

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE INGENIERIA EN ALIMENTOS

**Elaboración de Gel Celulósico (*nata*) Producido por
Acetobacter xylinum Sobre Jugo de Arándano (*Vaccinium
corymbosum*)**

Tesis presentada como parte de los
requisitos para optar al grado de
Licenciado en Ingeniería en Alimentos

Nicole Germaine Parant Rodewald

VALDIVIA - CHILE
2005

PROFESOR PATROCINANTE

Sr. Fernando Figuerola Rivas
Ingeniero Agrónomo, M.Sc. Food Science
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

PROFESOR INFORMANTE

Sr. Alejandro Romero Mella
Bioquímico, Ph.D.
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

PROFESOR INFORMANTE

Sr. Kong Shun Ah-Hen
Ingeniero en Alimentos, (Dipl. – Ing; Dr.- Ing)
Doctor en Ingeniería
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos

A mi familia

.... gracias por todo, los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a todos los profesores que me entregaron siempre buenos consejos y orientación durante el período que estuve ligado a esta facultad (que no fueron pocos) y en forma muy especial a mi profesor patrocinante Sr. Fernando Figuerola y a mis profesores informantes Sr. Alejandro Romero y Sr. Kong Shun Ah – Hen.

Además, quiero agradecer el cariño y apoyo que me brindaron mis grandes amigos en las buenas y en las malas mientras estuve creciendo por Valdivia.

Y por último a mi familia, mi mamá, mi papá y mis hermanos: Rodrigo, Constanza, Daniela y Carolina, que siempre me han entregado todo su cariño, y me han aguantado más de un cambio de luna, los quiero mucho.

ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Antecedentes generales sobre la nata	3
2.2	Nata de arándano	3
2.3	<i>Acetobacter xylinum</i>	4
2.4	Arándano como materia prima	5
2.5	Antocianos	7
2.6	Celulosa	8
2.7	Fibra dietética	9
2.8	Condiciones fermentación	10
2.8.1	pH	10
2.8.2	Temperatura	11
2.8.3	Oxígeno	11
2.8.4	Concentración de inóculo	11
2.9	Licor Madre	12
3	MATERIAL Y MÉTODO	13
3.1	Materiales	13
3.1.1	Materia prima	13
3.1.2	Insumos químicos	13
3.1.3	Insumo microbiológico	14
3.1.4	Instrumentos y utensilios	14

3.2	Método	14
3.2.1	Activación de la cepa madre a nivel de laboratorio	15
3.2.2	Estudio de crecimiento y ensayo de envejecimiento	16
3.2.3	Elaboración pulpa de arándano	17
3.2.4	Ensayos en diferentes medios	18
3.2.4.1	Ensayo n° 1	19
3.2.4.2	Ensayo n° 2	19
3.2.4.3	Ensayo n° 3	19
3.2.4.4	Ensayo n° 4	19
3.2.4.5	Ensayo n° 5	20
3.2.4.6	Ensayo n° 6	20
3.2.4.7	Ensayo n° 7	20
3.3	Preparación licor madre industrial	21
3.4	Elaboración de la <i>nata</i>	22
3.5	Recolección de la <i>nata</i>	22
3.6	Lavado	23
3.7	Liofilización	23
3.8	Molienda	23
3.9	Observación de la <i>nata</i> en microscopio electrónico de barrido	23
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1	Estudio de crecimiento	24
4.2	Ensayo de envejecimiento	27
4.3	Ensayos en diferentes medios	27
4.3.1	Ensayo n° 1	27
4.3.2	Ensayo n° 2	28
4.3.3	Ensayo n° 3	29
4.3.4	Ensayo n° 4	30
4.3.5	Ensayo n° 5	32

4.3.6	Ensayo n° 6	33
4.3.7	Ensayo n° 7	34
4.4	Análisis químico	36
4.5	Observación al microscopio electrónico de barrido	37
4.6	Determinación del contenido total de antocianos	37
5	CONCLUSIONES	39
6	RESUMEN	40
	SUMMARY	41
7	BIBLIOGRAFÍA	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición nutricional del arándano	7
2	Ingredientes del licor madre primario	15
3	Ingredientes licor madre industrial	21
4	Estudio de crecimiento	24
5	Ingredientes del licor madre utilizado en el ensayo n°1	28
6	Variación de los ingredientes del ensayo n°1	28
7	Variación de los ingredientes del ensayo n°2	29
8	Ingredientes utilizados en el ensayo n°3	29
9	Formulaciones ensayo n°4	30
10	Coordenadas carta de colores ensayo n° 4	32
11	Ingredientes para reforzar licor madre ensayo n°5	33
12	Formulación ensayo n°5	33
13	Formulación licor madre ensayo n°6	34
14	Enriquecimiento licor madre ensayo n° 7	35
15	Ingredientes ensayo n°7	35
16	Análisis químico de la <i>nata</i> de arándano	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fruto de arándano	6
2	Estudio de crecimiento y ensayo de envejecimiento	17
3	Elaboración de pulpa de arándano	18
4	Línea de flujo para la elaboración de <i>nata</i> de arándanos	22
5	Variación de la capacidad de reproducción	25
6	Colonias de <i>Acetobacter xylinum</i> en diferentes diluciones	26
7	Carta de colores del Sistema C.I.E- XYZ	31
8	<i>Natas</i> de arándano y licores madres	32
9	<i>Nata</i> de arándano del ensayo n°6	34
10	<i>Natas</i> del ensayo n°7	36
11	Fotografías de Microscopia Electrónica de Barrido	38

1. INTRODUCCIÓN

La *nata* de arándano es un gel rico en celulosa que se forma en la superficie de una solución industrial denominada Licor madre que contiene jugo de arándano y una serie de otros ingredientes en presencia de un microorganismo fermentativo altamente específico llamado *Acetobacter xylinum*.

Este microorganismo transforma, como parte de su metabolismo, los azúcares de la solución industrial en celulosa.

La celulosa producida microbiológicamente tiene muchas posibilidades de uso industrial, por lo que este producto puede constituir un importante aporte al desarrollo tecnológico en esta materia.

La idea de utilizar el arándano como materia prima surge debido al gran aumento en la demanda por este producto en los últimos años y a su gran capacidad antioxidante derivada de su contenido de antocianos. De este modo, la elaboración de productos en base a este fruto representa una atractiva oportunidad de mercado.

El desarrollo de nuevos productos alimenticios tiene como finalidad, entre otras, el aumento de la diversidad en la oferta a los potenciales consumidores. En este contexto la *nata* de arándano es un producto que actualmente no existe en Chile. Debido a las características del fruto podría representar una nueva oportunidad de negocio para los productores.

Este estudio pretende optimizar el proceso para la obtención de una *nata* de arándano y determinar la concentración de los diversos componentes que sean adecuados para la preparación del licor madre primario, como por ejemplo concentración de 10^5 UFC/mL de *Acetobacter xylinum*.

Objetivo general

El objetivo general de este estudio fue obtener la mejor fórmula de cultivo de *Acetobacter xylinum* para la elaboración de *nata* de arándano.

Objetivos específicos

Los objetivos específicos planteados para este estudio son:

- Desarrollar un estudio cinético para determinar la cantidad de inóculo necesario para ser utilizado en el proceso.
- Determinar los componentes necesarios para la elaboración del gel celulósico.
- Determinar si el *Acetobacter xylinum* mantiene su capacidad de producción de celulosa en sucesivas generaciones.

Hipótesis

La hipótesis nula de esta investigación es que es factible producir *nata* de arándano.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antecedentes generales sobre la *nata*

Según DANESI y WOSIAKI (1998), el término *nata* proviene de la palabra en latín *natare* que significa flotar.

El término *nata* usado en este estudio corresponde a un gel de polisacáridos altamente consistente con características fibrosas que se forma por la acción de *Acetobacter xylinum* en la superficie de una solución de jugo de fruta (piña), leche o agua de coco, productos de bajo valor económico o residuos de procesamiento de frutas (SHEU *et al.*, 2000).

En condiciones estáticas la bacteria acumula la red celulósica en la superficie del caldo nutritivo (licor madre) y las fibras de celulosa son continuamente ordenadas (BIELECKI *et al.*, 2001).

Este gel celulósico es un complemento alimenticio originario de Filipinas y también es popular entre otros países asiáticos como Indonesia, Japón y Taiwán.

2.2 *Nata* de arándano

La *nata* se produce por la fermentación microbiana realizada por, *Acetobacter xylinum* en la superficie de una solución de jugo, en este caso de arándano, junto con otros coadyuvantes, como el azúcar, extracto de levadura, entre otros, que favorecen la dispersión del producto (CHUNG y SHYU, 1999; SHEU *et al.*, 2000).

De acuerdo a VANDAMME *et al.*, (1998), al combinar el azúcar, que es la fuente de carbono, con un preciso control del pH y los niveles de oxígeno disuelto, obtuvieron altos rendimientos de la *nata*.

Debido a su estructura y propiedades, la *nata* parece tener importantes aplicaciones en diversos productos alimentarios en los que el ingrediente usado debe estar en niveles mínimos; por lo que sus características de inalterabilidad del sabor, estabilización de espuma y estabilidad ante diferentes pH, temperaturas y condiciones de congelación, adquiere importancia fundamental para el proceso (LIN y LIN, 2004).

HEO y SON (2002) y SON *et al.*, (2003), afirman que este producto tiene diversos usos industriales no alimenticios como por ejemplo membranas acústicas, cápsulas para medicinas, filtros para fibra de vidrio.

Entre los usos potenciales de la membrana celulósica, se puede incluir la elaboración de aliños, salsas, helados, productos lácteos fermentados, entre otros (ISHIHARA *et al.*, 2002 y SON *et al.*, 2003).

Estudios de CHUNG y SHYU (1999), han demostrado que si se altera algún factor durante el proceso de elaboración de la *nata*, ésta se verá afectada y no se obtendrán resultados satisfactorios.

