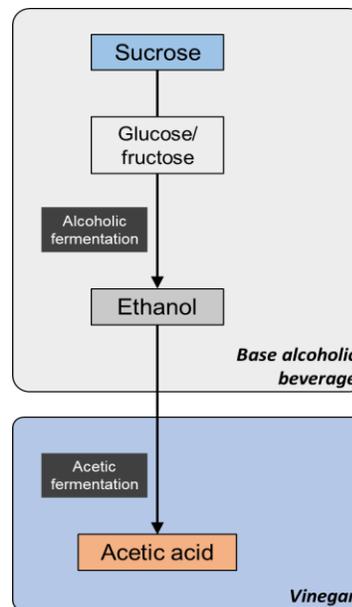


Fig. 1 Secuencia de fermentaciones alcohólica y acética implicadas en el proceso tradicional de elaboración de vinagre.

I.C. Proceso alternativo para elaboración de vinagre

Si bien el método tradicional de elaboración de vinagre viene siendo usado desde hace muchos siglos atrás, y mediante el cual se han desarrollado diversos tipos de vinagres de muy buena calidad alrededor del mundo, el tiempo necesario para completar de manera secuencial la fermentación alcohólica (en condiciones anaeróbicas por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*) y la posterior fermentación acética (en condiciones aeróbicas por *Acetobacter* y *Gluconacetobacter*) puede ser prolongado. Ese tiempo se podría reducir mediante el desarrollo y aplicación de métodos alternativos de elaboración de vinagre utilizando otros microorganismos con el fin de acelerar la acidificación biológica (bio-acidificación). Por ejemplo, con el consorcio multi-microbiano utilizado en la elaboración de *kombucha*.

La *kombucha* es una bebida fermentada, carbonatada, de sabor agridulce y tradicionalmente elaborada a base de infusiones azucaradas de té negro, cuya aceptabilidad además, se atribuye a su contenido de compuestos fenólicos

provenientes del té, con potencial de prevención y tratamiento de diversas enfermedades, especialmente las relacionadas con el estrés oxidativo [9], [10].

El proceso fermentativo para la elaboración de la kombucha es realizado por un consorcio multi-microbiano (multistarter) formado por levaduras y bacterias conocido como SCOBY (*symbiotic culture of bacteria and yeast*) [9], que en aerobiosis convierte los azúcares en ácidos orgánicos, principalmente ácido acético (Figura 2). Como componentes del SCOBY, mayoritariamente se han identificado a las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Kloeckera apiculata*, *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Torulasporea delbrueckii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces lambicus*, *Brettanomyces custersii*, *Candida stellata*, entre otras, que son las principales responsables de convertir los azúcares simples como sacarosa, glucosa y fructosa en etanol mediante la fermentación alcohólica [11]–[13]. Mientras que entre las bacterias se han identificado *Acetobacter xylinum*, *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, entre otras, causantes de la bio-acidificación, con predominio de *Acetobacter xylinum*, reclasificada actualmente como *Komagataeibacter xylinum* [12], [13]. Estas bacterias, principalmente *Acetobacter*, oxidan el etanol a acetaldehído, y posteriormente a ácido acético, que es el ácido mayoritario en la kombucha [14], [15]. Simultáneamente la glucosa se convierte en ácido glucurónico y otros ácidos orgánicos (Figura 2), y en uridina difosfo-glucosa (UDPGlc). La UDPGlc deriva en la formación de la típica película de celulosa que se sitúa en la superficie del medio fermentativo [14]–[16].

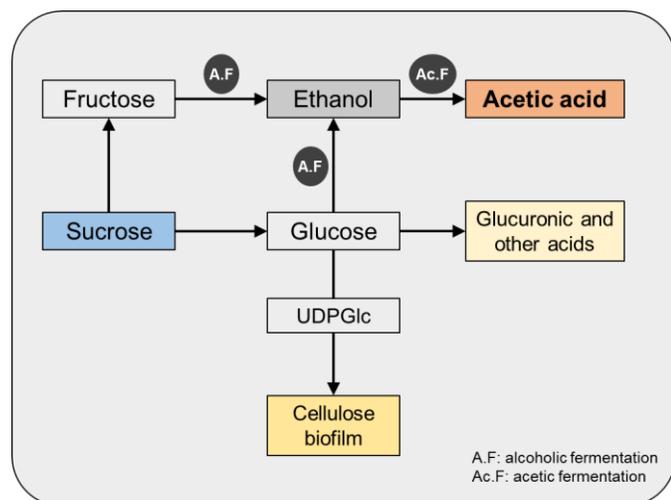


Fig. 2 Fermentaciones simultáneas (alcohólica y acética) realizadas por el SCOBY en la elaboración de kombucha. Adaptado de: [16], [17].

A diferencia del método tradicional de fermentaciones secuenciales alcohólica y acética (Figura 1), la elaboración de vinagre mediante el uso de un multistarter tipo SCOBY puede

ser realizada con las fermentaciones alcohólica y acética en forma simultánea.

En ese sentido, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar la producción de ácido acético o acetificación (o bio-acidificación) durante la elaboración de un vinagre a base de mango mediante la utilización de un SCOBY de kombucha que utiliza de manera simultánea las fermentaciones alcohólica y acética, comparando la bio-acidificación mediante el método tradicional (método Orleans o método en superficie) de elaboración de vinagre que utiliza de manera secuencial la fermentación alcohólica y la posterior fermentación acética.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Para todos los ensayos se utilizó mango (*Mangifera indica*) de la variedad Kent, adquirido del mercado La Hermelinda de la ciudad de Trujillo, Perú, en función del requerimiento para cada prueba experimental.

