

**Efecto del método de fermentación acética en
las características físico-químicas y
sensoriales en vinagre de naranja agria
(*Citrus x aurantium*) y piña (*Ananas comosus*)**

**Carmen María Rodríguez Barahona
Cristina Isabel Sarabia Trujillo**

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2012

ZAMORANO
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Efecto del método de fermentación acética en
las características físico-químicas y
sensoriales en vinagre de naranja agria
(*Citrus x aurantium*) y piña (*Ananas comosus*)**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingenieras en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por:

**Carmen María Rodríguez Barahona
Cristina Isabel Sarabia Trujillo**

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2012

Efecto del método de fermentación acética en las características físico-químicas y sensoriales en vinagre de naranja agria (*Citrus x aurantium*) y piña (*Ananas comosus*)

Presentado por:

Carmen María Rodríguez Barahona
Cristina Isabel Sarabia Trujillo

Aprobado:

Jorge A. Cardona, Ph.D.
Asesor principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria Alimentaria

Mayra Márquez González, Ph.D.
Asesora

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

RESUMEN

Rodriguez Barahona C.M y C.I Sarabia Trujillo 2012. Efecto del método de fermentación acética en las características físico-químicas y sensoriales en vinagre de naranja agria (*Citrus x aurantium*) y piña (*Ananas comosus*). Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 32 p.

El vinagre es un producto proveniente de la fermentación acética del vino de frutas y posee usos alimenticios y medicinales. El objetivo del estudio fue comprobar el efecto de dos métodos de fermentación (Órleans y Órleans modificado) en las características físico-químicas y sensoriales de vinagre de naranja agria y piña utilizando los excedentes de producción de la zona norte de Honduras. Con este propósito, se usó tres niveles de aireación (0, 20 y 40 mL/min) por cada 100 mL de medio a fermentar. Se empleó un diseño experimental con bloques completos al azar, arreglo factorial 2×3, tres repeticiones y medidas repetidas en el tiempo en los días cero, tres, seis, nueve y 12 analizando acidez, concentración de azúcares y pH. Se midió concentración de compuestos fenólicos e índice de amarillez en vinagres condimentados. Cada tratamiento fue evaluado sensorialmente utilizando una prueba de aceptación con una escala hedónica y panelistas no entrenados. Se evaluaron características de color, aroma, sabor, acidez y aceptación general. La velocidad de producción de ácido acético fue afectada por la aireación, también la concentración de compuestos fenólicos, color y aceptación general de los vinagres. El vinagre de piña elaborado bajo el método tradicional obtuvo un costo de L.8.64/lb de vinagre condimentado. El método Órleans modificado produjo vinagre a un costo de L.9.00/lb. La cantidad de vinagre producida bajo el método modificado permite elaborar más tandas anuales de vinagre de menor calidad. Es recomendable aplicar el método modificado dependiendo del uso final del producto.

Palabras clave: Aireación, bacterias acéticas, método Órleans.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos	v
1 INTRODUCCIÓN	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS	3
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
4 CONCLUSIONES.....	19
5 RECOMENDACIONES.....	21
6 LITERATURA CITADA	22
7 ANEXOS.....	27

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Diseño experimental.....	7
2. Acidez titulable por volumetría (%) durante la fermentación acética según los niveles de aireación.	12
3. Velocidad de acetificación (g/L·h) durante la fermentación acética según los niveles de aireación.	12
4. Análisis de pH durante la fermentación acética según los niveles de aireación.....	14
5. Concentración de azúcares expresado como °Brix (%) durante la fermentación acética según los niveles de aireación.	14
6. Rendimientos en porcentaje para métodos de fermentación acética según nivel de aireación.	16
7. Color analizado a vinagres condimentados según nivel de aireación.	16
8. Compuestos fenólicos para vinagres condimentados según los niveles de aireación.	17
9. Análisis de atributos sensoriales para vinagres condimentados según los niveles de aireación.	18
10. Análisis de costos variables para métodos vinagres condimentados según método de fermentación.	18
Anexos	Página
1. Metodología para elaboración de vino de naranja agria y piña.....	27
2. Características del vino de naranja agria y piña usado por repetición.	28
3. Formulación de vino de tomate.	28
4. Formulación de vino de naranja agria y piña.	28
5. Acidez del vinagre madre usado por repetición.	28
6. Bioreactor instalado para método de cultivo Órleans modificado.	29
7. Metodología para elaboración de vinagre de piña, naranja agria.	30
8. Formulación para vinagre condimentado.	31
9. Medio Frateur para crecimiento sobre etanol.....	31
10. Conglomerado de bacterias acéticas creciendo sobre medio Frateur.	31
11. Boleta para análisis sensorial de vinagre.....	32

1. INTRODUCCIÓN

El vinagre, cuyo significado se deriva del latín *vinum acre* (vino agrio) es un líquido proveniente de la fermentación acética del vino proveniente de frutas como la uva, manzana, naranja, banano entre otras. Puede ser empleado en la cocina como acentuador del sabor, ablandador de carne, agente medicinal, conservador natural de alimentos y agente de limpieza. El vinagre contiene entre 3-5% de ácido acético disuelto en agua, además de pequeñas cantidades de ácido tartárico y cítrico. Según la FDA (2012), en su estándar de identidad para vinagres lo define como la sustancia proveniente de la fermentación alcohólica y acética de jugos de fruta que contiene normalmente en exceso cuatro gramos de ácido acético por cada 100 mL.

Las bacterias provenientes del vinagre, también llamadas bacterias acéticas miembros del género *Acetobacter* se caracterizan por su habilidad de convertir el alcohol etílico (C_2H_5OH) en ácido acético (CH_3CO_2H) a través de una oxidación. El ácido acético se forma a partir de una reacción de cuatro pasos que envuelve la conversión de almidón a azúcares a través de amilasas, la conversión anaeróbica de azúcares a etanol por medio de fermentación con levaduras, la transformación de etanol a acetaldehído hidratado y la deshidrogenación por medio de aldehído deshidrogenasa para obtener como producto ácido acético (Chiang Tan 2005).

El proceso de acetificación incluye además de la conversión acética procedimientos tales como la filtración, clarificación, destilación y pasteurización a $74^{\circ}C$ antes de ser envasado. El vinagre juega un rol fundamental en la creación de productos como salsas, aderezos, salsas picantes entre otros. Esto ha promovido la demanda de sistemas que sean capaces de producir grandes cantidades de vinagre. Actualmente, la tecnología más común para la producción masiva de vinagre se basa en el método de cultivo sumergido junto con la percolación continua o también llamada proceso generador (Chiang Tan 2005).

La economía hondureña se encuentra básicamente sostenida en actividades como la agricultura y la manufactura, siendo que para 2010 el PIB alcanzó un valor de 290,991 millones de Lempiras de los cuales únicamente 49,650 millones de Lempiras correspondieron al sector de transformación manufacturera (BCH, 2010). La existencia de industrias que se dediquen a transformar los productos obtenidos de sector agropecuario se ha convertido en una creciente necesidad nacional que debe ser suplida mediante la creación de oportunidades en el sector agroindustrial. Según Guerra (2001) el 95% del vinagre consumido en Honduras es proveniente de la síntesis de petróleo lo cual es potencialmente cancerígeno dada la fuente de la cual procede. La misma Secretaría de Salud Pública de Honduras (1997) reconoce el riesgo eventual de consumir ácido acético,

sin embargo, hace una excepción a dicha cláusula al permitir la venta de este producto hasta no demostrar que exista una fuente suficiente de abastecimiento de vinagre para consumo nacional.

Anteriormente en Zamorano, Guerra (2001) realizó estudios para la evaluación de tres proporciones de vino/vinagre madre evaluando un modelo de percolación continua. Se midió el tiempo de acetificación y los porcentajes iniciales, intermedios y finales de ácido acético titulable para cada una de las mezclas. Se obtuvo como resultado que bajo las condiciones del sistema de percolación continua, no hubo diferencia significativa para los tratamientos. Sin embargo, se logró una eficiencia de conversión promedio de etanol a ácido acético de 52.3% y se redujo el tiempo de producción del método “Órleans” (40 días) a cuatro días con el método de percolación continua.

Sin embargo por cuestiones de altos costos en el método de percolación continua, el siguiente estudio persigue desarrollar un método Órleans modificado que permita desarrollar un vinagre de origen natural en un menor tiempo y menor costo que el método Órleans tradicional. Añadiendo así valor agregado al excedente de naranja agria y piña producido en la zona norte de Honduras. Además este documento abarca la creación de un vinagre condimentado a base de naranja agria (*Citrus x aurantium*) y piña (*Ananas comosus*), tomando en cuenta la evaluación física, química, sensorial y microbiológica de los mismos con el propósito de generar nuevos productos y aprovechar a través de la agroindustria la transformación de recursos en el país. Por ende los objetivos de este estudio son:

- Contrastar métodos de fermentación acética y verificar cual ofrece el vinagre con mejores características físico-químicas.
- Determinar la velocidad de acetificación para el método Órleans tradicional y método Órleans modificado.
- Señalar la concentración de las bacterias acéticas durante el periodo de fermentación.
- Determinar las características físico-químicas y sensoriales del vinagre de naranja agria y piña condimentados.
- Determinar costos variables en la producción de vinagre con método Órleans tradicional y modificado.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar del ensayo. El proceso de realización de vinagre se llevó a cabo en la Planta Hortofrutícola (PHF) de Zamorano. Los análisis microbiológicos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Análisis Microbiológico Zamorano y los análisis físicos y químicos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Análisis de Alimentos Zamorano, todos pertenecientes al Departamento de Agroindustria Alimentaria.