2.3 *Acetobacter xylinum*

Según BANWART (1979), el *Acetobacter xylinum* es una bacteria elipsoidal recta o severamente curva de 0,6 a 0,8 por 1,0 a 4,0 μm , encontrándose aisladas, en parejas o en cadenas, son aerobios estrictos, colonias pálidas, catalasa positiva, oxidasa negativa, no licúan la gelatina, forman indol o H_2S , oxidan el etanol a ácido acético. El acetato y el lactato los oxidan a CO_2 y H_2O , forman ácidos a partir de n-propanol, n-butanol y D-glucosa. No hidrolizan lactosa ni el almidón.

Según CRUEGER y CRUEGER (1993), estas bacterias acéticas son gram negativas y cuando envejecen los cultivos son gram variables y ácido tolerantes.

SAKAIRI *et al.*, (1998) y LLAGUNO y POLO (1991), plantean que el *Acetobacter xylinum* es una de las más importantes bacterias productoras de celulosa a partir de una gran variedad de sustratos, ya que produce una cantidad suficiente para interés industrial. Esta producción de celulosa bacteriana se realizó con la incubación del medio en forma estática. EMBUSCADO *et al.*, (1994a), afirma que ésta bacteria ha producido celulosa de esta forma por más de cien años.

Según VERSCHUREN *et al.*, (2000) el pH óptimo para el crecimiento de la bacteria en la *nata* es entre 4,0 - 5,0 y la temperatura óptima para su desarrollo es entre 25° y 30 °C (WOOD, 1985 y HOLT *et al.*, 2000).

El *Acetobacter* entrega propiedades únicas a la *nata*, dentro de las que se pueden mencionar, alta absorción de agua, alta fuerza mecánica, alta cristalinidad y una estructura altamente pura en fibra (VANDAMME *et al.*, 1998).

2.4 Arándano como materia prima

El arándano o Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L) es un frutal menor nativo de Norteamérica. Pertenece a la familia Ericaceae y ha sido clasificado en la sub familia *Vacciniaceae* (BUZETA, 1997; CHILDERS, 1949 y SUDZUKI, 2002).

MUÑOZ (1988), afirma que de las más de 30 especies que constituyen el género *Vaccinium* sólo un pequeño grupo de ellas tiene importancia comercial, dentro de las más importantes tenemos al Arándano alto o highbush (*Vaccinium corymbosum*).

El arándano es una baya casi esférica, que dependiendo de la especie puede variar en tamaño de 0,7 a 1,5 cm de diámetro de intenso color azul y un agradable sabor agridulce (KADER *et al.*, 1996; SUDZUKI 2002).

RIZZOLO *et al.*, (2003) y SMITH *et al.*, (2000), afirman que entre los llamados berries, el arándano es el que tiene un alto contenido de ácido ascórbico, mayor fuente de antioxidantes y un alto contenido de antocianos. Según KALT *et al.*, (2000), la alta capacidad antioxidante que posee este fruto ha causado un alto interés por su consumo ya sea en forma natural o en combinación con otros frutos.

SKREDE *et al.*, (2000), afirma que además de las características antes mencionadas el arándano sirve para reducir enfermedades coronarias y para tratamientos de desórdenes en el tracto urinario.

En la FIGURA 1 se puede observar el fruto de arándano en estado maduro.



FIGURA 1 Fruto de arándano.
FUENTE: BUZETA (1997).

El consumo de esta fruta en porciones de 100 g aporta a la dieta alimenticia diaria lo que se expone en el CUADRO 1.

CUADRO 1. Composición nutricional del arándano.

Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
Calorías	36 Kcal	Zinc	100 µg
Proteínas	0,6 g	Cobre	110 µg
Grasas	0,6 g	Manganeso	300-5000 µg
Carbohidratos	6,0 g	Sodio	1 mg
Fibra	4,9 g	Vitamina B ₁	20 µg
Calcio	10 mg	Vitamina B ₂	20 µg
Hierro	740 µg	Ác. Fólico	6 µg
Magnesio	2 mg	Ác. Pantoténico	160 µg
Fósforo	13 mg	Vitamina B ₆	60 µg
Potasio	65 mg	Vitamina C	30 mg

FUENTE: SENSER y SCHERZ (1999).

2.5 Antocianos

Las encuestas entre los consumidores demuestran que el color es importante cuando elegimos un alimento y en el caso de la elaboración de *nata* de arándano es lo mismo, debido a que se quiere obtener un producto con el color del fruto. Los encargados de entregar el color al gel celulósico son los antocianos los cuales dan la característica de color a muchos vinos (MATEUS *et al.*, 2001).

SHAIIDI y NACZK (1995), DUCKWORH (1968) y SCOTT (1999), indican que los antocianos son pigmentos hidrosolubles que se encuentran en los tejidos vegetales (plantas y frutas), responsables del color rojo, azul y púrpura de los arándanos. ROMERO y BAKKER (2000), confirman lo anteriormente descrito.

De acuerdo a KADER *et al.*, (1996), quince son los antocianos que han sido identificados en el arándano, el primero de ellos se encuentra en un 13,5% y se denomina delfinidina-3-monogalactosido, luego vienen en orden decreciente malvidina-3-monogalactosido (12,9%), malvidina-3-monoglucosido (11,9%), malvidina-3-monoarabinosido (11,9%), delfinidina-3-monoarabinosido (10,3%), petunidina-3-monogalactosido (8,8%), delfinidina-3-monoglucosido (6,9%),

petunidina-3-monoglucosido (6,6%), cianidina-3-monoglucosido (5,0%), cianidina-3-monogalactosido (5,0%), petunidina-3-monoarabinosido (3,1%), cianidina-3-monoarabinosido (2,2%), peonidina-3-monoglucosido (1,1%), peonidina-3-monogalactosido (0,7%) u por último peonidina-3-monoarabinosido (0,1%).

Según LEE y WROLSTAD (2004), los arándanos poseen 230 mg antocianos/100g de fruto, la piel de éstos poseen 188, 5 mg antocianos/100g de piel, la pulpa 5,8 mg antocianos/100g de pulpa y la semillas 0,1 mg antocianos/100g de semillas.

De acuerdo a ANTÓN *et al.*, (1999), IVERSEN (1999), LINDEN y LORIENT (1996) y BADUI (1999), los antocianos son sensibles al calor, metales, pH, tiempo del proceso y almacenamiento y al O₂, es por eso que no es fácil fabricar productos que mantengan su color original (ARTHEY y ASHURST, 1996). La composición y distribución de los antocianos en los arándanos se ven afectados por los factores anteriormente mencionados.

Para LEE *et al.*, (2002), los antocianos tienen muchos efectos benéficos para la salud humana entre los cuales se pueden destacar mejoramiento de la vista, reducción de las enfermedades coronarias, protección contra la disfunción neurológica relacionada con la edad, mantenimiento de la permeabilidad vascular normal también como cancerígenos, antimutagénicos, antiinflamatorios y propiedades antioxidantes (JU y HOWARD, 2003).

2.6 Celulosa

BADUI (1999) lo define como un polisacárido de composición (C₆H₁₀O₅)_n, que forma parte de la fibra cruda y es el principal constituyente de la estructura rígida de plantas, árboles, frutos, hortalizas.

De acuerdo a LINDEN y LORIENT (1996), la molécula de celulosa es un biopolímero resultante de la condensación lineal de unidades de D-glucopiranosas unidas entre sí por enlaces glucosídicos, β 1-4. Las moléculas están estabilizadas dentro de ellas y entre sí por enlaces de hidrógeno

La celulosa producida por el *Acetobacter xylinum*, es químicamente pura, libre de lignina y hemicelulosa. Además es un polímero altamente cristalino con un elevado grado de polimerización, lo que la distingue de otras formas de celulosa.

Según KIMURA *et al.*, (2001), la celulosa es el más abundante polisacárido en el mundo, con una producción estimada de 10^{11} ton al año.

Es indigestible por el hombre e insoluble en agua hirviendo, así como en ácidos diluidos y en álcalis (DUCKWORTH, 1968; LINDEN y LORIENT, 1996 y STRASBURGER *et al.*, 1965).

2.7 Fibra dietética

La fibra dietaria fue definida inicialmente como remanentes de paredes celulares de plantas que eran resistentes a la hidrólisis por enzimas alimentaria humanas (LEE *et al.*, 1992).

Según MATISSEK *et al.*, (1992), se denomina fibra dietética a aquellos componentes de vegetales difíciles o imposibles de metabolizar por el organismo humano como por ejemplo como celulosas, hemicelulosas y pectinas (BADUI, 1988).

ARTHEY y ASHURST (1996) y MATISSEK *et al.*, (1992), plantean que debido a que el organismo humano carece de un sistema enzimático que degrade estos polímeros, la fibra dietética aparece inalterada en el intestino grueso

(colon) y ejerce una acción reguladora del peristaltismo y por lo tanto de reabsorción de otros nutrientes que sí son absorbibles.

Estudios realizados por LEE *et al.*, (1992), indican que la fibra puede proteger contra enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad, cáncer de colon y enfermedades diverticulosas. Estos descubrimientos han llevado, en los últimos años, a un incremento del conocimiento de la importancia de consumir alimentos ricos en fibra dietaria.

Gracias a sus propiedades la fibra dietética afecta también favorablemente al metabolismo de los ácidos biliares porque se une a las sales biliares aumentando así su eliminación (MATISSEK *et al.*, 1992).

2.8 Condiciones de fermentación del licor madre

Los factores ambientales son altamente determinantes en la calidad y eficiencia en el proceso de elaboración de la *nata* de arándano, donde los más importantes son el pH, temperatura, oxígeno y concentración de inóculo.

Además de los factores antes mencionados es muy importante mantener el medio de cultivo (Licor madre) en condiciones estáticas, debido a que si el medio está en movimiento sólo tendremos desarrollo microbiano y no la formación de la *nata* en la superficie (ZIPORA y HESRIN, 1963).

Algunos factores que tienen especial significado en los resultados finales del proceso serán analizados a continuación, con el fin de remarcar la necesidad de llevar a cabo un proceso muy controlado, en el cual se conjugan aspectos de química, microbiología e higiene, entre otros.