Una vez se recibió el mango en el laboratorio, fue lavado para eliminar impurezas, tras lo cual se retiró la cáscara y se separó la pulpa. La pulpa fue troceada en cubos de 1 cm de lado y posteriormente triturada durante 1 minuto en un procesador de alimentos, tamizando luego para eliminar la fibra. Se midió el contenido de sólidos solubles (°Brix) en el jugo obtenido mediante un refractómetro digital Atago PAL-1 (Japón), obteniendo un valor de 13.2 °Brix.

Para la elaboración de los vinos base se ajustó el contenido de sólidos solubles a 12 y 19 °Brix, de acuerdo con la Tabla 1.

TABLA 1
AJUSTES DEL JUGO DE MANGO PARA OBTENER MEDIOS CON 12 Y 19 °BRIX

Componente	Mosto	Mosto
	12 °Brix (3000 mL)	19 °Brix (3000 mL)
Jugo de mango (13.2 °Brix)	2727 mL	2730 mL
Agua	273 mL	23 mL
Azúcar (85 °Brix)	-	247 g

II.A. Elaboración de vinagre por el método tradicional (método Orleans o en superficie)

a. Primera etapa: Elaboración de vino base

Cada fermentador operó a un 70% de su volumen conteniendo el respectivo mosto, al que se añadió 0.5 g/L de levadura comercial *Saccharomyces cerevisiae* (Safale US-05, Fermentis, Francia). Se cerró herméticamente para facilitar la anaerobiosis, dejando solamente una salida para el CO₂ producido mediante mangueras de 0.4 cm de diámetro

conectadas a una trampa conteniendo una solución de NaHSO_3 al 0.1% para mantener condiciones de esterilidad.

Se dejó fermentar los mostos siguiendo la evolución de los sólidos solubles hasta que estos permanezcan sin variar por lo menos durante dos días consecutivos, momento en el cual se considera finalizada la fermentación alcohólica [18].

Se procedió a sedimentar para clarificar el vino obtenido, para separar las partes sólidas, dejando en refrigeración durante 48 horas, para posteriormente realizar los análisis.

El grado alcohólico se determinó mediante destilación de 100 mL de muestra y posterior medición densimétrica del destilado de acuerdo con el Método Oficial MA-AS312-01A [19].

La acidez total se determinó en base al Método OENO 52/2000 [20]. En un matraz Erlenmeyer de 125 mL se introdujeron 10 mL de muestra, adicionando agua recientemente hervida y enfriada hasta que la mezcla esté apenas coloreada. Se añadieron entre 3 a 4 gotas de fenoltaleína (1 % m/v en etanol), se mezcló y se valoró con una solución de NaOH 0.5 M hasta coloración rosa persistente. Sea V el volumen (mL) de NaOH utilizado en la valoración, el contenido en acidez total (g/L ácido acético) de la muestra viene dado por 3V.

b. Segunda etapa: Elaboración del vinagre

Los vinos de mango fueron sometidos a fermentación acética para ser convertidos en vinagre mediante el método Orleans o de superficie [21]. Se utilizaron microfermentadores cilíndricos con un volumen de operación de 6.5 cm de diámetro por 15.0 cm de altura, colocando en cada fermentador 500 mL de vino de mango. A cada fermentador se añadió 5 mL de un cultivo acético a base de *Acetobacter* sp. y *Gluconacetobacter* sp. (proveído desde el laboratorio de Tecnología de Alimentos de la Universidad Politécnica de Madrid, España). Se procedió a cubrir la parte superior de cada fermentador con una malla textil que permita solamente la entrada de aire (fermentación en aerobiosis).

Se dejó fermentar los vinos siguiendo la evolución de la acidez, tomando como criterio de finalización una vez que se alcance un 5 % m/v de acidez (expresada como ácido acético), evaluando la acidez en base al Método OENO 52/2000 [20], descrito en la sección anterior.

Finalizada la fermentación acética se procedió a sedimentar las partes sólidas presentes en los fermentos, almacenando en refrigeración el vinagre obtenido.

II.B. Proceso alternativo para elaboración de vinagre mediante el multistarter de kombucha

Los medios fermentativos fueron preparados con las mismas proporciones y contenido de sólidos solubles indicados en la Tabla 1, colocando posteriormente en cada fermentador 500 mL del respectivo mosto (12 o 19 °Brix). Se utilizaron fermentadores cilíndricos con un volumen de operación de 6.5 cm de diámetro por 15.0 cm de altura y a

cada fermentador se añadió 15 g de multistarter de *kombucha* (SCOBY) previamente cultivado en solución azucarada (Kombucha Perú S.A.). Se procedió a cubrir la parte superior de cada fermentador con una malla textil que permita solamente la entrada de aire (fermentación en aerobiosis).

Se dejó fermentar los mostos inspeccionando visualmente la correcta implantación del SCOBY (formación de la capa de celulosa en la interfaz líquido-aire) y siguiendo la evolución de los sólidos solubles (por refractometría) y de la acidez, tomando como criterio de finalización cuando se alcance un 5 % m/v de acidez (expresada como ácido acético), evaluada en base al Método OENO 52/2000 [20], descrito previamente.