Elaboración de vino. La elaboración de vinagre inició con la obtención de vino de naranja agria y piña, para lo cual se procedió con la extracción de jugo de ambas frutas. La piña fue recibida y lavada con agua y jabón, se retiró la cáscara con la ayuda de un cuchillo y se colocó los pedazos de piña en recipientes que luego se someterían a licuado durante cuatro minutos; se utilizó una licuadora tipo industrial marca Heavy Duty Blender Warning Comercial. Posteriormente y con la ayuda de un colador, se procedió a filtrar el jugo retirando el afrecho para obtener jugo piña. Se trabajó con 17 kg de piña del cual se obtuvo 13.1 kg de jugo puro, 4.89 kg de cáscara, y 1.05 kg de afrecho.

La elaboración de vino de piña se hizo en base a la formulación de vino de tomate de la PHF haciendo uso de 4.5 kg de jugo de piña a 10.9 grados Brix estos se midieron a través de un refractómetro (Atago pocket PAL- α), 0.28% de acidez, 14.81 kg de agua, 5.06 kg de azúcar, 10.3 g de ácido cítrico, y 5.62 g de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Se mezcló el jugo con el agua y se midió la cantidad azúcar en 100 gramos de jugo (grados Brix). La lectura de la mezcla agua-jugo fue de 6.4°Brix.

El jugo se colocó en una marmita con capacidad para 50 kg y posteriormente se agregó el azúcar poco a poco, hasta alcanzar 22 °Brix, luego se agregó el ácido cítrico y se mezcló por unos minutos. Se esperó a que la mezcla llegase a 35°C y se inculó con la levadura para dar lugar a la fermentación alcohólica.

El vino se colocó en recipientes de cinco galones dejando 1/4 de los mismos sin llenar para evitar derrames durante la fermentación. Se colocó una manga de plástico en el orificio de entrada del recipiente, asegurándola con una abrazadera plástica. Del otro extremo de la manga, se colocó un recipiente con cloro (200 ppm) para evitar la entrada de microorganismos, insectos o agentes extraños durante la fermentación.

El proceso para la obtención de vino de naranja agria fue el mismo, con la diferencia de que no se adicionó ácido cítrico debido a que la naranja posee aproximadamente 0.5-3.5 g de ácido cítrico/100 mL de jugo (Kelebek *et al.* 2009). Se usó 4.5 kg de jugo de naranja agria a 19.8°Brix, y 1.54% de acidez, al mezclar el jugo con el agua se llegó a 4.7°Brix.

Al igual que con el vino de piña, se agregó el azúcar hasta llevarlo a 22.5° Brix finales para ser inoculado posteriormente con levadura y dar paso a la fermentación alcohólica. La fermentación se sostuvo 12 días, tiempo durante el cual se realizaron mediciones cada dos días de potencial de alcohol, concentración de azúcares, pH y ATECAA (Acidez Titulable Expresada como Ácido Acético). El vino resultante de la fermentación acética se llevó hasta un porcentaje entre 10-12% debido a que las bacterias acéticas toleran únicamente un 15% de etanol (Luh 1991).

Potencial de alcohol y porcentaje de alcohol. La medición del potencial de alcohol se basa en el hecho de que la densidad (o peso específico) de una solución hidroalcohólica, disminuye de manera inversamente proporcional a la cantidad de alcohol que contiene (Hidalgo 2010). Es decir que mientras más alcohol contenga la solución, menor será su densidad esto se puede medir por medio de un densímetro o también llamado alcoholímetro de Gay Lussac.

La medición se realizó de la siguiente manera: se colocó vino hasta llenar una probeta de 250 mL, se introdujo el alcoholímetro de forma vertical dejando que flote libremente, se tomó la medida en el punto donde el alcoholímetro intercepta el nivel de superficie del líquido. Posterior a realizar la medición, se calculó el porcentaje de alcohol del vino de naranja y piña usando la ecuación 1 por medio de la diferencia entre el potencial de alcohol inicial y final.

$$\% \text{ alcohol} = \text{alcohol potencial inicial} - \text{alcohol potencial final} \quad [1]$$

Elaboración de vinagre. Al finalizar fermentación alcohólica, se inició la fermentación acética donde se probaron los dos métodos producción Órleans y Órleans modificado. El método Órleans es el método lento de acetificación de vino y ha sido usado en Francia desde 1670. Por su origen, este método es comúnmente llamado francés u Órleans. Esta técnica consiste en el llenado de barriles de madera, acero ó plástico con aproximadamente $\frac{3}{4}$ de vino que es inoculado con bacterias acéticas para lograr la fermentación. La velocidad de acetificación dependerá mayormente de factores como la temperatura (20-25°C), el tipo de baterías utilizadas (*Acetobacter* o *Gluconobacter*), la superficie de contacto con la atmósfera y el porcentaje de alcohol inicial del vino (Morales *et al.* 2001).

En este método, el cultivo reposa sobre la fase líquida en la cual las bacterias hacen intercambio gaseoso con el oxígeno del ambiente. La función de agregar el cultivo fresco es acidificar el líquido hasta el punto óptimo de crecimiento para las bacterias (Chiang Tan 2005). En dicho punto se forma una capa gelatinosa en la superficie del líquido y esto indica el asentamiento y estabilización de los microorganismos. El tiempo de fermentación es cerca de uno a tres meses en seguida de los cuales se puede cosechar entre 25 y 35% de vinagre para ser sustituido luego por la misma cantidad de vino.

La tecnología más común para la fabricación de vinagre comercial es la de cultivo sumergido (Chiang Tan 2005) a la cual se le han hecho modificaciones de aireación,

calentamiento y movimiento. Este método permite obtener vinagres con un alto grado de ácido acético en periodos muy cortos de tiempo, esto ya que las bacterias se encuentran en contacto con el aire todo el proceso provocando una oxidación más rápida de etanol a ácido acético. Tomando en cuenta estas modificaciones se aplicó aireación al método Órleans tradicional por medio de un compresor para mejorar dicho método y optimizarlo. Sin embargo, esta rápida acetificación puede tener grandes consecuencias en la composición volátil del vinagre afectando la calidad final del producto (Vegas 2010).

Durante el experimento existieron condiciones de temperatura alrededor de $29 \pm 2^\circ\text{C}$ para los meses de Julio a Septiembre 2012. Se trabajó con vino de naranja agria y piña con aproximadamente 10-12% de alcohol, y 15.6 °Brix. Se inoculó 4.33 kg de vino con 1.08 kg vinagre madre hecho a base de jugo de tomate, procedente de la PHF. La mezcla de vino y vinagre madre se hizo con una relación 75:25 para cada uno de los tratamientos de acuerdo a experimentos anteriormente realizados por Guerra (2001). En la superficie del contenedor de fermentación se colocó una malla plástica de (546 cm²) sobre la que flotaba cultivo madre (105 g) de apariencia clara, gelatinosa y gruesa.

El propósito de colocar dicha malla fue de ofrecer soporte al cultivo madre que necesita estar en contacto permanente con la fase gaseosa. Esto se debe a que las bacterias acéticas son aeróbicas estrictas. El suministro de oxígeno es fundamental para la elaboración de vinagre considerando que se debe tener una concentración ideal de 2 mg/L de oxígeno disuelto y un volumen de aire mínimo de 50 mL/min para 100 mL de medio, lo que equivale a 0.5 vvm que consiste en el volumen de aire introducido por unidad de volumen de fermentador por minuto (De Ory *et al.* 2002).

Para suplir la demanda de oxígeno de las bacterias se colocaron dos compresores de aire HETO SK 9830 que inyectaron diferentes volúmenes para llevar a cabo la técnica de Órleans modificado. Los volúmenes suministrados fueron de 0.20 vvm y 0.40 vvm para cuatro de los tratamientos usados en el experimento comparados con el método convencional de Órleans sin aireación adicional. Se realizaron mediciones de ATECAA, concentración de azúcares y pH cada tres días en los días cero, tres, seis, nueve y 12, para dar seguimiento. Al llegar al día 12 se estandarizaron los vinagres a 3.5% de acidez para ser posteriormente condimentados con la formulación de la PHF.

Método de calibración de compresor de aire. Para realizar la calibración de los compresores que suministraron el aire se hizo uso del método para medir la aireación en sistemas de producción acuícola desarrollado por Meyer (2012).

El método se replicó a escala usando un balde de 20 L y un recipiente con tapadera de 360 mL. Se sumergió el recipiente (sin tapa) lleno de agua dentro del balde, luego se introdujo la manguera con aireación durante 10 segundos. El frasco fue tapado aún estando dentro del agua, se retiró del balde y se midió el volumen de agua desplazado con una probeta hasta rellenar el frasco completamente con agua. Para obtener los mL de aire que expulsó el compresor en 10 segundos se hizo uso de la ecuación 2.

$$\text{Caudal de aire suministrado} = \frac{\text{mL de agua desplazados}}{10 \text{ segundos}} \quad [2]$$

Medio Frateur para crecimiento sobre etanol. Para determinar la concentración de las bacterias acéticas durante la fermentación se realizaron siembras durante los días cero, tres, seis, nueve y 12 sobre platos con medio de crecimiento Frateur usando la técnica de vertido con diluciones 10^0 y 10^{-1} (De Ley *et al.* 1984). La preparación del medio de crecimiento sobre etanol consistió en añadir tres gramos de extracto de levadura Criterion®, seis gramos de carbonato de calcio J.T Baker® y seis gramos de Agar Cole-Parmer® en 300 mL de agua estéril, se agitó durante 20 minutos en un plato de calentamiento a 400 rpm. El medio se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. Luego de esto se añadió 15 mL de etanol al 100% y se repartió en placas de crecimiento las cuales se mantuvieron en incubación a 35°C durante tres días. Las proporciones de los ingredientes utilizados para la elaboración de este medio fueron tomadas de estudios realizados anteriormente por De Ley *et al.* (1984). La producción de ácido acético se manifiesta por la formación de un área clara alrededor de las colonias. De Ley *et al.* (1984) además indica que la población de *Gluconobacter* permanece de esta forma mientras que *Acetobacter* vuelve a depositar carbonato cálcico desde el borde de la colonia hacia el área clara.