2.8.1 pH. El efecto del pH es muy importante en la producción, debido a su efecto en el desarrollo de la bacteria *Acetobacter xylinum*.

Este microorganismo requiere valores de pH entre 4 y 5 para lograr su mejor desarrollo y su mayor productividad en la producción de celulosa (DANESI y WOSIACKI, 1998 y WOOD, 1985).

Según EMBUSCADO *et al.*, (1994a), cuando el medio de fermentación tiene un pH bajo 3,5 y sobre 4,5 la nata que se obtiene es de un espesor muy fino, es por esto que se debe tener un control estricto y preciso sobre el nivel de acidez del medio.

2.8.2 Temperatura. La calidad del producto es altamente dependiente de las condiciones de temperatura del medio en el cual se desarrolla el proceso fermentativo, siendo el rango óptimo entre 28 y 32 °C (BREED *et al.*, 1957 y EMBUSCADO *et al.*, 1994b).

2.8.3 Oxígeno. El *Acetobacter xylinum* es un microorganismo aerobio estricto, lo que significa que requiere de oxígeno para su desarrollo (HOLT *et al.*, 2000). Esto significa que el proceso debe realizarse bajo condiciones de abundancia de oxígeno y ello se asegura dejando suficiente espacio entre los baldes de fermentación y cubriéndolos con papel permeable al aire.

2.8.4 Concentración de inóculo. Cabe destacar que un aspecto muy importante para el éxito del proceso es la concentración del microorganismo en el licor madre, debido a que si este número es muy bajo, habría que aumentar el tiempo de fermentación para que la bacteria se desarrolle, pero este aumento de tiempo implicaría que un gran porcentaje de los microorganismos envejecerían.

2.9 Licor Madre

El licor madre es el iniciador de la actividad bacteriana que es el responsable de la producción del gel celulósico o *nata*.

Con el objeto de asegurar un adecuado inicio de la producción de *nata* de arándano, en esta fase inicial del proceso se usará una cepa pura de *Acetobacter xylinum*, la cual se preparará para sembrar los sistemas iniciales de producción (licores madre).

Un aspecto muy importante a considerar es la sanidad del licor, por lo tanto frente a cualquier sospecha de contaminación o manejos inadecuados del proceso, es conveniente que el material sea destruido térmicamente y eliminado de inmediato para evitar propagar la contaminación.

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Materiales

La *nata* se elaboró a partir de diversos ingredientes, de los cuales uno de los más importantes fue la pulpa de arándano que se espera que transfiera parte de sus características a la *nata*, como es el caso de los pigmentos y vitaminas.

A continuación se presentan los materiales que se necesitaron para el desarrollo del proceso.

3.1.1 Materia prima. Las materias primas utilizadas para la elaboración de *nata* de arándano fueron pulpa de arándano, azúcar y agua potable.

3.1.2 Insumos químicos. Los insumos químicos utilizados fueron los siguientes:

- **Sorbato de Potasio ($C_6H_7O_2K$).** Se uso como conservador del producto final contra hongos y levaduras principalmente.
- **Cloruro de calcio ($CaCl_2$).** Se utilizó principalmente como quelante y para ayudar a la gelificación de polímeros.
- **Carbonato de Calcio ($CaCO_3$).** Fue empleado como álcali y antiaglomerante.
- **Fosfato de potasio (KH_2PO_4).** Sal que se ocupó como amortiguador de pH, quelante y antiaglomerante.
- **Extracto de levadura.** Es producido a partir de levaduras de panadería y se utilizó como fuente de nitrógeno.

3.1.3 Insumos microbiológicos. La bacteria acética (*Acetobacter xylinum*) que se utiliza en esta investigación es de procedencia Alemana DSM-2004 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen).

3.1.4 Instrumentos y utensilios. Los instrumentos y utensilios utilizados en el proceso fueron:

- Balanzas
- pHmetro.
- Refractómetro.
- Termómetro.
- Tubos de ensayo.
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml y 1litro.
- Placas Petri.
- Estufa 32 °C.
- Baldes para fermentación.
- Papel Kraft.

3.2 Método

La elaboración de la *nata* se realizó en instalaciones de la planta piloto y en laboratorios del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL) de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

3.2.1 Activación de la cepa madre a nivel de laboratorio

Para contar con una cepa adecuada para la producción de *nata*, fue necesario comenzar el trabajo con una cepa pura de *Acetobacter xylinum*.

La cepa de *Acetobacter xylinum* que se empleó en esta investigación es de procedencia alemana, DSM 2004, la cual se reactivó en el Laboratorio de Microbiología del ICYTAL, donde se mantuvieron las cepas activas del microorganismo para su posterior uso.

Lo primero que se efectuó es la activación de esta cepa en un medio que se denominó “Caldo Acetobacter” el cual contenía glucosa (100 g), extracto de levadura (10 g), carbonato de calcio (20 g) y agua destilada (870 g) y regulado a pH 6,8. La cepa en este medio se incubó por 5 días a 32 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron los repiques en el mismo medio de cultivo líquido (caldo Acetobacter) para la multiplicación masiva. Se incubaron por el tiempo y temperatura anteriormente mencionadas, para luego ser sembradas en el medio de cultivo adecuado para así obtener el licor madre primario.

Los ingredientes para elaborar el licor madre primario se muestran en el CUADRO 2.

CUADRO 2. Ingredientes del licor madre primario.

Ingredientes	Cantidad (g)
	Balde
<i>Acetobacter xylinum</i>	30
Jugo de arándano	2604
Azúcar refinada	300
Sorbato de potasio	0,3
Extracto de levadura	30
CaCl ₂	17,7
KH ₂ PO ₄	9

Por otra parte, es necesario enfatizar la conveniencia de mantener cepas puras de *Acetobacter xylinum* en reserva para contar con material activo fresco en cualquier momento que fuese requerido, de manera de rejuvenecer en forma constante y sistemática el material microbiológico a usar en el proceso industrial. Esta es una responsabilidad que debe ser asumida por un laboratorio especializado.

3.2.2 Estudios de crecimiento y ensayo de envejecimiento de *Acetobacter xylinum*

Para saber la cantidad exacta de inóculo (UFC/mL) que fue agregado al licor madre primario y probar la pérdida en la capacidad de reproducción de la bacteria se realizó un estudio de crecimiento. Y al mismo tiempo se realizó el ensayo de envejecimiento que sirvió para ver la pérdida de la capacidad de la producción de *nata*.

En el párrafo siguiente se describe la forma en que se realizó el estudio de crecimiento y el ensayo de envejecimiento.

Se tomaron 2 mL del Caldo Acetobacter en donde se activó la bacteria liofilizada y se agregó 1 mL a un tubo de ensayo que contenía 9 mL de Caldo Acetobacter y el otro mL se agregó a un tubo con 9 mL de agua peptonada (dilución 10^{-1}). Se agitaron bien ambos tubos. El tubo con Caldo Acetobacter se incubó a 30 °C por 24 h, para ser ocupado al día siguiente. Del otro tubo se extrajo 1 mL y se agregó a otro tubo que contenía 9 mL de agua peptonada y se agitó, obteniendo así la dilución 10^{-2} . Luego de este procedimiento, se sacaron 1 mL y 0,1 mL y se sembraron en superficie en las placas con agar Acetobacter, para obtener las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} respectivamente.

El agar Acetobacter contenía glucosa (100 g/kg), extracto de levadura (10 g/kg), carbonato de calcio (20 g/kg), agua destilada (855 g) y agar (15 g).

Además de los 1,1 mL extraídos de la mezcla, se tomó 1mL más para ser mezclado en un tubo con 9 mL de agua peptonada (dilución 10^{-3}), se agitó y se extrajo 0,1 mL para ser sembrados en una placa obteniéndose así la dilución 10^{-4} . Por último de esta mezcla (10^{-3}) se tomó 0,1 mL para obtener la dilución 10^{-4} y así sucesivamente hasta llegar a la dilución 10^{-10} .

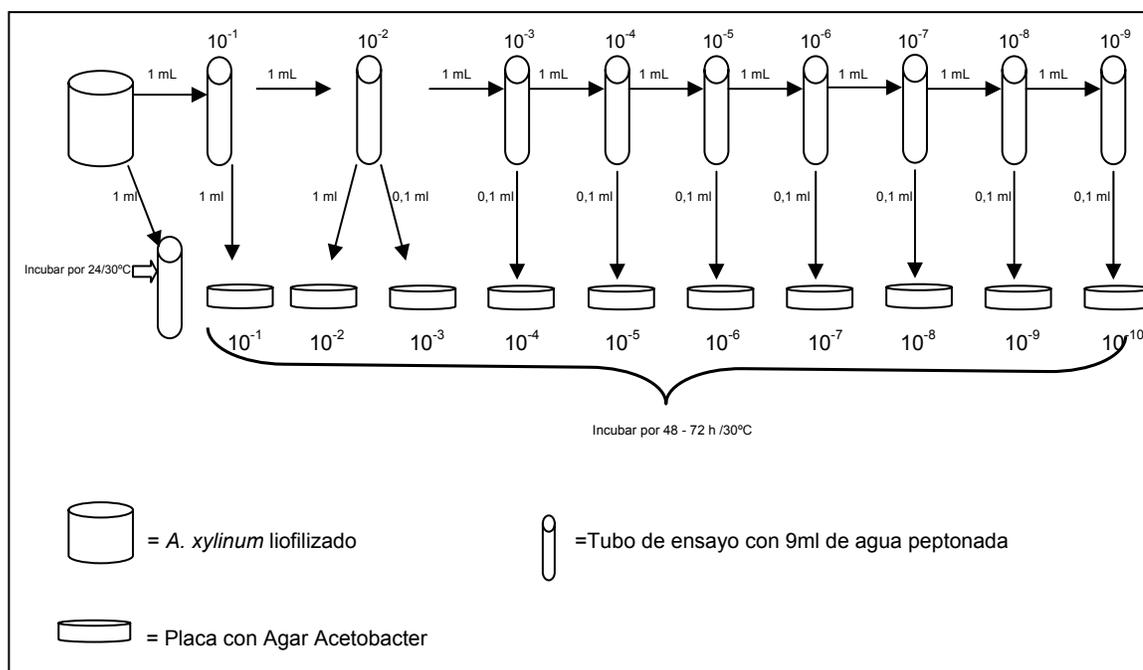


FIGURA 2. Estudio de crecimiento y ensayo de envejecimiento.