Finalizado el proceso fermentativo se procedió a retirar el SCOBY formado en la superficie del medio y a sedimentar los fermentos para separar las partes sólidas, almacenando en refrigeración los vinagres obtenidos.

a. Efecto de la relación diámetro/altura del fermentador en la elaboración de vinagre de kombucha

Con el fin de evaluar si la relación diámetro/altura del fermentador afecta el proceso fermentativo mediante el multistarter de *kombucha*, se realizó una prueba adicional comparando la fermentación en los fermentadores usados previamente (relación diámetro/altura 1.00/2.31; volumen de operación: 6.5 cm de diámetro por 15.0 cm de altura) con otro tipo de fermentador (relación diámetro/altura 1.00/1.04; volumen de operación: 8.5 cm de diámetro por 8.8 cm de altura).

En cada fermentador se colocó 500 mL de mosto de 19 °Brix y 15 g del SCOBY, procediendo a cubrir la parte superior con una malla textil que permita solamente la entrada de aire (fermentación en aerobiosis).

Se dejó fermentar los mostos inspeccionando visualmente la correcta implantación del SCOBY y siguiendo la evolución de los sólidos solubles y de la acidez, de la misma manera como se ha reportado en la sección anterior.

b. Evaluación del contenido de compuestos fenólicos

El contenido de fenoles totales en los vinagres obtenidos se determinó en base al método OIV-MA-AS2-10 [19], introduciendo en un matraz de 100 mL: 1 mL de muestra previamente diluida 1/5, 50 mL de agua destilada, 5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 20 mL de solución de Na_2CO_3 al 20%. Se enrasó a 100 mL con agua destilada, mezclando adecuadamente hasta disolución total y se dejó en oscuridad durante 30 minutos para reacción.

Se procedió a medir la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Vernier Svis-Plus, Vernier Software & Technology, OR, Estados Unidos). Los contenidos de fenoles totales se calcularon utilizando una curva de calibración obtenida con un estándar de ácido gálico, expresando los resultados como mg de eq. ácido gálico/L de muestra.

II.C. Análisis estadístico

Se usó el software Statistica 7.0 (StatSoft Inc., United States) para evaluar los resultados obtenidos. Se aplicó análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 5% ($p < 0.05$) utilizando la prueba de Rangos Múltiples (HSD) de Tukey para determinar las diferencias significativas.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.A. Elaboración de vinagre por el método tradicional (método Orleans o en superficie)

En la Figura 3 se observa el consumo de azúcares en los mostos de mango por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, los cuales disminuyen hasta el día 14, momento a partir del cual los valores de sólidos solubles no muestran variaciones significativas, lo que de acuerdo con Domizio et al. [18] indica el final de la fermentación alcohólica.

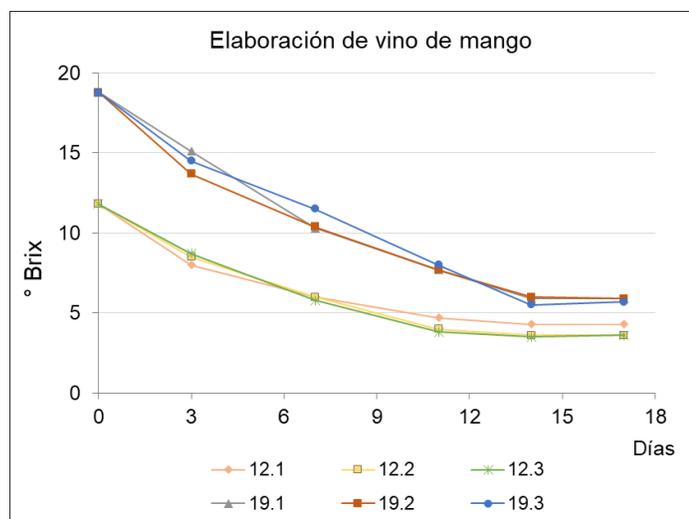


Fig. 3 Evolución de los sólidos solubles (°Brix) en los mostos de 12 y 19 °Brix durante la fermentación alcohólica del vino de mango.

En la Tabla 2 se muestran los resultados del grado alcohólico alcanzado para los mostos de 12 y 19 °Brix, obteniendo 5.2 y 11.2 % v/v de etanol, respectivamente. Mientras que en la acidez se obtuvieron valores de 4.20 y 4.95 g/L, respectivamente, obteniendo incrementos respecto a la acidez de la pulpa del mango, que fue de 3.5 g/L. Lo que se explica en que además de etanol, la levadura sintetiza otros metabolitos durante el proceso fermentativo, dentro de ellos diversos ácidos orgánicos [3].

TABLA 2

GRADO ALCOHÓLICO (% v/v) Y ACIDEZ (g/L) DE LOS VINOS DE MANGO	12 °Brix	19 °Brix
	Grado alcohólico (% v/v)	5.20 ± 0.07
Acidez (g/L ácido acético)	4.20 ± 0.07	4.95 ± 0.05

Estos vinos obtenidos fueron posteriormente inoculados con las bacterias acéticas (*Acetobacter* sp. y *Gluconacetobacter* sp.) [2], las cuales oxidan el etanol presente en el vino hasta acetaldehído por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa, y posteriormente se oxida este acetaldehído a ácido acético por acción de la enzima aldehído deshidrogenasa [7], proceso conocido como fermentación acética, que es llevado a cabo en aerobiosis (Figura 1).