Acidez titulable por volumetría (AOAC 930.35). El método se basa en determinar el volumen de hidróxido de sodio (NaOH 0.1N) necesario para neutralizar el ácido contenido en la alícuota que se titula determinando el punto final por medio del cambio de color que se produce en presencia del indicador ácido-base empleado, esta técnica se ha utilizado en estudios antes realizados por Ough y Amerine (1987). Brevemente, se colocó 1 mL de vinagre a titular en un matraz Erlenmeyer, se adicionó 30 mL de agua destilada y se agregó tres gotas de fenolftaleína (1%). Se procedió a agregar gota a gota el NaOH hasta que el líquido tomó un color rosa pálido. El volumen de NaOH utilizado se introdujo en la ecuación 3 para determinar de esta manera el porcentaje de acidez en el cual se encontraba el vinagre.

$$\% \text{ Acidez} = \text{NaOH } 0.1N * \text{mL de NaOH usados} * 6 \quad [3]$$

Determinación de la velocidad de acetificación. La velocidad de acetificación se obtuvo con las mediciones cada tres días de acidez titulable expresada como ácido acético (ATECAA) a lo largo del experimento. Se realizó el cálculo mediante la ecuación [4] que toma en cuenta el cambio de acidez a través del tiempo. Los resultados fueron expresados en unidades de g/L·h (Llaguno y Polo 1991)

$$\text{Velocidad de acetificación} = \frac{A_2 - A_1}{t_2 - t_1} \quad [4]$$

Dónde:

A₂- A₁= cambio de acidez.

t₂ - t₁ = tiempo transcurrido para el cambio de acidez.

Determinación de pH. La sigla pH significa Potencial Hidrógeno y es una medida de acidez o alcalinidad de una solución (Prichard 2003). Tiene una escala de 0-7, con valores siete como neutro, menor que siete ácidos, y mayor a siete básico. Este indicador se midió con un potenciómetro Thermo Scientific Orion 5 Star, cada tres días para controlar el pH de la solución en el bioreactor, la calibración se realizó introduciendo el electrodo en el líquido calibrador pH 4, posteriormente se enjuagó con agua destilada para ser introducido en el líquido calibrador pH 7. El procedimiento de medición de muestras consistió en limpiar con agua destilada el potenciómetro antes y después de hacer cada lectura y se introdujo el potenciómetro dentro de la muestra esperando a que la lectura se estabilizara para tomar el dato de pH indicado.

Medición de concentración de azúcares. El procedimiento para esta medición consiste medir la refractometría a través del principio de que un grado Brix equivale a un gramo de azúcar en 100 gramos de jugo (Lozano 2006). Se colocó una pequeña cantidad de muestra (300 μ L) en un refractómetro (Atago, Pocket PAL- α), se pulsó el botón de inicio para posteriormente tomar la lectura que aparece en la pantalla del refractómetro. Los resultados fueron reportados en porcentaje de sólidos solubles de agua, (grados Brix).

Determinación de rendimientos de métodos de fermentación acética. El rendimiento se midió como la relación entre los kg de mezcla final y los kg de mezcla inicial (ecuación 5). Esta medida se tomó con los pesos del día inicial (día cero) y final (día 12) del tiempo de fermentación. El propósito de esta medida fue obtener la cantidad de alcohol que las bacterias pudieron convertir a ácido acético. Los resultados se expresaron en porcentaje de rendimiento.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{kg de mezcla final}}{\text{kg de mezcla inicial}} \times 100 \quad [5]$$

Análisis estadístico. Se utilizó un Diseño de Bloques Completos al Azar (BCA) con arreglo factorial y medidas repetidas en el tiempo para obtener la diferenciación entre dos métodos; Órleans (0 vvm) y Órleans modificado con dos volúmenes de aire (0.20 vvm y 0.40 vvm). Además, se evaluaron dos fuentes de materia prima (naranja agria y piña) para obtener seis tratamientos con tres repeticiones cada uno para un total de 18 unidades experimentales. El análisis estadístico de los datos se realizó a través del programa SAS® mediante un ANDEVA y separación de medias por mínimos cuadrados (Cuadro 1).

Cuadro 1. Diseño experimental

Fruta	Aireación		
	0 vvm ¹	0.20 ² vvm	0.40 ² vvm
Naranja agria	T1	T2	T3
Piña	T4	T5	T6

¹Volumen de aireación por volumen de fermentador por minuto. ²20mL/min y 40mL/min por cada 100 mL de medio a fermentar.

Índice de amarillez. El índice de amarillez ASTM E313 indica como el fluido a ser analizado es diferente del blanco ideal en el sentido del amarillo, así cuando la diferencia desde el blanco ideal aumenta el índice de la escala amarillo/azul también se ve aumentada. Para efecto de este estudio el índice de amarillez fue calculado para evaluar la amarillez de los vinagres condimentados. En el cálculo de este índice se utilizaron los valores de la escala CIE L y b (ASTM 2003).

$$IA = 142.86 \frac{b^*}{L^*} [6]$$

Colorimetría total de compuestos fenólicos. La colorimetría de compuestos fenólicos permite conocer la cantidad de taninos contenidos en vinos y espíritus así como en vinagres derivados de vinos (López 2002). Está basada en el uso del reactivo Folin Ciocalteu el cual es una mezcla de ácidos de color amarillo (fosfowolfrámico y fosfomolibdico). Los compuestos contenidos en dicha solución se reducen al entrar en contacto con los fenoles de la muestra a analizar creando óxido de wolframio y molibdeno, luego estos compuestos son analizados a través de espectrofotometría con una longitud de onda no mayor a 765 nm (Ainsworth y Gillespie 2007).

Para la realización de este análisis se hizo uso de una solución saturada de carbonato de sodio (Na_2CO_3), el reactivo Folin Ciocalteu 0.25N, solución de ácido gálico a 750 ppm y agua destilada. Se preparó una curva estándar (100 μL / tubo) a través de una dilución serial del ácido gálico comenzando desde 750 ppm hasta 0 ppm (blanco preparado con agua destilada). Se hizo una dilución 1:1 muestra agua destilada para cada muestra de vinagre condimentado a analizar y se usó 100 μL por tubo de dilución. Se agregó 1 mL de Folin Ciocalteu, se agitó y esperó durante tres minutos. Se adicionó 1 mL de solución de carbonato de sodio, se agitó y esperó durante siete minutos. Para finalizar, se añadieron 5 mL de agua destilada y se esperó una hora para tomar lectura en el espectrofotómetro Spectronic® Genesys™ 5 a 726 nm. Los resultados fueron expresados en mg/L de equivalentes de ácido gálico.

Coliformes totales. Previo a realizar las pruebas sensoriales se llevó a cabo siembras microbiológicas sobre medio Agar de Bilis y Rojo Violeta (VRBA) para hacer conteos de coliformes totales. Los platos fueron sembrados mediante la técnica de vertido con tres diluciones 10^0 10^{-1} y 10^{-2} para todas las muestras de vinagre y fueron incubados a 35°C durante 48 horas.

Análisis sensorial. Se realizaron pruebas de aceptación a través de una escala hedónica de nueve puntos en tres sesiones sensoriales en las que se reclutó 30 panelistas no entrenados. Se hizo uso de rebanadas de pepino como vehículo para el vinagre. Los parámetros de evaluación fueron: color, sabor, acidez, aroma y aceptación general. Cada panelista evaluó los seis tratamientos bajo los parámetros anteriores, se utilizó un diseño de bloques completos al azar (BCA) con arreglo factorial. Los resultados se analizaron en

el programa SAS® mediante un ANDEVA y separación de medias por mínimos cuadrados.

Análisis de costos variables. Se realizó un análisis de costo marginal y un análisis de costo de oportunidad de inversión para el vinagre de naranja agria y piña condimentado. Se usó el “Software Microsoft Excel 2007” para los cálculos respectivos tomando en cuenta los costos variables por tanda de producción de 68.69 kg de vinagre condimentado, la inversión en Lempiras del equipo así como su respectiva depreciación.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas de crecimiento e identificación microbiológica. Mientras se llevó a cabo el experimento hubo numerosos intentos para lograr cuantificar los microorganismos iniciadores de la fermentación acética. Se realizaron pruebas de crecimiento sobre medio GYC (Glucose, Yeast, Carbonate) y medio Frateur, descritos por De Ley *et al.* (1984). El objetivo de realizar siembras bacterianas sobre ambos medios fue cuantificar los microorganismos acidófilos durante la fermentación acética. Sin embargo, dicho objetivo no pudo ser cumplido debido a que ambos medios resultaron inadecuados para el recuento de bacterias acéticas en vinagres. Ambos medios resultan más propicios para la recolección de bacterias acéticas provenientes de vinos y mostos (Sokollek *et al.* 1998).

La recolección de bacterias acéticas especialmente aquellas con altos porcentajes de ácido acético (10-15%) es más efectiva en medios con doble capa de agar como el medio AE (ácido acético-etanol) y el medio RAE (ácido-acético etanol reforzado) (Entani *et al.* 1985; Sokollek y Hammes 1997). La baja capacidad cultivable de las bacterias acéticas ha sido anteriormente observada en estudios conducidos por Entani *et al.* (1985); Sievers *et al.* (1992) Sokollek *et al.* (1998); Trcek (2005); Ilabaca *et al.* (2008); Torija *et al.* (2010), en los que se reportó un comportamiento o estado “Viable pero no Cultivable” (VNC). El vinagre debido a su alto contenido de ácido acético, resulta un medio óptimo para las bacterias, cosa distinta de cuando se realizan siembras en placas de recuento en las que los medios de cultivo disponibles no replican las condiciones anteriormente descritas. Por otro lado, la formación de conglomerados de bacterias es muy común en crecimientos en placa por lo que hace más difícil su recuento sobre medios sólidos al formar una sola colonia (Ilabaca *et al.* 2008; Torija *et al.* 2010).