Las placas se incubaron a 30 °C por 48-72 h o hasta que aparezcan las colonias, para poder ser contadas.

En la FIGURA 2 se observa en forma gráfica lo realizado en el ensayo de envejecimiento y el estudio de crecimiento.

3.2.3 Elaboración pulpa de arándano

La pulpa de arándano fue elaborada en el Laboratorio de Procesos Vegetales del ICYTAL. El procedimiento consistió en pesar la fruta para saber con certeza con cuantos kilogramos se contará (105 kg). Luego esta fruta se colocó a baño

maría para lograr que los antocianos (responsables del color) que se encuentran en el orujo traspasaran hacia la pulpa y así obtener una pulpa con un color más intenso.

En la FIGURA 3 se muestra el diagrama de flujo para la elaboración de la pulpa de arándano.

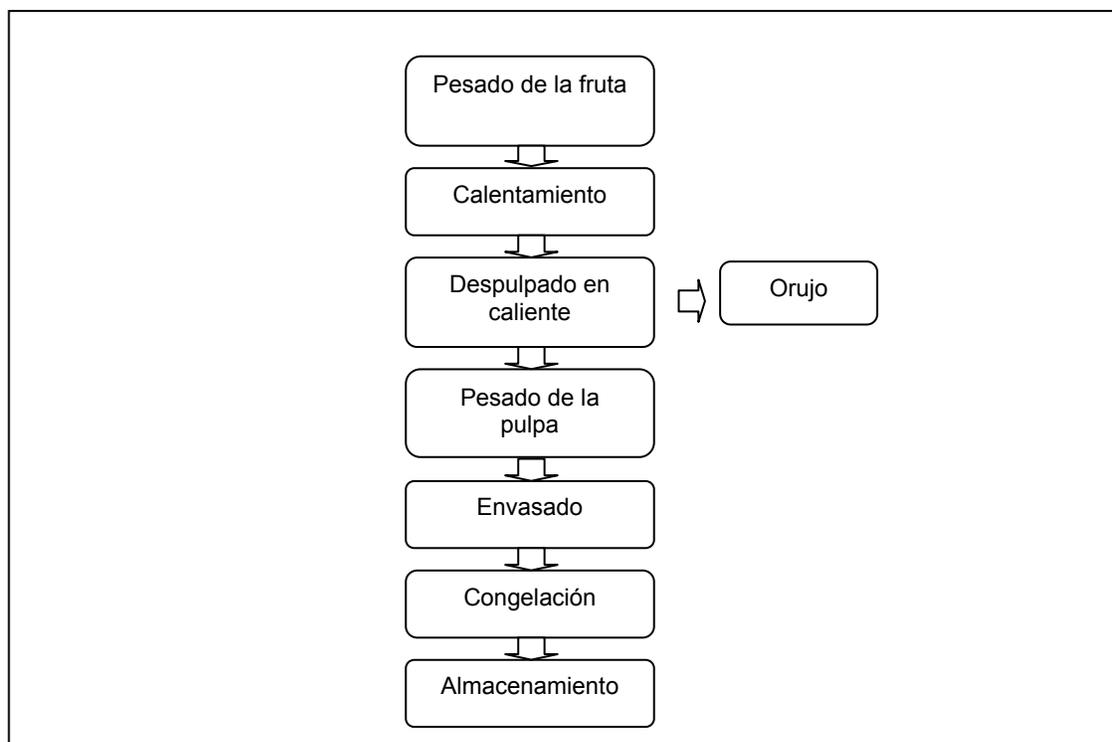


FIGURA 3. Elaboración de pulpa de arándano.

3.2.4 Ensayos en diferentes medios

La forma correcta para determinar cual es el medio industrial más adecuado para el desarrollo del *Acetobacter xylinum* y obtener una *nata* de buena calidad, es con la realización de ensayos en diferentes medios de cultivo. La diferencia que existe entre uno u otro ensayo se debió al cambio en algún ingrediente o en el recipiente de fermentación.

3.2.4.1 Ensayo n°1. En el primer ensayo que se realizó se utilizó un licor madre industrial elaborado 15 días antes de montado este ensayo.

Se trabajó con bandejas con capacidad para 750 g de mezcla y los ingredientes utilizados son: azúcar, agua, *Acetobacter xylinum*, extracto de levadura y diferentes concentraciones de pulpa de arándano, desde 10-40%, con el objetivo de ver si ésta influirá en la formación de *nata*.

3.2.4.2 Ensayo n°2. Para este ensayo se utilizaron bandejas, las mismas concentraciones de pulpa y de los otros ingredientes que en el ensayo anterior, con la diferencia que se agregó 1 g/kg de sorbato de potasio.

3.2.4.3 Ensayo n°3. El licor madre Industrial utilizado en este ensayo es el que se elaboró en el ensayo n°2, el cual tiene alrededor de 40 días.

Según EMBUSCADO *et al.*, (1994), la cantidad de azúcar influye en la producción de celulosa y por ende el grosor de la *nata*, por lo tanto en este ensayo, se aumentó al doble la cantidad de azúcar y además se disminuyó a un 25% la cantidad de extracto de levadura. Se trabajó con concentraciones de pulpa de arándano al 10% y 20%.

En este ensayo también se trabajó con bandejas con capacidad para 750 g de mezcla.

3.2.4.4 Ensayo n°4. Se trabajó con *A. xylinum* recién activado, ya que se pensó que el *Acetobacter* perdía su capacidad de producción de celulosa como lo indican LLAGUNO y POLO (1991).

En este ensayo se realizaron cinco diferentes formulaciones en matraces de 250 mL, con 100 g de mezcla aproximadamente.

Formulación 1: Pulpa, agua, sorbato de potasio, azúcar, *Acetobacter xylinum* y cloruro de calcio.

Formulación 2: Pulpa, agua, sorbato de potasio, azúcar, *Acetobacter xylinum* y fosfato de potasio.

Formulación 3: Pulpa, agua, sorbato de potasio, azúcar, *Acetobacter xylinum* y cloruro de sodio.

Formulación 4: Pulpa, agua, sorbato de potasio, azúcar, *Acetobacter xylinum*, cloruro de calcio y fosfato de potasio.

Formulación 5: Pulpa, agua, sorbato de potasio, azúcar, *Acetobacter xylinum*, cloruro de sodio y fosfato de potasio.

3.2.4.5 Ensayo nº5. El licor madre industrial para este ensayo se elaboró con el medio líquido (licor) de la formulación 4 del ensayo anterior, siendo este medio reforzado.

Este licor madre ya reforzado se dejó fermentar por 15 días y transcurrido este tiempo de fermentación se montó el ensayo nº 5, en una bandeja con capacidad para 750g de mezcla.

3.2.4.6 Ensayo nº6. Para preparar el licor madre de este ensayo se tomaron 390g del licor madre industrial preparado en el ensayo nº5 siendo éste enriquecido. Este nuevo licor madre Industrial se dejó fermentar por 1 mes.

3.2.4.7 Ensayo nº7. Aquí se trabajó con 2722g de licor madre industrial preparado en el ensayo anterior, pero antes de ser utilizado se enriqueció.

Luego de 5 días de fermentación el licor madre fue dividido y repartido en 2 baldes con 3 kg de mezcla cada uno y en una bandeja con 750 g de mezcla, con el objetivo de ver el comportamiento de la bacteria en dos diferentes recipientes de fermentación.

3.3 Preparación licor madre industrial

La preparación del licor madre industrial considera dos etapas, la primera es la obtención del licor madre primario en donde se multiplica la cepa pura de *Acetobacter xylinum* a nivel de laboratorio y la otra es la multiplicación de la bacteria en el medio industrial.

Las cantidades de cada ingrediente para la obtención del licor madre industrial son las que se muestran en el CUADRO 3.

Es importante preparar primero el jugo de arándano con la concentración deseada de pulpa (en este caso 20%) y luego a esto agregarle el resto de los ingredientes, para que de esta forma todos los ensayos que se realicen presenten la misma concentración de pulpa.

CUADRO 3. Ingredientes licor madre industrial.

Ingredientes	Cantidad (g)
	Balde
Licor madre primario	130
Jugo de arándano	2504
Azúcar refinada	300
Sorbato de potasio	0,3
Extracto de levadura	30
CaCl ₂	17,7
KH ₂ PO ₄	9

El procedimiento para la producción del licor madre industrial fue el mismo que para la producción del licor madre primario, esto quiere decir, que el proceso fermentativo se completa a los 4-5 días, momento en el cual el crecimiento bacteriano es el mayor.

Es muy importante mantener la sanidad de este licor. Frente a cualquier sospecha de contaminación se recomienda inactivar el material térmicamente y eliminarlo de inmediato para evitar la propagación de la contaminación.

3.4 Elaboración de la nata

La elaboración de *nata* de arándano se basó en la producción de *nata* de coco, de tipo filipino y los pasos a seguir se pueden apreciar en el diagrama de flujo de la FIGURA 4.