De acuerdo con la Figura 4, la evolución de la acidez muestra variación entre cada repetición para cada tipo de vino, no obstante, es evidente que, en el vino elaborado a partir del mosto de 19 °Brix, cuyo grado alcohólico fue el más alto (11.2 % v/v), los valores de acidez son más altos que en el vino de elaborado del mosto de 12 °Brix, lo que indica la síntesis de ácido acético en proporción al contenido de etanol de cada vino.

Si bien no se ha evidenciado uniformidad en el criterio usado para dar por finalizada la fermentación acética. Por ejemplo, en el trabajo de Hidalgo et al. [21] detuvieron la acetificación (proceso de bio-acidificación) al alcanzar 6 % m/v de acidez titulable en un cultivo en superficie (método Orleans), que es el mismo método aplicado en el presente trabajo. No obstante, de acuerdo con la normativa de referencia (Real Decreto Español 661/2012) un vinagre debe tener como mínimo 50 g/L de acidez total (5 % m/v de acidez), valor que se tomó como criterio de finalización de la bio-acidificación de los vinagres de mango.

De acuerdo con la Figura 4, en el vino de 12 °Brix no se logró superar los 30 g/L de acidez, mientras que en el vino de 19 °Brix se logró superar los 50 g/L de acidez total a partir de los 25 días. En otro trabajo se logró alcanzar esa acidez en torno a los 32 días de fermentación acética en un vino base de 9.5 % v/v de etanol [21].

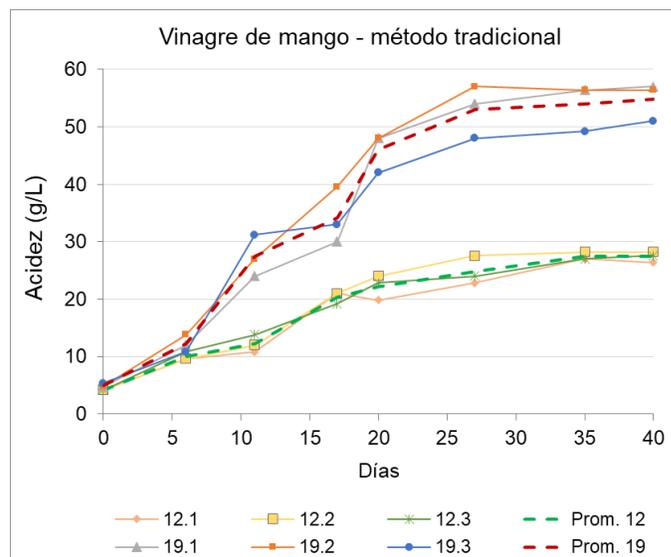


Fig. 4 Proceso de acidificación de los vinos de mango (obtenidos de mostos de 12 y 19 °Brix) durante la elaboración de vinagre por el método tradicional (método Orleans o en superficie). Las líneas discontinuas representan el promedio.

En base a los resultados, se puede obtener un vinagre de acuerdo con los parámetros establecidos en la normativa de referencia partiendo de un mosto de mango de 19 °Brix, que es el contenido de sólidos solubles tomados como referencia para repetir el experimento y verificar si existe repetibilidad en los resultados.

III.B. Método alternativo para elaboración de vinagre mediante el multistarter de kombucha

En la Figura 5 se observa el consumo de azúcares en los mostos de mango por el multistarter de *kombucha*, los cuales disminuyen hasta el día 26, momento a partir del cual los valores de sólidos solubles no muestran variaciones significativas, indicando el final de la bio-acidificación.

El método tradicional o método Orleans (Figura 3) tomó tan solo 14 días para finalizar el consumo de azúcares del medio, mientras que con el SCOBY de *kombucha* el tiempo para alcanzar la finalización de la acidificación fue casi el doble, lo que se justifica en el hecho de que en el SCOBY pueden convivir hasta más de 20 especies diferentes de microorganismos entre levaduras y bacterias [11]–[13], las cuales además de metabolizar de manera simultánea los azúcares para producir la bio-acidificación (Figura 2) también deben aumentar su población, lo que se evidencia en la capa de celulosa que se forma en la interfaz medio-aire [16], que es la que les brinda el soporte para poder llevar a cabo su metabolismo.

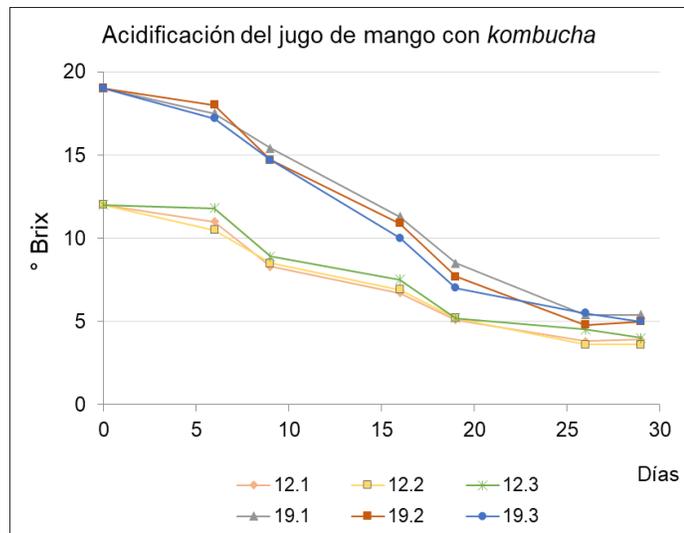


Fig. 5 Evolución de los sólidos solubles (°Brix) en los mostos de 12 y 19 °Brix durante la acidificación del jugo de mango con el multistarter (SCOBY) de *kombucha*.