Los microorganismos en general se ven afectados por factores como la temperatura, pH, disposición de nutrientes, contenido de humedad entre otros (Bello 2000). Las condiciones que se proporcionaron a las bacterias acéticas durante su crecimiento en placas Petri fueron de una temperatura de incubación de 35°C y un pH del medio cercano a 7. Esto concuerda con información cotejada con Flanzky (2003) el que indica que existen especies de bacterias acéticas como *Acetobacter aceti* que tolera rangos de temperatura de 30-35°C. Además Hidalgo *et al.* (2010) asegura que las bacterias acéticas pueden desarrollarse en pH cercanos a la alcalinidad como 5 y 6. Sin embargo estas condiciones no contribuyeron al desarrollo óptimo del crecimiento en placa de las bacterias acéticas. Luego de los resultados microbiológicos obtenidos se dio paso al análisis del resto de las variables que se estudiaron a través del tiempo en que se desarrolló el experimento.

Acidez titulable por volumetría. La probabilidad estadística para la variable de acidez fue ($P < 0.05$) con un $R^2 = 0.86$ y un coeficiente de variación de 17.2%. Se revisó la probabilidad para la interacción de aireación, materia prima y día del experimento ($P = 0.03$) que indicó que tanto la aireación y el día del experimento influenciaron significativamente la materia prima. En el día cero se tuvo una marcada diferencia entre los tratamientos con naranja y piña como materia prima (Cuadro 2). Esto se debe a que la naranja agria contiene naturalmente ácidos orgánicos como el ácido cítrico y ácido málico que le confieren una particular acidez de hasta 13.9 mg/mL de ácido cítrico (Kelebek *et al.* 2009). A partir del día seis únicamente el tratamiento con método Órleans y piña como materia prima tuvieron una acidez baja comparada con el resto de los tratamientos, indicando que el hecho de no recibir aireación influyó significativamente en la generación de acidez de este vinagre. Al verificar los valores de acidez para el día 12 de todos los tratamientos se pudo observar que la media más alta pertenece al tratamiento de piña con 0.40 vvm de aireación ($5.07 \pm 0.27\%$). Esto coincide con el hecho que el factor aireación se considera fundamental para el procesamiento de vinagre de manera industrial ya que las bacterias acéticas requieren de un suministro adecuado de oxígeno para la metabolización adecuada de alcohol a ácido acético (Llaguno y Polo 1991). Además se pudo mostrar un incremento uniforme en la acidez de los tratamientos de naranja agria ($74.0 \pm 5.94\%$), mientras que para los tratamientos de piña la acidez en el día 12 fue desigual ya que únicamente el tratamiento piña método Órleans tradicional fue diferente. Esto se coteja con que el crecimiento de las bacterias acéticas se ve favorecido por la alta acidez encontrada en la naranja agria y que la aireación en los tratamientos de piña con menor acidez inicial jugó un papel significativo en el incremento de la producción de ácido acético.

Velocidad de acetificación. Se obtuvo una probabilidad de modelo ($P < 0.05$), y un $R^2 = 0.51$. Se pudo verificar que únicamente los tratamientos de piña con 0.20 y 0.40 vvm de aireación alcanzaron una velocidad de conversión de alcohol a ácido acético estadísticamente significativas con valores medios de 0.03 ± 0.005 y 0.05 ± 0.002 g/L·h de producción de ácido acético para el día nueve. Esto concuerda con estudios realizados por Ferreyra *et al.* (2012) en producción de vinagres de naranja en los que se alcanzó velocidades de acetificación de hasta 1.77 g/L·h para tratamientos con 0.6vvm a 25°C de temperatura y agitación de 400 rpm. El desarrollo de las bacterias se incrementó a lo largo del tiempo, siguiendo el comportamiento normal de la curva de crecimiento microbiano la cual según Morgan *et al.* (2001), consta de seis fases: la primera fase llamada Lag o de adaptación en la cual las bacterias se adecuan al medio para iniciar. La segunda fase de crecimiento acelerado se observa a partir del día tres para los tratamientos de 0.20 y 0.40 vvm, la fase exponencial o logarítmica donde la velocidad de crecimiento es máxima, y se da el consumo rápido de nutrientes en el medio, etapa que se presentó en el día seis de fermentación, la cuarta fase es el crecimiento desacelerado donde las bacterias ya no se reproducen con igual velocidad. La quinta fase, estacionaria, las bacterias llegan a su estabilidad de reproducción y el número de células viables permanece constante. La sexta fase o muerte en la que sucede la muerte de las bacterias y un descenso en la curva de crecimiento fenómeno para este experimento al día 12 de fermentación únicamente para el vinagre de piña con 0.40 vvm de aireación (Cuadro 3).

Cuadro 2. Acidez titulable por volumetría (%) durante la fermentación acética según los niveles de aireación¹.

Fruta	Nivel de aireación vvm ²	Días de fermentación				
		0	3	6	9	12
		Media ± D.E. ³	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.
Naranja agria	0.00	2.54 ± 0.40 ^{A(w)}	2.78 ± 0.33 ^{A(wx)}	2.94 ± 0.51 ^{A(wx)}	3.46 ± 0.87 ^{B(xy)}	4.28 ± 1.62 ^{A(x)}
	0.20	2.54 ± 0.39 ^{A(w)}	2.78 ± 0.43 ^{A(wx)}	3.42 ± 0.64 ^{A(xy)}	4.10 ± 1.30 ^{B(xy)}	4.58 ± 1.63 ^{A(z)}
	0.40	2.54 ± 0.39 ^{A(w)}	2.84 ± 0.22 ^{A(wx)}	3.38 ± 0.60 ^{A(xy)}	4.08 ± 1.33 ^{AB(yz)}	4.40 ± 1.3 ^{A(z)}
Piña	0.00	1.74 ± 0.37 ^{B(w)}	1.88 ± 0.31 ^{B(w)}	2.18 ± 0.58 ^{B(wx)}	2.55 ± 0.69 ^{B(wx)}	2.47 ± 0.4 ^{B(x)}
	0.20	1.74 ± 0.37 ^{B(w)}	1.85 ± 0.36 ^{B(wx)}	2.94 ± 1.10 ^{A(y)}	3.76 ± 0.92 ^{AB(y)}	4.60 ± 0.77 ^{A(z)}
	0.40	1.74 ± 0.37 ^{B(w)}	2.00 ± 0.71 ^{B(w)}	2.94 ± 0.20 ^{A(x)}	4.51 ± 0.38 ^{A(y)}	5.07 ± 0.27 ^{A(y)}
CV (%) ⁴		2.30	10.4	14.0	14.3	18.2

¹Medias con diferente letra mayúscula en cada columna, y con diferente letra minúscula en cada fila son significativamente diferentes (P<0.05). ²Volumen de aireación por volumen de fermentador por minuto. ³Desviación estándar. ⁴Coefficiente de variación.

Cuadro 3. Velocidad de acetificación (g/L·h) durante la fermentación acética según los niveles de aireación¹.

Fruta	Nivel de aireación vvm ²	Días de fermentación			
		3	6	9	12
		Media ± D.E. ³	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.
Naranja agria	0.00	0.009 ± 0.002 ^{A(w)}	0.003 ± 0.003 ^{C(w)}	0.014 ± 0.005 ^{B(w)}	0.019 ± 1.00 ^{A(w)}
	0.20	0.009 ± 0.003 ^{A(w)}	0.021 ± 0.003 ^{ABC(w)}	0.022 ± 0.009 ^{B(w)}	0.007 ± 0.01 ^{A(w)}
	0.40	0.011 ± 0.002 ^{A(w)}	0.020 ± 0.007 ^{ABC(w)}	0.024 ± 0.010 ^{B(w)}	0.006 ± 0.005 ^{A(w)}
Piña	0.00	0.005 ± 0.001 ^{A(w)}	0.007 ± 0.003 ^{BC(w)}	0.012 ± 0.003 ^{B(w)}	0.006 ± 0.002 ^{A(w)}
	0.20	0.006 ± 0.004 ^{A(wx)}	0.027 ± 0.011 ^{AB(w)}	0.003 ± 0.005 ^{B(wx)}	0.027 ± 0.002 ^{A(x)}
	0.40	0.004 ± 0.004 ^{A(x)}	0.037 ± 0.008 ^{A(wx)}	0.051 ± 0.002 ^{A(w)}	0.019 ± 0.008 ^{A(x)}
CV (%) ⁴		5.47	2.34	4.71	3.63

¹Medias con diferente letra mayúscula en cada columna, y con diferente letra minúscula en cada fila son significativamente diferentes (P<0.05). ²Volumen de aireación por volumen de fermentador por minuto. ³Desviación estándar. ⁴Coefficiente de variación.

pH. Para el análisis de la variable pH en los tratamientos de vinagre se obtuvo una ($P=0.002$) con un $R^2=0.56$ y un coeficiente de variación de 5.55%. No existió interacción entre los tres factores evaluados ($P=0.96$). Sin embargo, vistos por separado el día y la materia prima si tuvieron un efecto significativo en el cambio de pH de los tratamientos ($P<0.05$). La aireación, por el contrario, no tuvo influencia estadísticamente significativa en el descenso del pH de los vinagres. Todos los tratamientos redujeron su pH en un tiempo de 12 días desde valores aproximadamente de 3.4 a valores de 2.9 en los que descendió un 14.70% aproximadamente en todos los tratamientos (Cuadro 4). Estos datos concuerdan con otros estudios en los que se especifica que las bacterias acéticas pueden crecer incluso en condiciones de pH inferiores a 4 llegando a rangos de 2-2.2 (De Ley *et al.* 1984; Du Toit y Pretorius 2002). Además se pudo determinar que debido a que en las condiciones de pH 3 y un pK de 4.76 el 98% del ácido acético se encuentra disociado por lo cual a medida aumenta la acidez el pH de la solución bajará (Boatella 2004).