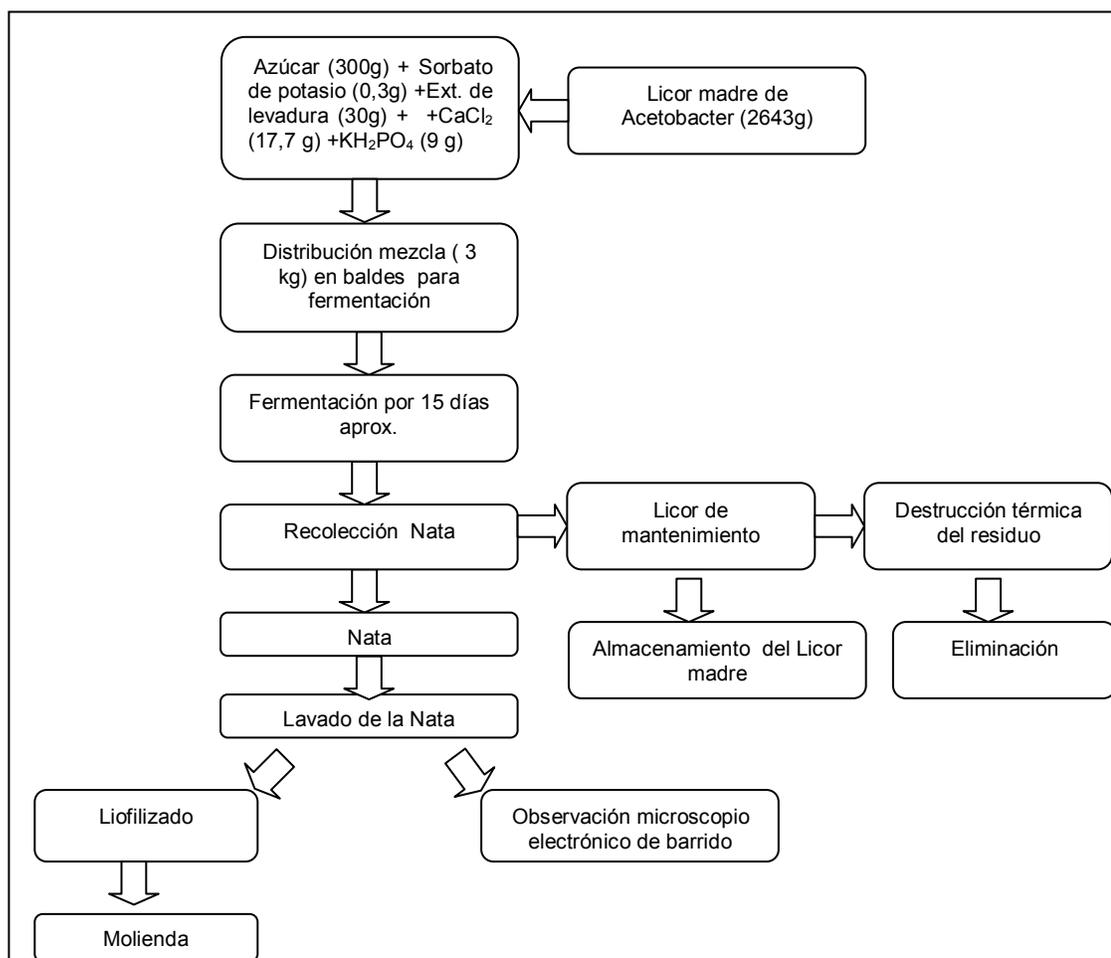


FIGURA 4. Línea de flujo para la elaboración de Nata de arándanos.

3.5 Recolección de la Nata

La recolección o cosecha se realizó después de 15-20 días, manteniendo buenas condiciones de higiene.

La nata formada se separó de la solución sobre la cual se desarrolló. Ésta se retiró debido a que en la superficie inferior, la que está en contacto con la solución, estaban adheridas las bacterias, por lo tanto fue necesario raspar y

lavar (con poca agua) esta capa. Esta mezcla de agua con *Acetobacter xylinum* se volvió a agregar a la solución, para así aumentar la concentración del microorganismo en el medio.

La mezcla líquida que quedó luego de extraer la capa fina de *nata* se colocó en un balde limpio y se guardó para ser utilizado como licor madre de uso industrial.

3.6 Lavado

El objetivo principal del lavado es eliminar los restos de *Acetobacter* que se encuentran adheridos a la *nata* y para que así éstos sean agregados en el próximo licor madre.

3.7 Liofilización

Después del proceso de lavado la *nata* se sometió a liofilización, para su conservación y posterior análisis. Este proceso se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal del Instituto de Producción Animal de la Universidad Austral de Chile.

3.8 Molienda

Al gel ya liofilizado se le reduce el tamaño de sus partículas en dos diferentes diámetros (0,5 mm y 1,5 mm) mediante una molienda y tamizado.

3.9 Observación de la Nata en Microscopio Electrónico de Barrido

La observación al microscopio electrónico de barrido, LEO, modelo 420, se realizó en el Instituto de Histología y Patología de la Universidad Austral de Chile.

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Estudio de crecimiento

El estudio de crecimiento se realizó para determinar la concentración de inóculo que fue empleada en el proceso de elaboración de *nata* y además corroborar la pérdida de la capacidad de reproducirse que pueda tener el *Acetobacter xylinum*.

Este estudio se le realizó por 10 días a la bacteria recién activada, la cual se encontraba en caldo *Acetobacter* y en el CUADRO 4 se pueden observar los recuentos (UFC/mL) obtenidos cada dos días.

CUADRO 4. Estudio de crecimiento.

Día	Dilución	Colonias por placa	Recuento (UFC/ml)	Log (UFC/ml)
2	10^{-5}	113	$1,13 \times 10^7$	7.05
4	10^{-5}	121	$1,21 \times 10^7$	7.08
6	10^{-5}	92	$9,2 \times 10^6$	6.96
8	10^{-5}	75	$7,5 \times 10^6$	6.88
10	10^{-5}	62	$6,2 \times 10^6$	6.79

Los datos obtenidos del estudio de crecimiento son los que se encuentran en el CUADRO 4, en el cual, se puede observar que la cantidad de colonias por placa en las diluciones 10^{-5} es bastante grande, lo que permite tener una cantidad de inóculo suficiente para comenzar con los ensayos. Y como referencia se puede decir que los licores madres usados en la elaboración de la nata de arándano, estuvieron en el orden de 120×10^5 UFC/placa y 33×10^{10} UFC/placa, lo que es un buen nivel para iniciar la formación de la *nata*.

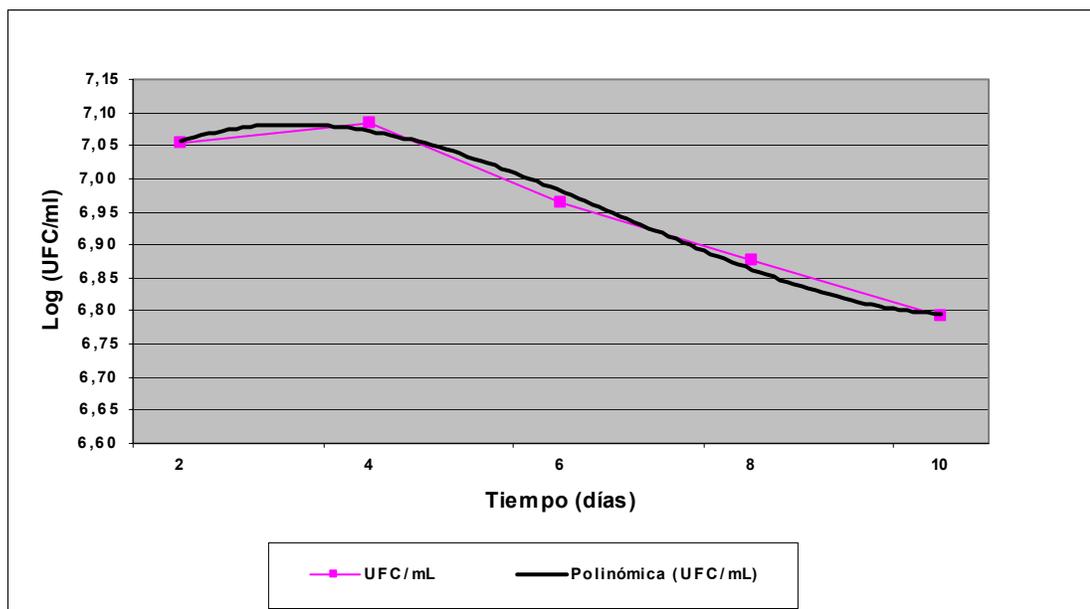


FIGURA 5. Variación de la capacidad de reproducción.

Como se puede apreciar en la FIGURA 5 a medida que va pasando el tiempo los recuentos van disminuyendo, lo que indica que el *Acetobacter xylinum* va perdiendo su capacidad de multiplicarse.

La variación de la capacidad de reproducción del *Acetobacter xylinum* hasta los 10 días, estuvo determinada según la ecuación de grado tres $0,0129x^3 - 0,13x^2 + 0,3148x + 6,8582$ y su coeficiente de determinación a 0,99.

En la FIGURA 6 se puede apreciar colonias producidas de licor madre de primera generación y diferentes diluciones, después de 10 días de incubación, las cuales fueron sembradas en las placas con agar *Acetobacter*; las colonias de esta bacteria van disminuyendo a medida que se aumentaron las diluciones.