Respecto a la acidez generada por el SCOBY, en la Figura 6 se evidencia que el nivel de bio-acidificación, al igual que en el caso de las bacterias acéticas (Figura 4), guarda relación con el contenido de azúcares en el mosto de partida.

No obstante, en el caso del mosto de 19 °Brix, se alcanza los 50 g/L de acidez total a partir del día 35, es decir que comparado con el método tradicional (método Orleans) de elaboración de vinagre, la utilización del SCOBY de *kombucha* puede permitir acortar los tiempos de bio-acidificación para la elaboración de vinagre de mango, dado que el proceso total del método Orleans (figuras 3 y 4) toma en torno a 39 días (fermentación alcohólica: 14 días + fermentación acética: 25 días) para alcanzar una acidez de 50 g/L.

La ventaja del uso del SCOBY es que de manera simultánea se realizan la fermentación alcohólica (por las levaduras) y la fermentación acética (por las bacterias) [16].

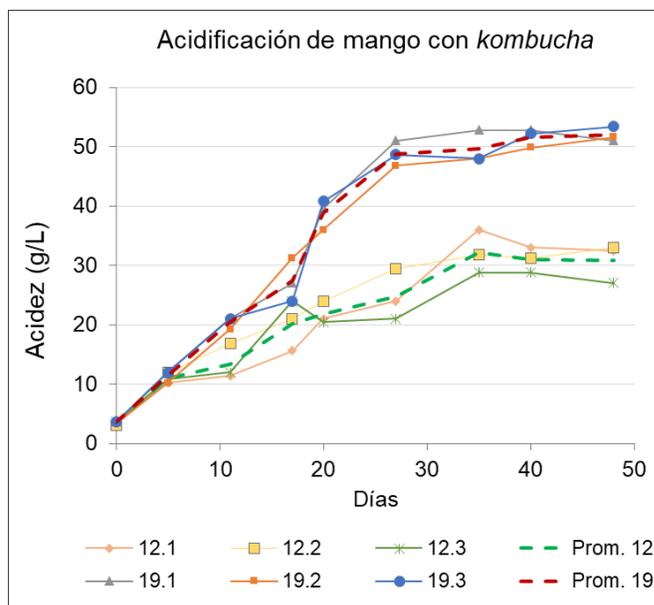


Fig. 6 Proceso de acidificación de los mostos de mango de 12 y 19 °Brix con el multistarter (SCOBY) de *kombucha*. Las líneas discontinuas representan el promedio.

III.C. Producción de vinagres a partir de los mostos con mayor contenido de azúcares (19 °Brix)

En base a los resultados previos, se realizó otra corrida experimental, pero usando solamente el mosto de 19 °Brix, dado que fue el único mosto que permitió alcanzar los 50 g/L de acidez en los vinagres obtenidos.

En la Figura 7 se observa la misma tendencia en la bio-acidificación de la prueba anterior por el método tradicional (método Orleans) (Figura 4) y con el uso del SCOBY de *kombucha* (Figura 6).

En el caso del método tradicional se alcanza los 50 g/L de acidez en torno a los 34 días (Figura 7a), tiempo mayor al obtenido con la prueba anterior (25 días, Figura 4). No obstante, es un tiempo similar al reportado previamente (32 días) por Hidalgo et al. [21]. Esta variación en el tiempo de bio-acidificación por las bacterias acéticas puede estar relacionado con el contenido de nutrientes en el medio fermentativo, el cual a su vez depende de la materia prima

utilizada, considerando que el mango para la última prueba fue adquirido en un momento diferente respecto a la primera prueba. De modo que la composición de cada lote de materia prima es diferente, a pesar de tener similares valores de sólidos solubles.

Por su parte, la bio-acidificación con el SCOBY de *kombucha* alcanzó los 50 g/L de acidez a los 42 días (Figura 7b), un tiempo mayor a la prueba anterior (35 días, Figura 6). No obstante, sigue siendo un tiempo menor al tiempo total empleado para elaborar el vinagre por método tradicional de 48 días (fermentación alcohólica: 14 días + fermentación acética: 34 días) para alcanzar la acidez de 50 g/L. Lo que evidencia que el uso del multistarter de *kombucha* (SCOBY) puede ser una interesante alternativa para la elaboración de vinagre de mango, al requerir un menor tiempo respecto al método tradicional, ampliamente utilizado a nivel industrial.