Concentración de azúcares expresado como °Brix. La probabilidad estadística para la variable de concentración de azúcares fue menor a 0.05 con un R^2 de 0.70 y un coeficiente de variación de 19.2% además de verificar estos indicadores se revisó la interacción de la aireación y el día junto con la materia prima la cual fue de 1.00, indicando que dichos factores no tuvieron influencia absoluta sobre la concentración de los azúcares presentes en el vinagre. Sin embargo, si existió una influencia directa en la fuente de materia prima ($P<0.05$) y día ($P<0.05$) como factores individuales. La aireación no tuvo ninguna influencia en la concentración de los azúcares presentes en la reacción de fermentación ($P=0.27$). Sin embargo, existieron cambios significativos en la concentración de sólidos solubles en todos los tratamientos debido a la concentración natural de azúcares en las frutas y el tiempo de acetificación. Los sólidos solubles aumentaron debido a la evaporación de componentes como el alcohol de ambos vinos (Cuadro 5). Esto concuerda con el hecho de que los alcoholes orgánicos junto con el resto de líquidos a fermentar por las bacterias son en su mayoría volátiles y la mezcla de estos será más o menos volátil dependiendo de la presión de vapor y la fracción molar de cada componente dentro de la mezcla. El volumen de alcohol decrece en el líquido y este descenso es mucho más pronunciado en composiciones azeotrópicas en las que la sustancia más volátil abandona la mezcla conforme pasa el tiempo (Hopkins *et al.* 2006).

Rendimiento de métodos de fermentación. Según los resultados en el análisis de rendimientos finales para los métodos de fermentación acética se obtuvo una probabilidad del modelo de 0.2481 un R^2 de 0.39 y un coeficiente de variación de 5.49%. se señala que no hubo diferencia estadísticamente significativa para el método Órleans tanto para naranja agria como para piña, además se puede comprobar que el tratamiento de piña con 0.40 vvm de aireación tuvo el rendimiento más bajo debido a la volatilización de etanol y otros líquidos volátiles presente en la mezcla. Ferreyra *et al.* (2012), reportan resultados en rendimiento para vinagres de naranja (*Citrus sinensis* var. W. Navel) con condiciones de aireación 0.3 vvm y 400 rpm de agitación rendimientos de hasta 94.07% de vinagre crudo cosechado (Cuadro 6). Luego de finalizado el tiempo de fermentación acética durante 12 días se procedió a condimentar los vinagres usando la formulación de la PHF y se estandarizó cada uno de los tratamientos a 3.5% de acidez. El pH promedio para los

Cuadro 4. Análisis de pH durante la fermentación acética según los niveles de aireación¹.

Frutas	Nivel de aireación vvm ²	Días de fermentación				
		0	3	6	9	12
		Media ± D.E. ³	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.
Naranja agria	0.00	3.22 ± 0.33 ^{B(wx)}	3.15 ± 0.20 ^{A(w)}	2.90 ± 0.05 ^{A(wx)}	2.82 ± 0.30 ^{BCD(x)}	2.98 ± 0.18 ^{A(wx)}
	0.20	3.04 ± 0.99 ^{B(w)}	3.01 ± 0.08 ^{A(wx)}	2.91 ± 0.05 ^{A(wx)}	2.77 ± 0.29 ^{CD(x)}	2.89 ± 0.23 ^{A(wx)}
	0.40	3.11 ± 0.13 ^{B(w)}	3.09 ± 0.17 ^{A(w)}	2.87 ± 0.06 ^{A(wx)}	2.76 ± 0.26 ^{D(x)}	2.87 ± 0.18 ^{A(wx)}
Piña	0.00	3.21 ± 0.18 ^{AB(w)}	3.05 ± 0.16 ^{A(w)}	3.02 ± 0.23 ^{A(w)}	3.04 ± 0.32 ^{A(w)}	3.17 ± 0.13 ^{A(w)}
	0.20	3.33 ± 0.28 ^{B(w)}	3.25 ± 0.10 ^{A(w)}	3.01 ± 0.10 ^{A(w)}	2.92 ± 0.19 ^{B(w)}	2.97 ± 0.19 ^{A(w)}
	0.40	3.38 ± 0.12 ^{A(w)}	3.08 ± 0.23 ^{A(x)}	3.06 ± 0.07 ^{A(x)}	2.89 ± 0.21 ^{BC(x)}	3.10 ± 0.16 ^{A(x)}
CV(%) ⁴		3.60	5.80	4.10	2.50	5.40

¹Medias con diferente letra mayúscula en cada columna, y con diferente letra minúscula en cada fila son significativamente diferentes (P<0.05). ²Volumen de aireación por volumen de fermentador por minuto. ³Desviación estándar. ⁴Coefficiente de variación.

Cuadro 5. Concentración de azúcares expresado como °Brix (%) durante la fermentación acética según los niveles de aireación¹.

Fruta	Nivel de aireación vvm ²	Días de fermentación				
		0	3	6	9	12
		Media ± D.E. ³	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.
Naranja agria	0.00	10.8 ± 4.20 ^{A(w)}	11.6 ± 3.02 ^{A(wx)}	11.5 ± 2.66 ^{A(wx)}	11.8 ± 1.93 ^{A(wx)}	13.8 ± 3.99 ^{A(x)}
	0.20	10.6 ± 4.25 ^{A(w)}	11.3 ± 3.09 ^{A(w)}	11.1 ± 3.18 ^{A(w)}	10.7 ± 2.99 ^{A(w)}	12.5 ± 4.94 ^{AB(w)}
	0.40	10.1 ± 4.57 ^{AB(w)}	11.3 ± 2.98 ^{AB(w)}	9.63 ± 4.27 ^{A(w)}	10.5 ± 3.23 ^{AB(w)}	12.4 ± 4.92 ^{A(w)}
Piña	0.00	8.06 ± 1.95 ^{B(w)}	8.80 ± 0.95 ^{BC(wx)}	8.73 ± 0.92 ^{A(wx)}	8.80 ± 0.96 ^{B(wx)}	11.1 ± 2.97 ^{AB(x)}
	0.20	7.90 ± 1.73 ^{B(x)}	8.56 ± 1.02 ^{C(x)}	8.23 ± 1.41 ^{A(x)}	8.76 ± 1.96 ^{B(x)}	10.7 ± 3.46 ^{AB(x)}
	0.40	8.06 ± 1.81 ^{B(x)}	8.26 ± 1.33 ^{C(x)}	8.96 ± 1.23 ^{A(x)}	7.90 ± 0.70 ^{B(x)}	9.40 ± 2.86 ^{B(x)}
CV (%) ⁴		15.6	14.6	19.5	17.4	17.7

¹Medias con diferente letra mayúscula en cada columna, y con diferente letra minúscula en cada fila son significativamente diferentes (P<0.05). ²Volumen de aireación por volumen de fermentador por minuto. ³Desviación estándar. ⁴Coefficiente de variación

vinagres condimentados de fue de 3.08 ± 1.22 . Luego de esto se analizó color a través del Colorflex Hunter Lab expresándose como índice de amarillez, se analizó la concentración de compuestos fenólicos a través del método de colorimetría de compuestos fenólicos y el análisis sensorial de dichas muestras.

Índice de amarillez. Este índice permitió hacer una relación entre las variables de L y b. Para la cuales se pudo observar una probabilidad del modelo ($P < 0.05$) un $R^2 = 0.42$ y un coeficiente de variación de 16.2%. Para las interacciones entre la materia prima y la aireación se tuvo una ($P = 0.39$) y para la materia prima y aireación por separado se tuvo probabilidades menores a 0.05. Al igual que para la variable b se tuvo que los vinagres con aireación 0.20 vvm y 0.40 vvm para naranja y 0.20 vvm de piña tuvieron valores de amarillez más altos que los vinagres elaborados bajo el método Órleans tradicional los cuales fueron menos amarillos que sus iguales elaborados bajo el método Órleans modificado (Cuadro 7). Esto concuerda con que la polifenol oxidasa presente en las frutas reacciona ante la presencia de oxígeno (Whitaker 1995). Los vinagres con aireación al tener una exposición a este gas en toda la matriz líquida incrementaron su amarillez debido a que el empardeamiento enzimático contribuyó a su aumento. En cambio los vinagres elaborados bajo el método Órleans tradicional mantuvieron únicamente un contacto superficial con la atmósfera lo cual permitió que el empardeamiento enzimático no fuera tan abrupto. Se pudo observar además que los vinagres de naranja agria y piña elaborados con método Órleans tradicional fueron estadísticamente significativos entre ellos ya que la naranja contiene α carotenos, β carotenos, criptoxantenos y luteína y la piña únicamente posee α carotenos en cantidades de $30 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ de pulpa (Mínguez *et al.* 2007) lo que le profiere a la naranja una coloración mas amarillenta.