Para obtener un buen rendimiento en la producción de *nata* es importante que el medio de fermentación contenga bacterias nuevas, ya que éstas en su primera etapa de desarrollo son las que forman la red celulósica. Si los recuentos envejecen es necesario enriquecer el medio (licor madre)

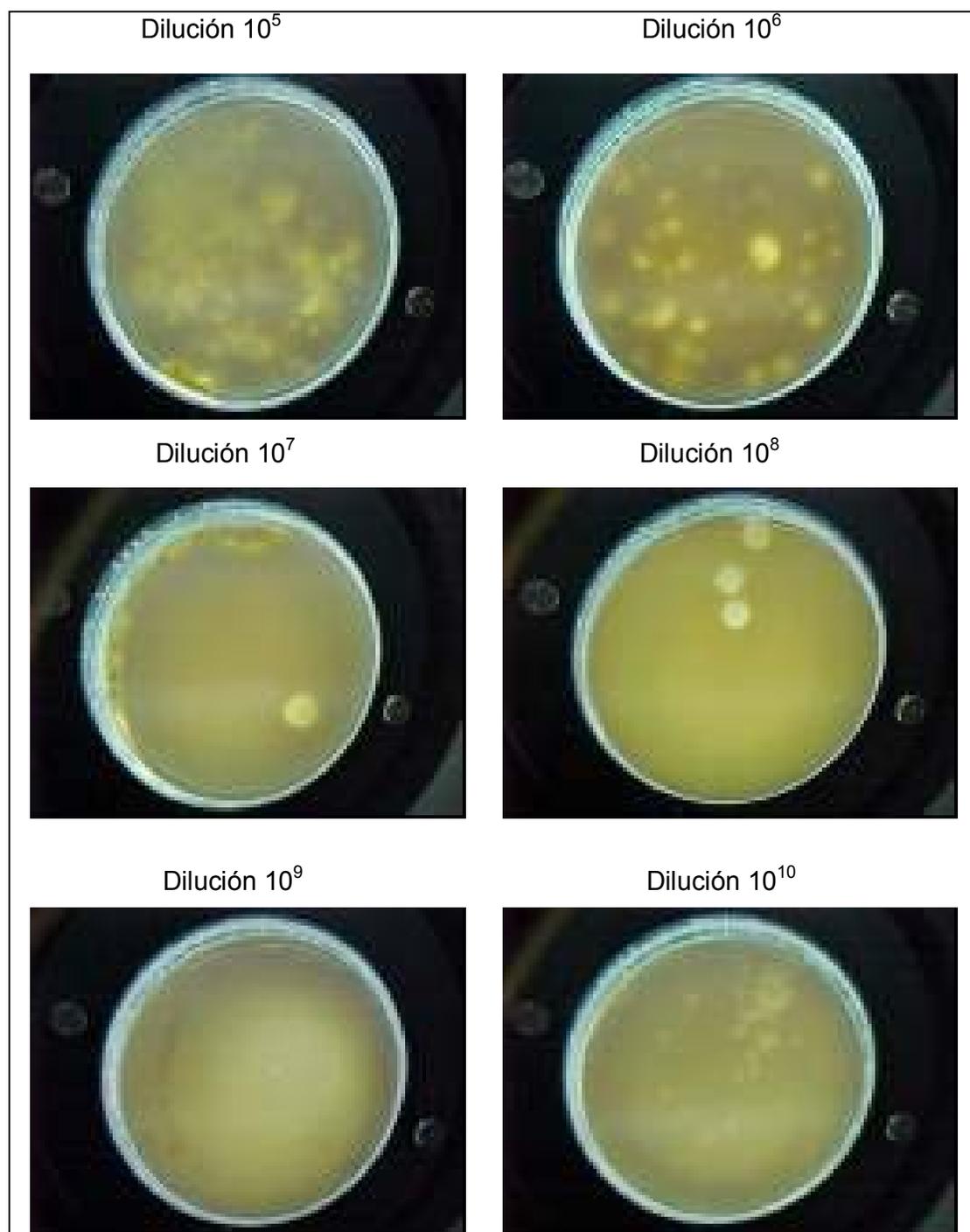


FIGURA 6. Colonias de *Acetobacter xylinum* en diferentes diluciones.

4.2 Ensayo de envejecimiento

LLAGUNO y POLO (1991), indican que el *Acetobacter xylinum* pierde la capacidad de producir celulosa a medida que transcurre el tiempo y eso se pudo comprobar en forma visual, cuando al quinto día de comenzado este ensayo no se formó la capa fina de *nata* en los tubos que contenían caldo *Acetobacter* y *Acetobacter xylinum*.

Como una forma de ver si los tubos que se utilizaron en este ensayo contenían a la bacteria, se les realizó tinción de Gram, catalasa, oxidasa y además se observaban en el microscopio. Todas estas pruebas dieron como resultado que los tubos contenían *Acetobacter xylinum*. Dentro de la población de bacterias encontradas obtuvimos gram negativas y gram variables, lo que quiere decir que la población existente en los tubos era mixta (nuevas y viejas).

4.3 Ensayos en diferentes medios

Como una forma de determinar cual es el medio industrial más adecuado para el desarrollo del *Acetobacter xylinum* y obtener una *nata* de buena calidad, se realizaron 7 ensayos y las características de cada uno se describieron en los siguientes puntos.

El pH de los ensayos realizados fluctuó entre 3,9 y 4,6 lo que es adecuado para el desarrollo del microorganismo, según WOOD (1985).

4.3.1 Ensayo nº1. Los ingredientes utilizados para montar este ensayo son los que se muestran en el CUADRO 5.

CUADRO 5. Ingredientes del licor madre utilizado en el ensayo n° 1.

Ingredientes	Cantidad (g/kg)
Pulpa	200
Azúcar	50
Agua	720
<i>A. xylinum</i> activado	10
Ext. Levadura	20

En el CUADRO 6 se observan las cantidades de cada ingrediente utilizados en el ensayo n°1 y además la variación en la concentración de pulpa de arándano.

CUADRO 6. Variación de los ingredientes del ensayo n°1.

Ingredientes	Cantidad (g/kg)			
Pulpa	100	200	300	400
Azúcar	50	50	50	50
Agua	700	600	500	400
L madre	130	130	130	130
Ext. levadura	20	20	20	20

En este ensayo se formaron *natas* muy delgadas y oscuras, pero crecieron hongos, por lo tanto debe agregarse un inhibidor de hongos y levaduras para que no afecte el desarrollo normal de la bacteria.

Esta contaminación no benefició el ensayo, debido a que los microorganismos mencionados retrasaron el desarrollo del *Acetobacter xylinum* al producirse una competencia entre ellos por el sustrato y además cambiaron las características de color, grosor y firmeza del producto final (*nata*).

4.3.2 Ensayo n°2. Debido a la contaminación por hongos que se produjo en el ensayo n°1, se debió crear un nuevo licor madre Industrial en el cual se agregó 1g/kg de sorbato de potasio. En el CUADRO 7 se muestran los ingredientes que se utilizaron para este ensayo.

CUADRO 7. Variación de los ingredientes del ensayo n°2.

Ingredientes	Cantidad (g/kg)			
Pulpa	100	200	300	400
Azúcar	50	50	50	50
Agua	700	600	500	400
L madre	130	130	130	130
Ext. levadura	20	20	20	20
Sorbato de potasio	1	1	1	1

En todos los sub ensayos se formaron *natas* muy delgadas, frágiles y de un color morado muy oscuro.

Con respecto a la cantidad de pulpa agregada no existe ninguna diferencia entre los sub-ensayos, por lo tanto, se decidió trabajar con las concentraciones de pulpa más bajas (10% y 20%).

4.3.3 Ensayo n°3. Para los fines de obtener una calidad adecuada, se hace necesario controlar en forma permanente el nivel de temperatura de la cámara fermentadora durante el período de incubación de los baldes con el producto. Para este fin se programó la cámara fermentadora con el rango de temperatura entre 28 y 32 °C y además se dejó un termómetro en su interior, para así poder llevar un registro. Para evitar la rápida evaporación del agua que contenían las mezclas se incorporó un humidificador a la cámara de fermentación, la cual era controlada 3 veces al día.

Los ingredientes que se utilizaron para formular el ensayo n°3 son los que se observan en el CUADRO 8.

CUADRO 8. Ingredientes utilizados en el ensayo n°3.

Ingredientes	Cantidad (g/kg)	
Pulpa	100	200
Azúcar	100	100
Agua	664	564
L madre	130	130
Sorbato de potasio	1	1
Ext de levadura	5	5

En ninguno de estos sub-ensayos se formó *nata*, esto se debió probablemente a que se utilizó un licor madre con una población de *Acetobacter xylinum* muy vieja (alrededor de 40 días).

4.3.4 Ensayo nº4. Al no formarse *nata* en el ensayo nº 3 se trabajó con *A. xylinum* recién activado.

En el CUADRO 9 se muestran las 5 formulaciones de este ensayo y una de ellas será la que se definirá como la óptima para la realización de los futuros ensayos.

CUADRO 9. Formulaciones ensayo nº4.

Ingredientes	Formulaciones (g)				
	1	2	3	4	5
Pulpa	10	10	10	10	10
Agua	79	79	79	79	79
Sorbato de potasio	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Azúcar	10	10	10	10	10
Ext. de levadura	1	1	1	1	1
<i>A. xylinum</i>	1	1	1	1	1
CaCl ₂	0,6			0,6	
KH ₂ PO ₄		0,3		0,3	0,3
NaCl			0,5		0,5

Las natas formadas en las diferentes formulaciones de este ensayo tienen las siguientes características:

Formulación 1: Delgada, poco firme.

Formulación 2: Delgada translúcida y poco firme.

Formulación 3: Delgada y firme.

Formulaciones 4 y 5: Gel grueso, muy firme.

La determinación del color de las *natas* se realizó en el colorímetro Color-Tester LFM1, obteniéndose así las coordenadas, las cuales se observan en el CUADRO 10. Estas coordenadas se llevaron a la Carta de Colores del Sistema C.I.E. – XYZ que se observa en la FIGURA 7.