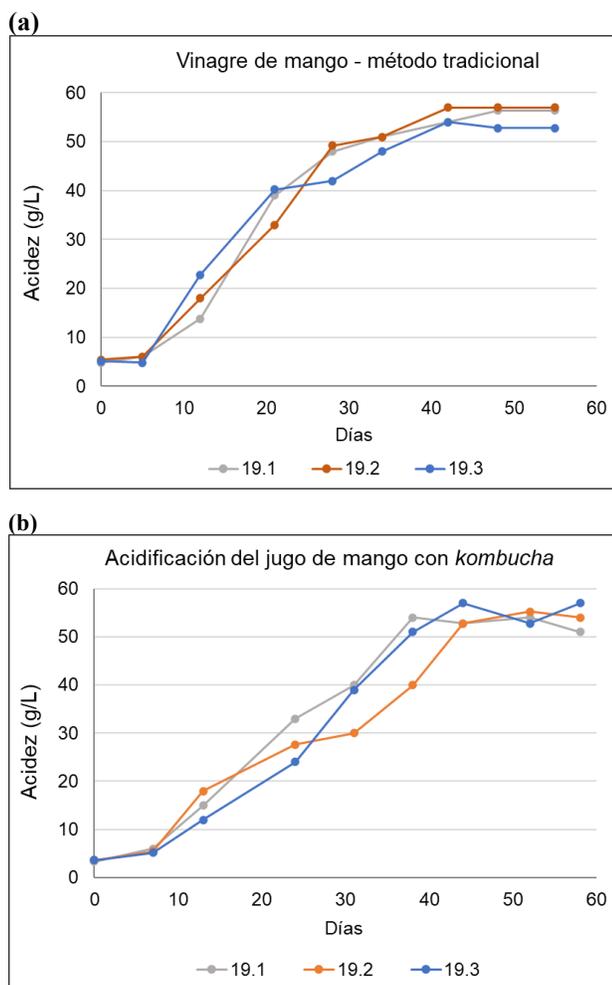


Fig. 7 Elaboración de vinagres. (a) Método tradicional (método Orleans o en superficie) a partir del vino de mango (obtenido del mosto de 19 °Brix). (b) Bio-acidificación del mosto de mango de 19 °Brix con el multistarter (SCOBY) de *kombucha*.

III.D. Efecto de la relación diámetro/altura del fermentador en la bio-acidificación del vinagre de kombucha

En la Figura 8 se puede observar la evolución de la acidez total en las fermentaciones llevadas a cabo en fermentadores con diferente relación diámetro/altura con el multistarter de *kombucha*, evidenciado el efecto de dicha relación a partir de la tercera semana, donde claramente se observa que en los fermentadores con mayor diámetro (D') la bio-acidificación se acelera hasta alcanzar los 50 g/L de acidez total a partir del día 26. Por su parte en los fermentadores con menor diámetro (d) se alcanza los 50 g/L de acidez total a partir del día 32.

Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente por Hidalgo et al. [21] respecto al área de contacto medio-aire, que, al ser mayor, permite una mayor síntesis de ácido (bio-acidificación) al haber un mayor intercambio de oxígeno hacia el medio fermentativo.

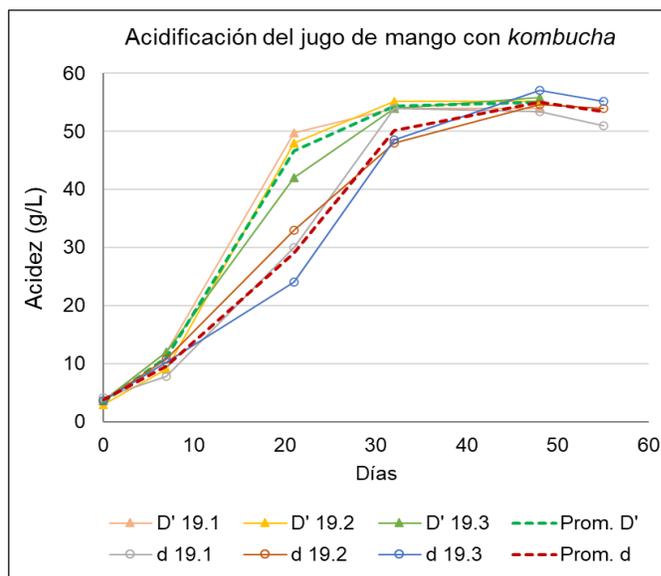


Fig. 8 Elaboración de vinagre mediante bio-acidificación del mosto de mango de 19 °Brix con el multistarter (SCOBY) de *kombucha* en fermentadores con relación diámetro/altura de 1.00/2.31 (d) y 1.00/1.04 (D'). Las líneas discontinuas representan el promedio.

Por su parte, en la Figura 9 se puede observar el contenido de compuestos fenólicos determinados en los vinagres elaborados a partir de los mostos de 19 °Brix, con el mayor contenido en el caso del vinagre elaborado por el método tradicional (Vt), el cual, no obstante, solamente muestra diferencia significativa con el vinagre de *kombucha* elaborado en el fermentador de mayor diámetro (KD'). Mientras que entre ambos vinagres de kombucha (KD' y Kd) no se obtuvieron diferencias significativas en el contenido de compuestos fenólicos. El menor contenido de fenoles en el vinagre KD' puede estar relacionado con una mayor degradación oxidativa de los compuestos fenólicos procedentes del mango, dado que el fermentador tiene un mayor diámetro (mayor área) de contacto con el aire.

Adicionalmente, en todos los casos, el contenido de fenoles totales fue menor al reportado previamente para la pulpa de mango, en torno a 2000 mg/kg ácido gálico [22].