Concentración de compuestos fenólicos. Se obtuvo una probabilidad del modelo ($P < 0.05$), coeficiente de variación de 7.40% y un R^2 de 0.84. Los datos de los compuestos fenólicos identificados en los vinagres de naranja agria y piña, indican que el tratamiento que posee mayor cantidad de dichos compuestos fue naranja agria con cero aireación (0 vvm), seguido del tratamiento de vinagre de piña con cero aireación (0 vvm). El tratamiento con menor contenido de compuestos fenólicos fue piña con 0.20 vvm de aireación (Cuadro 8). Esto se puede ratificar con estudios realizados anteriormente por García-Parrilla *et al.* (1997 y 1998) los cuales indican que la concentración de compuestos fenólicos en vinagres es representativa del método de elaboración utilizado, de igual manera la concentración de compuestos fenólicos es utilizada como un indicador de calidad en vinagres. (Gálvez *et al.* 1995).

Coliformes totales. Se realizó pruebas de coliformes en los vinagres de piña y naranja agria antes de realizar los análisis sensoriales, esto con el propósito de asegurar la inocuidad del producto. Se efectuó tres diluciones 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , y se obtuvo valores inferiores a 1 UFC/mL de vinagre. El vinagre al ser un alimento de pH ácido (< 4), solamente pueden crecer microorganismos ácido tolerantes como: mohos, levaduras,

Cuadro 6. Rendimientos en porcentaje para métodos de fermentación acética según nivel de aireación¹.

Fruta	Nivel de aireación vvm ²	Media ± D.E. ³
Naranja agria	0.00	95.5 ± 1.03 ^{A3}
	0.20	89.7 ± 4.94 ^{AB}
	0.40	88.7 ± 4.21 ^{AB}
Piña	0.00	94.1 ± 0.99 ^A
	0.20	88.0 ± 7.21 ^{AB}
	0.40	85.5 ± 7.10 ^B
CV (%) ⁴		5.50

¹Medias con diferente letra mayúscula en cada fila son significativamente diferentes (P<0.05).²Volumen de aireación por volumen de fermentador por minuto. ³Desviación estándar. ⁴Coefficiente de variación.

Cuadro 7. Color analizado a vinagres condimentados según nivel de aireación¹.

Fruta	Nivel de aireación vvm ⁶	L ²	a ³	b ⁴	IA ⁵
		Media ± D.E. ⁷	Media ± D.E	Media ± D.E	Media ± D.E
Naranja agria	0.00	60.2 ± 1.31 ^A	-0.37 ± 0.24 ^{BCD}	16.5 ± 0.70 ^C	39.2 ± 2.26 ^C
	0.20	53.4 ± 0.86 ^C	0.89 ± 4.42 ^A	18.5 ± 0.71 ^A	49.7 ± 3.72 ^A
	0.40	57.9 ± 4.56 ^{BC}	0.16 ± 0.70 ^{ABC}	17.6 ± 0.89 ^{AB}	43.9 ± 5.26 ^{AB}
Piña	0.00	64.9 ± 4.54 ^A	0.90 ± 0.35 ^D	15.2 ± 1.36 ^D	33.7 ± 5.07 ^D
	0.20	61.6 ± 10.8 ^{AB}	0.50 ± 2.26 ^{AB}	16.6 ± 2.07 ^{BC}	40.5 ± 13.4 ^{BC}
	0.40	55.1 ± 3.72 ^A	-0.59 ± 0.20 ^{CD}	17.1 ± 1.02 ^{BC}	44.3 ± 2.35 ^{AB}
CV(%) ⁸		9.30	1.70	7.10	16.2

¹Medias con diferente letra mayúscula en cada columna son significativamente diferentes (P<0.05). ²Escala de blanco/negro. ³Escala de rojo/verde. ⁴Escala de amarillo/azul. ⁵Índice de amarillez. ⁶Volumen de aireación por volumen de fermentador por minuto. ⁷Desviación estándar. ⁸Coefficiente de variación.

bacterias lácticas y acetobacterias (Universidad de Navarra 1992). Según especificaciones del *Codex Alimentarius* se señala que este alimento deberá estar exento de microorganismos que puedan desarrollarse en condiciones normales de almacenamiento en cantidades que representen un riesgo para la salud, no deberá contener anguñula (gusano) del vinagre o cantidades sustanciales de otras materias y sedimentos en suspensión; y deberá estar exento de la turbiedad causada por microorganismos (madre del vinagre) no deberá contener ninguna sustancia originada por microorganismos en cantidades que puedan representar un riesgo para la salud. (CODEX-STAN-162-1987). Sin embargo durante la fase de fermentación alcohólica podrían crecer patógenos como *Clostridium botulinum* que crece en condiciones de anaerobiosis, pero al ser expuesto a condiciones de aerobiosis muere dejando esporas que causan la toxicidad (CDC 2012).

Cuadro 8. Compuestos fenólicos para vinagres condimentados según los niveles de aireación¹.

Fruta	Nivel de aireación vvm ²	mg/L EAG ³ Media ± D.E. ⁴
Naranja agria	0.00	430.5 ± 51 ^A
	0.20	334.2 ± 50 ^B
	0.40	343.9 ± 45 ^B
Piña	0.00	409.5 ± 22 ^A
	0.20	315.1 ± 33 ^B
	0.40	321.9 ± 41 ^B
CV(%) ⁵		7.40

¹Medias con diferente letra mayúscula en cada fila son significativamente diferentes (P<0.05). ²Volumen de aireación por volumen de fermentador por minuto. ³Compuestos fenólicos expresado como ácido gálico. ⁴Desviación estándar. ⁵Coefficiente de variación.

Análisis sensorial de atributos de vinagre. La probabilidad para todos los atributos fue (P<0.05), obteniendo valores de coeficiente de variación de 24.9, 20.6, 17.1, 24.4 y 20.4% para sabor, aroma, color, aceptación general y acidez respectivamente (Cuadro 9). Los valores obtenidos para R² se encuentran alrededor de 0.37 y 0.54. De acuerdo con el análisis estadístico los tratamientos con mayor aceptación fueron los de piña y naranja agria elaborados bajo método Órleans tradicional. Mientras que el tratamiento de piña con 0.20 vvm de aireación es el de menor aceptación mostrando los valores que reflejan menor aceptación. Esto concuerda con estudios realizados anteriormente por Tesfaye *et al.* (2002) donde explica que los vinagres que se obtienen por medio de procesos o métodos rápidos tienden a ser de baja calidad, sin embargo la obtención de vinagre por métodos más largos es poco atractiva para las empresas por sus altos costos (Cuadro 9).

Análisis de costos variables. Los datos del estudio financiero arrojaron que el método de fermentación acética Órleans tradicional elaborado con naranja agria produjo un vinagre a un costo L. 15.84/kg de vinagre condimentado al compararlo con el método Órleans modificado para la misma materia prima, se pudo ver que el precio presentó un costo de L.16.67/kg de vinagre condimentado. Valor que indica que el método tradicional es un método costoso ya que la diferencia entre ambos métodos fue de L.0.83, este mismo

Cuadro 9. Análisis de atributos sensoriales para vinagres condimentados según los niveles de aireación¹.

Fruta	Nivel de aireación vvm ²	Sabor	Aroma	Color	Acidez	Aceptación general
		Media ± D.E. ³	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.
Naranja agria	0.00	6.07 ± 1.80 ^{AB}	6.12 ± 1.39 ^A	6.20 ± 1.39 ^{AB}	6.21 ± 1.61 ^{AB}	6.42 ± 1.39 ^{AB}
	0.20	5.92 ± 1.69 ^{AB}	5.88 ± 1.39 ^B	6.24 ± 1.39 ^{AB}	5.84 ± 1.49 ^{BC}	6.20 ± 1.64 ^{BC}
	0.40	5.76 ± 1.93 ^{BC}	5.84 ± 1.63 ^{AB}	6.11 ± 1.51 ^B	5.76 ± 1.62 ^C	6.08 ± 1.82 ^{BC}
Piña	0.00	5.38 ± 1.45 ^A	6.29 ± 1.30 ^A	6.16 ± 1.46 ^B	6.27 ± 1.19 ^A	6.59 ± 1.59 ^A
	0.20	5.47 ± 1.96 ^C	6.01 ± 1.51 ^{AB}	6.48 ± 1.46 ^A	5.68 ± 1.69 ^C	5.87 ± 2.05 ^C
	0.40	5.79 ± 1.71 ^{BC}	5.90 ± 1.67 ^B	6.24 ± 1.62 ^{AB}	5.81 ± 1.66 ^{BC}	6.06 ± 1.76 ^C
CV (%) ⁴		25.0	21.0	17.0	24.0	20.0

¹Medias con diferente letra mayúscula en cada columna son significativamente diferentes (P<0.05). ²Volumen de aireación por volumen de fermentador por minuto.

³Desviación estándar. ⁴Coefficiente de variación.

Cuadro 10. Análisis de costos variables para métodos vinagres condimentados según método de fermentación.

Fruta	Método	Costo final (L.)
Naranja agria	Órleans tradicional	1,088.4
	Órleans modificado	1,146.9
Piña	Órleans tradicional	1,306.4
	Órleans modificado	1,360.8
Inversión		1,097.5
Costo de no invertir		17,450.1

Tasa de cambio \$1.00 = L 19.92 (Octubre 2012).

comportamiento de pudo observar entre los dos métodos antes mencionados pero elaborados a base de piña, costo de vinagre condimentado con el método tradicional 1.19.00/kg y 1.19.80/kg para el método órleans modificado. en lo que se refiere a la inversión utilizada para optimizar el método órleans tradicional el costo total ascendió a l. 1097.5. el costo de que la phf no implemente dicha inversión es de l. 17,450.10 anuales (Cuadro 10).