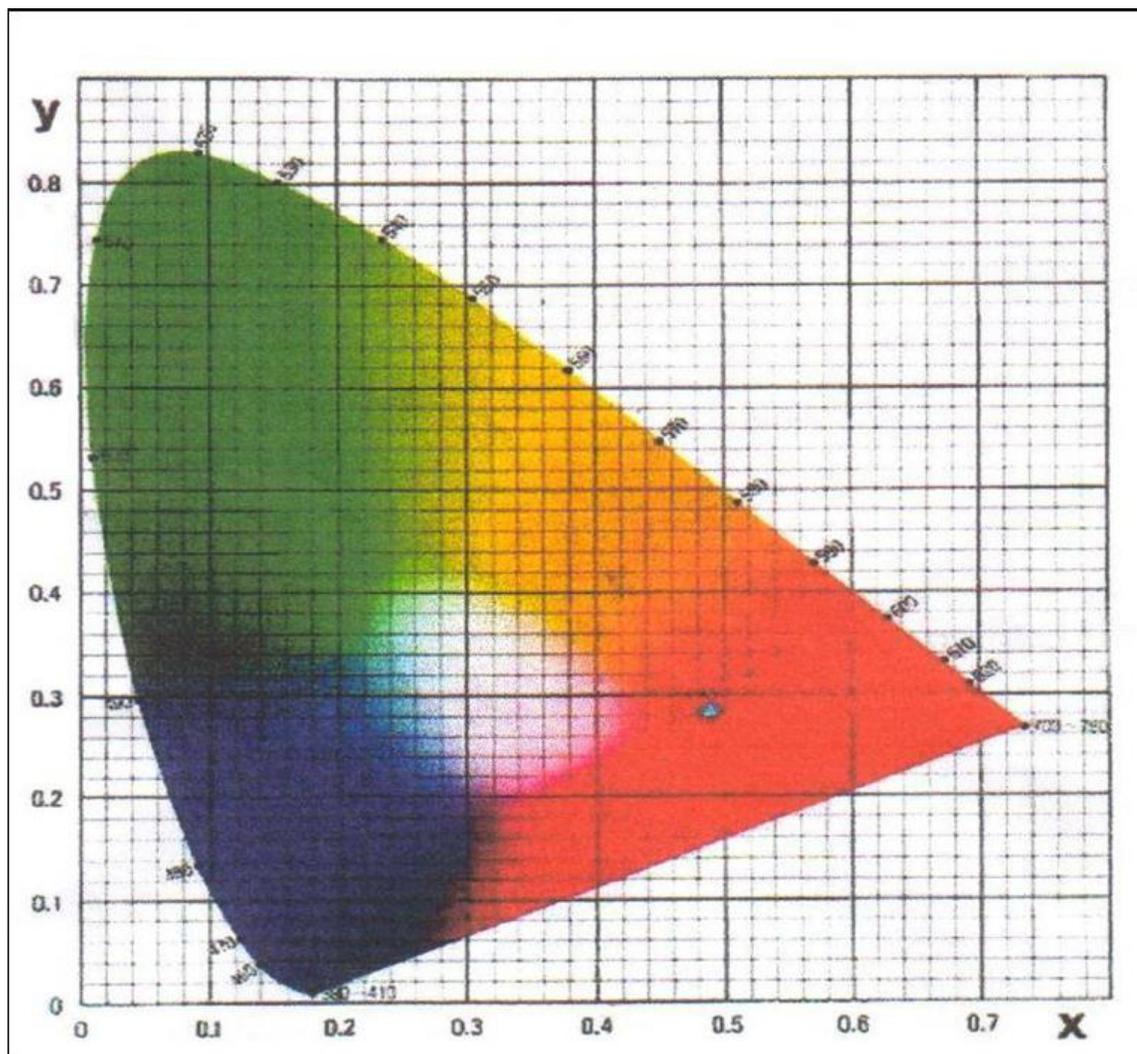


FIGURA 7. Carta Colores del Sistema C.I.E- XYZ.

CUADRO 10. Coordenadas carta de colores ensayo n° 4.

Nata	Coordenadas	
	X	Y
1	0,284	0,217
2	0,278	0,06
3	0,350	0,30
4	0,349	0,33
5	0,351	0,32

Con este ensayo se determinó que la mejor formulación para la elaboración de *nata* es la n° 4 del CUADRO 9 la cual contiene cloruro de calcio y fosfato de potasio, por lo tanto, con ésta se realizaron los próximos ensayos.

En la FIGURA 8 se pueden observar *natas* y licores madres primarios que se elaboraron con la mejor formulación del ensayo n° 4.

**FIGURA 8. Natas de arándano y licores madres.**

4.3.5 Ensayo n°5. El licor madre industrial para este ensayo se elaboró con el medio líquido (90g) que quedó luego de sacar la *nata* formada en el matraz de la formulación n°4 del ensayo anterior, con los ingredientes que se observan en el CUADRO 11, pero en una bandeja con capacidad para 750g de mezcla.

CUADRO 11. Ingredientes para reforzar licor madre ensayo n° 5.

Ingredientes	Cantidad (g)
Pulpa	104
Azúcar	69
Agua	416
L madre	90
Sorbato de potasio	0,07
Ext de levadura	6,9
CaCl ₂	4,2
KH ₂ PO ₄	2

Este licor madre ya reforzado se dejó fermentar por 15 días, transcurrido este tiempo de fermentación se armó el ensayo n° 5, con los ingredientes que se observan en el CUADRO 12. Este ensayo fue montado en una bandeja con capacidad para 750g de mezcla.

CUADRO 12. Formulación ensayo n°5.

Ingredientes	Cantidad (g)
Pulpa	120
Azúcar	75
Agua	443
L madre	97,5
Sorbato de potasio	0,075
Ext de levadura	7,5
CaCl ₂	4,5
KH ₂ PO ₄	2,25

En el licor madre industrial de este ensayo se obtuvo una nata de 3,75 mm de espesor, muy frágil y de 202,8 g de peso y la *nata* de la bandeja resultó de un color morado oscuro, delgada, frágil y un peso de 55,6 g.

4.3.6 Ensayo n°6. Este nuevo licor madre Industrial CUADRO 13, preparado con 390g del licor madre industrial del ensayo n°5, se dejó fermentar por casi 1 mes y se obtuvo un gel de 277,7 g de peso, 1,3 cm de espesor, firme y las coordenadas para la determinación de color (ver FIGURA 7) son: $x = 0,352$ e $y = 0,32$.

CUADRO 13. Formulación licor madre ensayo n°6.

Ingredientes	Cantidad (g)
Pulpa	450
Azúcar	300
Agua	1803
Licor madre ensayo n° 5	390
Sorbato de potasio	0,3
Ext de levadura	30
CaCl ₂	18
KH ₂ PO ₄	9

En la FIGURA 9 se puede observar el gel obtenido en este ensayo, el cual es muy parecida a la *nata* del ensayo n°4.

**FIGURA 9. Nata de arándano del ensayo n°6.**

De la *nata* obtenida en este ensayo se extrajo un trozo (59 g) para ser liofilizado. Luego del proceso de liofilización la *nata* se redujo a 1,4 g. Ésta ya liofilizada se paso por un molino con 2 diferentes tamices (0,5 mm y 1,5 mm), obteniéndose así un polvo con dos diferentes granulometrías.

4.3.7 Ensayo n°7. En este ensayo se trabajó con el licor madre industrial enriquecido en el ensayo anterior y los ingredientes de este ensayo son los que se observan en el CUADRO 14.

CUADRO 14. Enriquecimiento licor madre ensayo n°7.

Ingredientes	Cantidad (g)
Pulpa	113
Azúcar	70
Agua	453
Sorbato de potasio	0,06
Ext de levadura	6,42
CaCl ₂	3,8
KH ₂ PO ₄	1,9
Licor madre ensayo n°6	2722

Los ingredientes para los dos baldes y la bandeja son los que se observan en el CUADRO 15.

CUADRO 15. Ingredientes ensayo n°7.

Ingredientes	Cantidad (g)	
	Balde 1 y 2	Bandeja
Pulpa	230	-
Azúcar	300	75
Agua	922	-
L madre	1491	660
Sorbato de potasio	0,3	0,075
Ext de levadura	30	7,5
CaCl ₂	17,7	4,38
KH ₂ PO ₄	9	2,14

Luego de 13 días de fermentación en los baldes se formó *nata* pero en la bandeja no hubo formación del gel celulósico. La no formación de la *nata* en la bandeja se atribuye a que la cantidad de mezcla agregada es muy poca (750 g) y a medida que transcurre el tiempo de fermentación el agua que contiene el medio se va evaporando, lo que implica que el nivel de la mezcla baje y se deshidrate muy rápidamente.

Al cambiar las condiciones de fermentación, el *Acetobacter xylinum* no va a trabajar de forma correcta, esto quiere decir que cualquier cambio ya sea externo u interno va a afectar la producción del gel celulósico. Esto confirma lo que indican LLAGUNO y POLO (1991).

	Peso (g)	Espesor (cm)	Color		Firmeza
			X	Y	
<i>Nata</i> balde 1	159,5	1,3	0,375	0,285	Muy firme
<i>Nata</i> balde 2	140,6	0,9	0,38	0,294	Muy firme

Las *natas* que se obtuvieron en los baldes son las que se aprecian en la FIGURA 10 y sus características se observan a continuación.

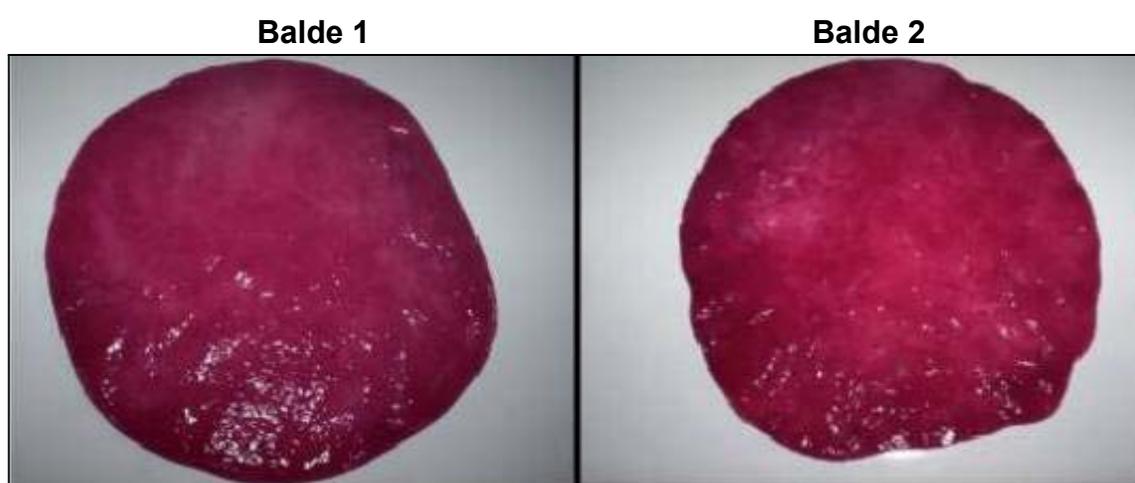


FIGURA 10. *Natas* del ensayo 7.

4.4 Análisis químico

El análisis químico efectuado a la *nata* liofilizada se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal del Instituto de Producción Animal de la Universidad Austral de Chile y los datos obtenidos son los que se observan a continuación en el CUADRO 16.