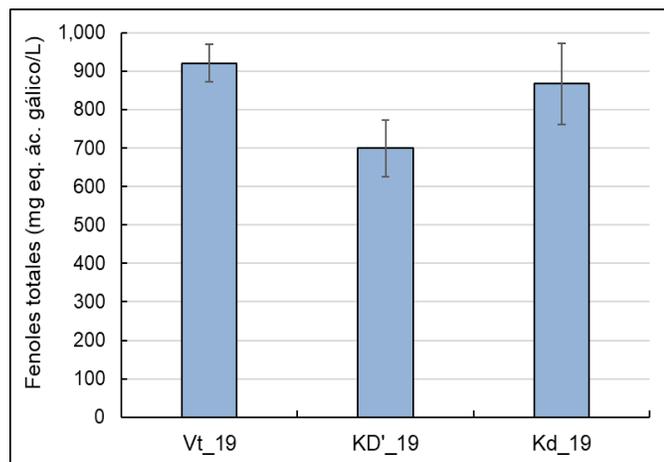


Fig. 9 Fenoles totales en los vinagres elaborados a partir de mosto de 19 °Brix por el método tradicional (Vt) y por la bio-acidificación con kombucha en los fermentadores con relación diámetro/altura de 1.00/1.04 (KD') y 1.00/2.31 (Kd).

Finalmente, lo reportado en el presente estudio constituyen resultados preliminares que se han centrado únicamente en el proceso de bio-acidificación, es decir, en la síntesis de ácido acético por los microorganismos usados. Parámetros como el contenido de compuestos aromáticos en el vinagre pueden verse afectados en función de si el proceso fermentativo es más o menos lento [23], [24], lo que deja abierta la posibilidad de más estudios futuros que permitan optimizar las condiciones bajo las cuales se pueda aprovechar adecuadamente las ventajas de usar el multistarter (SCOBY) de kombucha para la producción de vinagres, en un menor tiempo de bio-acidificación, pero aportando un adecuado perfil aromático, y permitiendo trasladar hacia el vinagre la mayor cantidad de compuestos bioactivos presentes en la materia prima, como es el caso de compuestos fenólicos, con demostrados beneficios sobre la salud humana [22], [25].

IV. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran la capacidad del multistarter (SCOBY) utilizado para la elaboración de kombucha como potencial inóculo para la bio-acidificación durante la elaboración de vinagre a base de pulpa de mango, alcanzando el contenido establecido por la normativa de referencia de 50 g/L de acidez total en periodos de tiempo de entre 26 y 42 días, mientras que el proceso tradicional de elaboración de vinagre (fermentación alcohólica + fermentación acética) puede tomar entre 39 y 48 días. No obstante, considerando que el presente estudio se ha enfocado en evaluar únicamente la síntesis de ácido acético o acetificación (bio-acidificación), otros parámetros de importancia en el vinagre como el contenido de compuestos

aromáticos y el perfil bioactivo deben ser considerados en futuros estudios que permitan optimizar las condiciones fermentativas, y así aprovechar las ventajas del multistarter kombucha para la producción de vinagres en un menor tiempo.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo forma parte del proyecto “Procesos fermentativos no convencionales para la elaboración de bebidas” de la Universidad Privada del Norte. Los autores agradecen al Laboratorio de Tecnología de Alimentos de la Universidad Politécnica de Madrid, España, por facilitar el cultivo acético para la elaboración de los vinagres. Así mismo, agradecen al Ing. Alonzo Viera Moreno del Laboratorio de Producción de la Universidad Privada del Norte, campus San Isidro, Trujillo, por su asistencia técnica en la ejecución de las pruebas experimentales.

REFERENCIAS

- [1] Agraria.pe, “Próxima campaña de mango en Perú sumará nueva producción del valle de Olmos,” *Agencia Agraria*, 2022. <https://agraria.pe/noticias/proxima-campana-de-mango-en-peru-sumara-nueva-produccion-del-28589>.
- [2] N. H. Budak, E. Aykin, A. C. Seydim, A. K. Greene, and Z. B. Guzel-Seydim, “Functional properties of vinegar,” *J. Food Sci.*, vol. 79, no. 5, pp. R757–R764, 2014, doi: 10.1111/1750-3841.12434.
- [3] R. Vejarano, A. Morata, I. Loira, M. C. González, and J. A. Suárez-Lepe, “Theoretical considerations about usage of metabolic inhibitors as possible alternative to reduce alcohol content of wines from hot areas,” *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 237, no. 3, pp. 281–290, 2013, doi: 10.1007/s00217-013-1992-z.
- [4] R. Vejarano and A. Gil-Calderón, “Commercially available non-Saccharomyces yeasts for winemaking: Current market, advantages over Saccharomyces, biocompatibility, and safety,” *Fermentation*, vol. 7, no. 3, p. 171, 2021, doi: 10.3390/fermentation7030171.
- [5] L. C. Corrales, D. M. Antolinez Romero, J. A. Bohórquez Macías, and A. M. Corredor Vargas, “Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta,” *Nova*, vol. 13, no. 24, pp. 55–81, 2015, doi: 10.22490/24629448.1717.
- [6] M. T. Fernández-Ponce, B. R. Parjikolaei, H. N. Lari, L. Casas, C. Mantell, and E. J. Martínez de la Ossa, “Pilot-plant scale extraction of phenolic compounds from mango leaves using different green techniques: Kinetic and scale up study,” *Chem. Eng. J.*, vol. 299, pp. 420–430, 2016, doi: 10.1016/j.cej.2016.04.046.
- [7] N. Saichana, K. Matsushita, O. Adachi, I. Frébort, and J. Frébortova, “Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, no. 6, pp. 1260–1271, 2015, doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.001.
- [8] I. Ozturk *et al.*, “Antioxidant, antimicrobial, mineral,