4. CONCLUSIONES

- Al determinar la velocidad de acetificación se encontró que los tratamientos de piña con aireación en los niveles 0.20 y 0.40 vvm tuvieron las velocidades más altas respecto al resto de los tratamientos.
- Dentro de las características físicas, los tratamientos elaborados con método Órleans tradicional mostraron un color menos amarillo en respecto al índice de amarillez, a diferencia de los que se elaboraron con método Órleans modificado.
- El contenido de compuestos fenólicos fue mayor para los tratamientos con método Órleans tradicional a diferencia de los tratamientos elaborados con el método Órleans modificado.
- De acuerdo a las características sensoriales analizadas, se concluyó que los tratamientos con mayor agrado fueron los tratamientos de piña y naranja agria elaborados bajo el método Órleans tradicional.
- La diferencia monetaria de producción de un kilogramo de vinagre elaborada con el método Órleans tradicional de naranja agria fue de L.0.83. En cuanto al vinagre de piña la diferencia monetaria ascendió a L.0.80.

5. RECOMENDACIONES

- Optimizar el método de fermentación acética Órleans tradicional adicionando agitación y mayor área superficial.
- Realizar siembras microbiológicas con medios RAE (Ácido acético- Etanol reforzado) y AE (Alcohol- Ácido acético) para crecimiento de bacterias acéticas.
- Realizar siembras microbiológicas para mohos y levaduras.
- Implementar el método Órleans modificado en la PHF si el propósito de uso de este ácido acético fuese para actividades de higienización que no requieran un vinagre de calidad.

6. LITERATURA CITADA

Ainsworth E.; K. Gillespie 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. Nature protocols. 875-877 p.

Alonso J. 2004. Tratado de Fitofármacos y Nutraceúticos, editorial Corpus, Rosario, Argentina CPG Sec. 525.825 Vinegar Definitions Magazine

Anónimo. Improved wine making. Consultado en línea el 5 de junio de 2012. Disponible en: <http://www.brsquared.org/wine/CalcInfo/HydSugAl.htm>

ASTM 2003. Characterization and failure analysis of plastics. 177 p.

Banco Central de Honduras, 2010. Producto Interno Bruto de Honduras. Consultado en línea el 16 de mayo de 2012. Disponible en:
[http://www.indexmundi.com/es/honduras/producto_interno_bruto_\(pib\).html](http://www.indexmundi.com/es/honduras/producto_interno_bruto_(pib).html)

Bello 2000. Ciencia Bromatológica: Principios generales de los alimentos. 217 p.

Boatella 2004. Química y bioquímica de los alimentos II. 128 p.

CDC, 2012. Botulism from drinking Prison-made illicit alcohol –Utah 2011. Consultado el 5 de Octubre de 2012. Disponible en:
http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6139a2.htm?s_cid=mm6139a2_w

Chiang Tan S. 2005. Vinegar fermentation. University of Louisiana at Lafayette. 15-17 p.

De Ley, J., F. Gosselé, J. Swings, 1984. Genus I *Acetobacter*. In: Kreig, N.R., Holt, J.C. (Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. Williams and Wilkens, Maryland, pp. 268–274.

De Ley J., M. Gillis y J. Swings 1984. Family VI. Acetobactereaceae En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1. Edición Krieg N. R. y Holt J. C. Williams & Wilkins, Baltimore. 267- 278 pp

De Ory I, Romero LE, Cantero D. 1999. Maximum yield acetic acid fermenter. Comparative fed-batch and continuous operation studies at pilot plant scales. Bioprocess Engineering 21: 187-190.

Du Toit, W.J., I.S.Pretorius, A. Lonvaud-Funel, 2005. The effect of sulphur dioxide and oxygen on the viability and culturability of a strain of *Acetobacter pasteurianus* and a strain of *Brettanomyces bruxellensis* isolated from wine. *Journal of Applied Microbiology* 98, 862–871.

Entani, E., S. Ohmori, H. Masai, K.J. Suzuki, 1985. *Acetobacter polyoxogenes* sp. nov., a new species of an acetic acid bacterium useful for producing vinegar with high acidity. *Journal of General and Applied Microbiology* 31, 475–490.

Ferreya ; Schvab; Davies; Gerard; Hours, 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) consultado en línea el 26 de septiembre de 2012. Disponible en:

https://sites.google.com/a/unitru.edu.pe/sciagropecu/publicacion/scagropv3n1/scagrop03_61-60

Flanzy, 2003. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Consultado el 13 de Octubre de 2012. P 254.

Food and Drug Administration. Consultado en línea el 17 de mayo de 2012. Disponible en: <http://cfr.vlex.com/vid/21-133-vinegar-19670741>

Gálvez, M.C.; C.G.Barroso.; J.A. Perez-Bustamante. (1995). Influence of the origin of wine vinegars in their low molecular weight phenolic content. *Acta Horticulturae* 388, 269-272.

García-Parilla M.C. y A.M. Troncoso. 2009. Composición fenólica de vinagres de vino tinto: Influencia de la acetificación y la madera.

Guerra 2001. Estudio de tres proporciones de vino/vinagre madre en un modelo de generación por percolación continua de vinagre en Zamorano. p.50.

Hidalgo, C., C. Vegas, E. Mateo, W. Tesfaye, A.B. Cerezo, R.M. Callejón, M. Poblet, J.M. Guillamón, A. Mas, M.J. Torija, 2010. Effect of barrel design and the inoculation of *Acetobacter pasteurianus* in wine vinegar production. *International Journal of Food Microbiology* 141, 56-62.

Hidalgo. J 2012 Tratado de enología, consultado el 9 de Octubre de 2012 disponible en: <http://books.google.hn/books?id=4nLPy0y80OIC&printsec=frontcover&dq=tratado+de+enologia&hl=es&sa=X&ei=4pWIUOqQA4vg8ASYy4CYDg&ved=0CCwQ6AEwAA>

Hopkins R. Howle C. Reid J. 2006. Measuring temperature gradients in evaporating multicomponent alcohol/water droplets p 22. Consultado en línea el 1 de Octubre de 2012 disponible en: <http://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/2006/CP/b600530f>

Ilabaca, C., Navarrete, P., Mardones, P., Romero, J., Mas A. 2008. Application of culture independent molecular methods to evaluate acetic acid bacteria diversity in vinegarmaking process. International Journal of Food Microbiology 126, 245-249.

Kelebek H.; S. Selli; A. Canbas; T. Cabaroglu 2009. HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic composition and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. 187-192 p.

Llaguno C. y Polo C. 1991. El vinagre de vino. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid. España. 238 p

Lozano 2006. J Fruit Manufacturing: Scientific Bases, Engineering Properties, and Deteriorative Reaction of Technological Importance. 91 p.

López M. 2002. Estudio de la retención de compuestos fenolicos formados durante en pardeamiento en vinos blancos. Consultado el 12 de junio de 2012. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/106977421/3/compuestos-fenolicos-del-vino-blanco>

Luh 1991. Rice Utilization. Second edition. New York. Library of congress catalog card number 90-21387.

Meyer D. 2012. Aireación en el manejo de sistemas de producción. Manual de Acuicultura. Tegucigalpa, Honduras. Graficentro Editores. p 56-57.

Mínguez M.I.; A. Pérez, D.; Hornero, 2007. Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales; mucho más que simples colorantes vegetales. Consultado en línea disponible en: http://digital.csic.es/bitstream/10261/5754/1/IG_AGROCSIC_4.pdf

Morgan 2001. Microbial Growth phase. Consultado el 13 de octubre de 2012. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/8775839/Microbial-Growth-Phase>

Morales ML, A. Gustavo, José A. Gonzalez, Ana M. Troncoso 2001. Multivariate analysis of commercial and laboratory produced sherry wine vinegar: influence of acetification and aging. *Journal of food technology* 212: 676-682.

Norma del CODEX para vinagre (Norma Regional Europea) CODEX-STAN-162-1987. 3 p.

Ough, C.S., M.A. Amerine, 1987. *Methods for Analysis of Must and Wines*. Wiley-Interscience Publication, California.

Pizarro 2005, Obtención de condiciones de elaboración de vinagre de arándanos (*Vaccinium corymbosum*) utilizando torta de prensa. Consultado en línea el 10 de mayo de 2012. Disponible en: <http://www.scribd.com/doc/60923916/26/Evaluacion-sensorial-del-vinagre>

Prichard, E 2003 Measurement of pH consultado el 9 de Octubre de 2012, disponible en: <http://books.google.hn/books?id=HNJy5rtJLjAC&printsec=frontcover&dq=Measurement+of+pH&hl=es&sa=X&ei=oJyIUL6sIIGm9ATQkIDwBQ&ved=0CC8Q6AEwAA>

SAS.2002-2010.SAS for Windows Statistics (Version 9.3 (TS1MO)).SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.

Secretaría de salud Pública de Honduras. 1997. Consultado el 11 de mayo de 2012. Disponible en: <http://www.salud.gob.hn/>

Sievers.M.; S.Sellmer; M.Teuber 1992. *Acetobacter europaeus* sp. nov., a main component of industrial vinegar fermenters in Central Europe. *Systematic and Applied Microbiology* 15, 386–392.

Sokollek, S.J.; Hammes, W.P. 1997. Description of a starter culture preparation for vinegar fermentation. *Systematic and Applied Microbiology* 20, 481-491.

Sokollek S.J.; C. Hertel; W.P. Hammes 1998. Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentation. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 935–940.

Tesfaye, W., M.L. Morales, M.C. Garcia-Parrilla, A.M Troncoso, 2002. Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science and Technology* 13, 12-21.

Torija, M.J., Mateo, E., Guillamón, J.M., Mas, A. 2010. Identification and quantification of acetic acid bacteria in wine and vinegar by TaqMan-MGB probes. *Food Microbiology* 27, 257-265.

Trcek, J., 2005. Quick identification of acetic acid bacteria based on nucleotide sequences of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer region and of the PQQ-dependent alcohol dehydrogenase gene. *Systematic and Applied Microbiology* 28, 735-745.

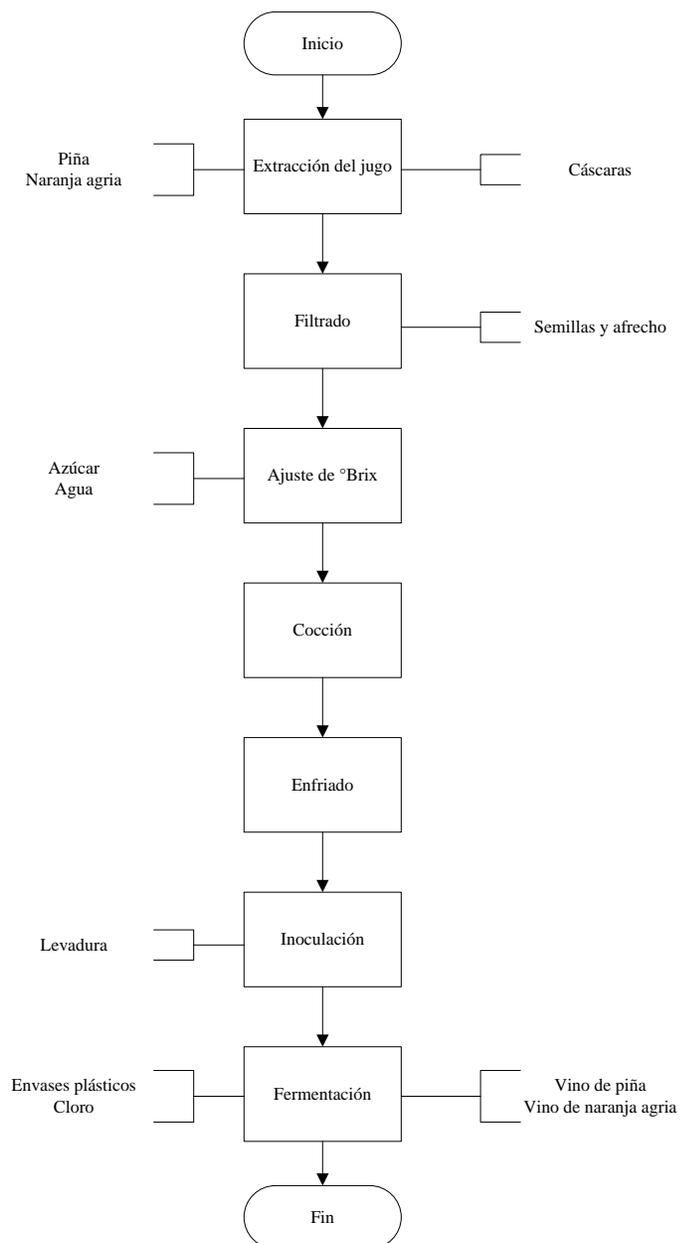
Universidad de Navarra 1992. Valores microbiológicos de referencia para los alimentos consultado en línea el 30 de Septiembre de 2012, disponible en: <http://www.unavarra.es/genmic/curso%20microbiologia%20general/14-valores%20de%20referencia.htm>

Vegas C. 2010. Aplicación de métodos moleculares para el estudio de las bacterias acéticas implicadas en la elaboración de vinagre de vino tradicional. p. 142-147

Whitaker J.R. Lee. CY.1995. Enzymatic browning and its prevention. Volume 24 Number 3.

7. ANEXOS

Anexo 1. Metodología para elaboración de vino de naranja agria y piña.



Anexo 2. Características del vino de naranja agria y piña usado por repetición.

Parámetro	Naranja agria			Piña		
	1	2	3	1	2	3
Acidez titulada %	1.72	1.8	1.61	1.30	1.05	0.70
Grados Brix	11.4	12.8	20.4	10.6	8.70	12.5
% alcohol	12.3	10.5	7.5	12.9	11.0	9.5
pH	3.23	3.14	3.0	2.7	3.5	3.2

Anexo 3. Formulación de vino de tomate.

Ingrediente	Cantidad
Agua	158kg
Azúcar	54kg
Jugo	48 kg
Acido cítrico	110g
Levadura	60g

^{II}. Obtenido de PHF

Anexo 4. Formulación de vino de naranja agria y piña.

Ingrediente	Cantidad	
	Naranja agria	Piña
Agua	14.81 kg	14.81 kg
Azúcar	5.06 kg	5.06 kg
Jugo	4.5 kg	4.5 kg
Acido cítrico	-	10.3 g
Levadura	5.62 g	5.62 g

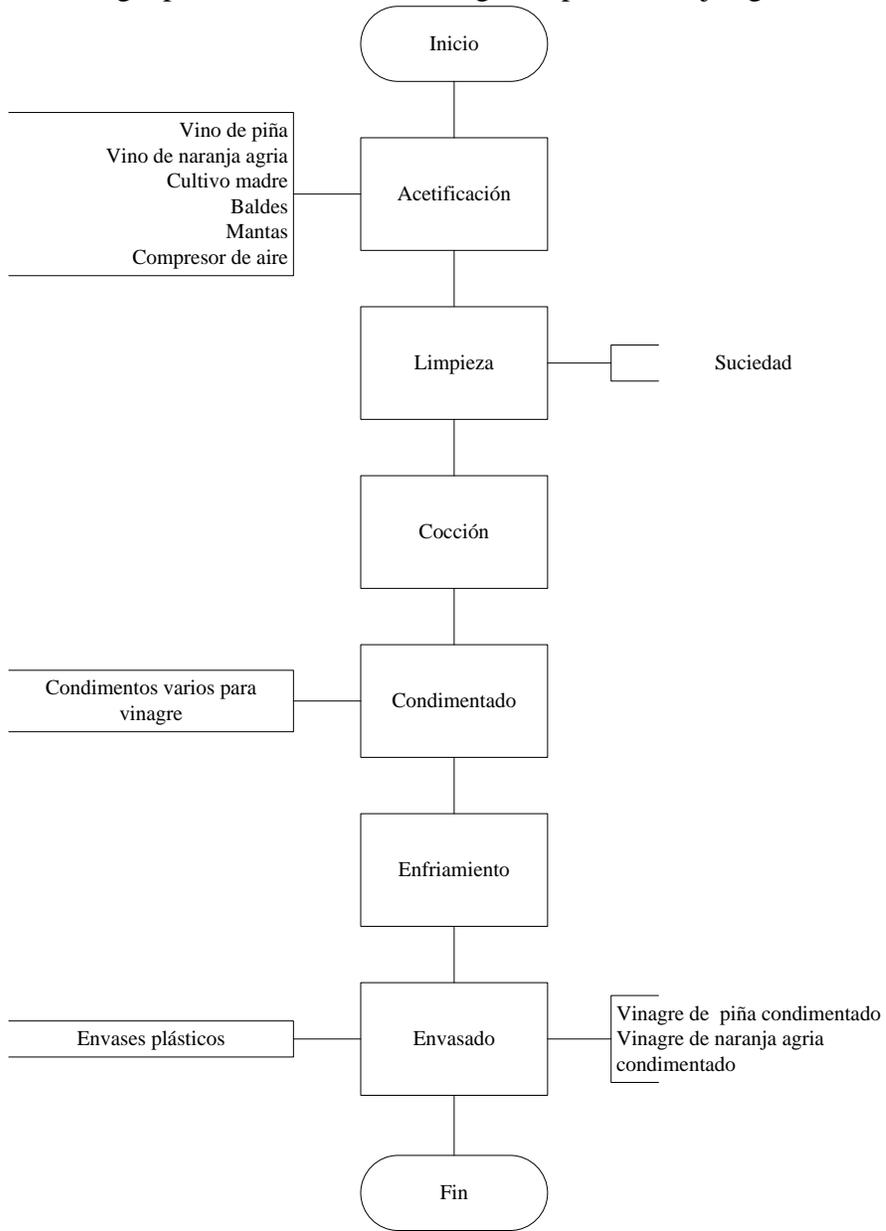
Anexo 5. Acidez del vinagre madre usado por repetición.

Repetición	Acidez del vinagre %
1	5.40
2	6.00
3	7.98

Anexo 6. Bioreactor instalado para método de cultivo Órleans modificado.



Anexo 7. Metodología para elaboración de vinagre de piña, naranja agria.



Anexo 8. Formulación para vinagre condimentado.

Ingrediente	Cantidad
Agua	91 kg
Vinagre crudo	82 kg
Cebolla	3.8 kg
Sal refinada	2.42 kg
Azúcar	1.56 kg
Chile dulce	1.297 kg
Ajo	865 g
Laurel	311 g
Pimienta negra	311 g
Pimienta gorda	311 g
Cominos	242 g
Canela	138 g
Clavo	138 g

*obtenido de PHF

Anexo 9. Medio Frateur para crecimiento sobre etanol

Ingrediente	Cantidad (%)
Carbonato de calcio	2
Etanol	5
Agar	2
Extracto de levadura	1

Anexo 10. Conglomerado de bacterias acéticas creciendo sobre medio Frateur.



Anexo 11. Boleta para análisis sensorial de vinagre

HOJA DE EVALUACIÓN SENSORIAL DE VINAGRE

Nombre: _____

Fecha: _____

Instrucciones: Marque con una X el cuadro correspondiente a su evaluación de la muestra para cada atributo. Por favor evalúe en la escala de 1 al 9 siendo 9 extremadamente agradable y 1 extremadamente desagradable. Para poder realizar el análisis de cada vinagre es necesario que remoje una rebanada de pepino por muestra. Limpie su paladar entre cada vinagre con agua y galletas.

Muestra No.

	Me disgusta extremada mente	Me disgusta mucho	Me disgusta moderada mente	Me disgusta levemen te	No me gusta ni me disgusta	Me gusta leveme nte	Me gusta moderada mente	Me gusta mucho	Me gusta extremada mente
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sabor	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aroma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Color	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Acidez	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aceptación general	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>