- volatile, physicochemical and microbiological characteristics of traditional home-made Turkish vinegars,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 63, no. 1, pp. 144–151, 2015, doi: 10.1016/j.lwt.2015.03.003.
- [9] J. M. Kapp and W. Sumner, “Kombucha: a systematic review of the empirical evidence of human health benefit,” *Ann. Epidemiol.*, vol. 30, pp. 66–70, 2019, doi: 10.1016/j.annepidem.2018.11.001.
- [10] J. Martínez Leal, L. Valenzuela Suárez, R. Jayabalan, J. Huerta Oros, and A. Escalante-Aburto, “A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites,” *CYTA - J. Food*, vol. 16, no. 1, pp. 390–399, 2018, doi: 10.1080/19476337.2017.1410499.
- [11] I. Sá-Correia, J. F. Guerreiro, M. C. Loureiro-Dias, C. Leão, and M. Côrte-Real, “Zygosaccharomyces,” in *Encyclopedia of Food Microbiology*, Second., C. A. Batt and M. L. Tortorello, Eds. Academic Press, 2014, pp. 849–855.
- [12] Y. Yamada *et al.*, “Description of Komagataeibacter gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae),” *J. Gen. Appl. Microbiol.*, vol. 58, no. 5, pp. 397–404, 2012, doi: 10.2323/jgam.58.397.
- [13] A. Ebrahimi Pure, S. M. Ghods Mofidi, F. Keyghobadi, and M. Ebrahimi Pure, “Chemical composition of garlic fermented in red grape vinegar and kombucha,” *J. Funct. Foods*, vol. 34, pp. 347–355, 2017, doi: 10.1016/j.jff.2017.05.018.
- [14] K. Neffe-Skocińska, B. Sionek, I. Ścibisz, and D. Kołożyn-Krajewska, “Acid contents and the effect of fermentation condition of Kombucha tea beverages on physicochemical, microbiological and sensory properties,” *CyTA - J. Food*, vol. 15, no. 4, pp. 601–607, 2017, doi: 10.1080/19476337.2017.1321588.
- [15] R. Jayabalan, S. Marimuthu, and K. Swaminathan, “Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation,” *Food Chem.*, vol. 102, no. 1, pp. 392–398, 2007, doi: 10.1016/j.foodchem.2006.05.032.
- [16] S. A. Villarreal-Soto, S. Beaufort, J. Bouajila, J. P. Souhard, and P. Taillandier, “Understanding kombucha tea fermentation: A review,” *J. Food Sci.*, vol. 83, no. 3, pp. 580–588, 2018, doi: 10.1111/1750-3841.14068.
- [17] V. Diaz-Silva and R. Vejarano, “Novel kombucha-analogue beverages made from Peruvian-pepper, matico and cedron: Bioactive and sensory profiles,” in *Proceedings of the LACCEI international Multi-conference for Engineering, Education and Technology*, 2020, p. 107, doi: 10.18687/LACCEI2020.1.1.107.
- [18] P. Domizio, L. Lencioni, L. Calamai, L. Portaro, and L. F. Bisson, “Evaluation of the yeast *Schizosaccharomyces japonicus* for use in wine production,” *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 69, no. 3, pp. 266–277, 2018, doi: 10.5344/ajev.2018.18004.
- [19] OIV, “Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. Volume I.” International Organization of Vine and Wine (OIV), Geneva (Switzerland), 2018, [Online]. Available: <https://www.oiv.int/public/medias/7372/oiv-compendium-volume-1-2020.pdf>.
- [20] OENO 52, “Determinación del contenido de acidez total.” Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), Paris, 2000, [Online]. Available: <https://www.oiv.int/public/medias/2804/oeno-52-2000-1.pdf>.
- [21] C. Hidalgo *et al.*, “Effect of barrel design and the inoculation of *Acetobacter pasteurianus* in wine vinegar production,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 141, pp. 56–62, 2010, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.018.
- [22] A. Corrales-Bernal, L. A. Urango, B. Rojano, and M. E. Maldonado, “Efectos in vitro e in vivo de la pulpa de mango (*Mangifera indica* cv. Azúcar) en la carcinogénesis de colon,” *Arch. Latinoam. Nutr.*, vol. 64, no. 1, pp. 16–23, 2014, [Online]. Available: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222014000100003.
- [23] W. Tesfaye, M. Lourdes Morales, M. C. García-Parrilla, and A. M. Troncoso, “Wine vinegar: Technology, authenticity and quality evaluation,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 13, no. 1, pp. 12–21, 2002, doi: 10.1016/S0924-2244(02)00023-7.
- [24] M. Lourdes Morales, W. Tesfaye, M. C. García-Parrilla, J. A. Casas, and A. M. Troncoso, “Evolution of the aroma profile of Sherry wine vinegars during an experimental aging in wood,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 11, pp. 3173–3178, 2002, doi: 10.1021/jf011313w.
- [25] R. Vejarano and M. Luján-Corro, “Red wine and health: Approaches to improve the phenolic content during winemaking,” *Front. Nutr.*, vol. 9, p. 890066, 2022, doi: 10.3389/fnut.2022.890066.