CUADRO 16. Análisis químico de la *nata* de arándano.

Humedad (%)	Ceniza total (%)	Fibra cruda (%)		Proteína (%)
		FC	FDN	
97,62	2,47	13,51	10,50	9,12

El análisis químico realizado a la *nata* de arándano entregó una humedad de 97,62%, la cual está sobre el 84,4% de humedad que posee la *nata* de coco.

4.5 Observación al microscopio electrónico de barrido

Debido a que se contaba con una muestra de *nata* de coco se pudo comparar la estructura de ambas *natas* (coco y arándano) en los diferentes estados de la formación de la red celulósica. Esta comparación se realizó mediante la observación al microscopio electrónico de barrido. En la FIGURA 11 se pueden observar las fotografías de ambas *natas*.

4.6 Determinación del contenido total de antocianos

La totalidad de los antocianos monoméricos fueron determinados por el método diferencial de pH, según lo descrito por GIUSTI y WROLSTAD (2002). Las muestras fueron dispuestas directamente sobre las celdas, la absorbancia se leyó en un espectrofotómetro Genesys 5 Spectronic Instruments a 520 nm y 700 nm. El contenido del pigmento fue calculado como cyanidina-3-glucosido (antociano que se presenta en mayor cantidad en el arándano), usando el coeficiente de extinción molar (ϵ) de $26900 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$, un peso molecular (M_w) de $449,2 \text{ g mol}^{-1}$ y un factor de dilución (Df) de 30.

Esta determinación se le realizó al licor madre industrial y a la *nata*, dando como resultado promedio para el licor madre 200 mg antocianos/100g de licor y para la *nata* 70 mg antocianos/100g de *nata*.

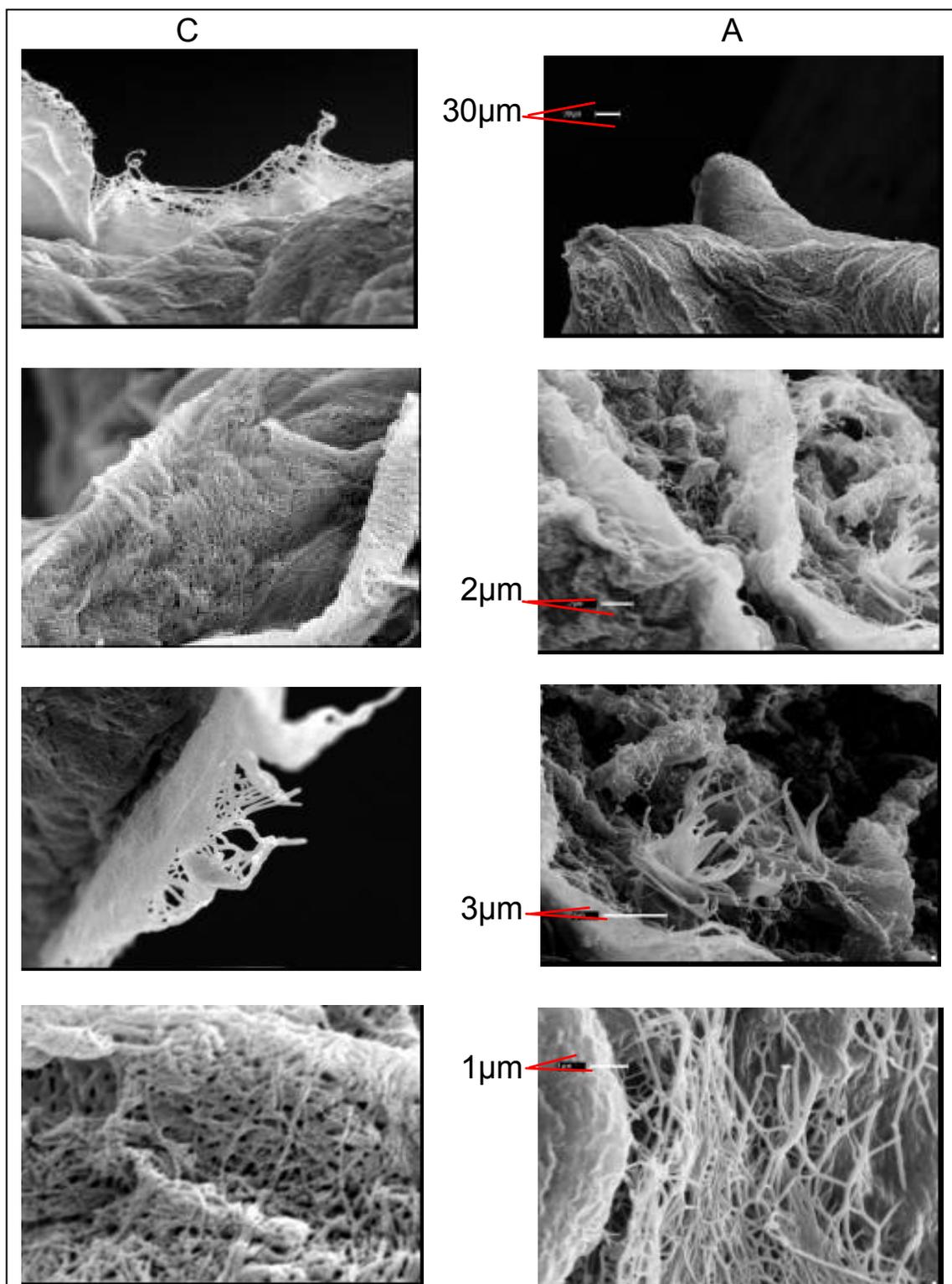


FIGURA 11. Fotografías de Microscopia Electrónica de Barrido.

C: Nata de coco

A: Nata de arándano

5. CONCLUSIONES

- Es posible con una adecuada formulación (pulpa, agua, sorbato de potasio, azúcar, extracto de levadura, cloruro de calcio y fosfato de potasio) obtener *natas* de buena calidad, espesor, resistencia y color.
- Los licores madres formulados e inoculados presentaron concentración de microorganismos en el rango de 10^5 a 10^{10} UFC/ml.
- A pesar de tener concentraciones de *Acetobacter xylinum* altas en los licores madres la producción de *nata* fue muy variable.
- Los recuentos de *Acetobacter* disminuyeron a medida que crece el número de generaciones; lo cual indica la pérdida de vigor de la población.
- La reactivación frecuente de los cultivos con cepas originales, frecuentemente es necesario.
- El color de las *natas* fue congruente con la transferencia de pigmentos desde el licor que contenía jugo de arándano, dando como resultado un color morado. El contenido de antocianos en el licor madre fue de 200 mg/100g y en la *nata* de 70 mg/100g.
- En las muestras de microscopía electrónica de barrido se observa una estructura similar a la observada en publicaciones respecto de otras *natas* como por ejemplo la nata de coco.

6. RESUMEN

La *nata* de arándano es un gel rico en celulosa que se forma en la superficie de una solución industrial denominada *Licor Madre* que contiene jugo de arándano y una serie de otros ingredientes en presencia de un microorganismo fermentativo altamente específico llamado *Acetobacter xylinum*.

El objetivo general de este estudio fue la optimización del proceso para la elaboración de la *nata* de arándano y el adecuado desarrollo del *Acetobacter xylinum*. Para lograr esto, se realizaron 7 ensayos en diferentes medios de cultivo. Estos medios se diferenciaron en los contenidos de los ingredientes específicos y en la geometría de los recipientes de fermentación.

A través de estudios de cinética de crecimiento del microorganismo se estableció que el envejecimiento de las poblaciones tenía un efecto determinante sobre el éxito en la producción de *nata*.

El procedimiento para la elaboración de la *nata* consistió en el pesaje, calentamiento y despulpado del fruto. Luego se preparó un jugo con 20% de pulpa; la mezcla y homogeneización de los ingredientes se realizó a temperatura ambiente para luego ser incubados en una cámara de fermentación que se encontraba entre 28-30 °C. Una parte de las *natas* obtenidas fueron lavadas y observadas en el microscopio electrónico de barrido y el resto luego del lavado, fueron molidas para poder ser sometidas a un análisis químico. También se le determinó el contenido total de antocianos al licor madre y a la *nata*.

Como resultado de los 7 ensayos, la formulación que contenía 10g de pulpa, 79g de agua, 0,01g de sorbato de potasio, 10g de azúcar, 1g de extracto de levadura, 1g de *Acetobacter xylinum* activado, 0,6g de CaCl₂ y 0,3g de KH₂PO₄, fue el mejor medio para el desarrollo de la bacteria y la formación de *nata*.

SUMMARY

Blueberry nata is a high cellulose gel formed in the surface of an industrial solution called mother liquor that contains blueberry juice and several ingredients in presence of a highly specific fermentative microorganism called *Acetobacter xylinum*.

The main objective of this study was process optimization for blueberry *nata* production and to find out an acceptable medium for *Acetobacter xylinum* development. To achieve this goal, seven assays were carried out in different culture media. These media were different both on the specific ingredient content and the geometry of the fermentation container.

Kinetic studies carried out showed that the population aging has an important effect on the successful *nata* production.

The procedure for *nata* production included fruit weighing, heating and pulping. Then a 20% formulation of the pulp juice was prepared and then blending and homogenization of the ingredients were carried out at room temperature and then incubated at 28-30 °C. Part of the *natas* was washed, rinsed and observed under electronic scanning microscope and the rest of them was rinsed, dried and grinded to be chemically analyzed.

Total anthocyanin content was determined in mother liquors and *natas*.

As a result of the seven assays the formulation containing 10 g pulp, 79 g water, 0,01 g potassium sorbate, 10 g sugar, 1 g of yeast extract, 1 g of activated *Acetobacter xylinum*, 0,6 g of CaCl_2 and 0,3 g of KH_2PO_4 , was found to be the best medium for development of the bacteria and *nata* formation.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ANTÓN, A., LLUCH, M. y PÉREZ, I. 1999. Cuantificación y caracterización de la materia colorante en lías procedentes de vinos tintos de la zona Utiel-Requena. *Vitivinicultura/ Enología*. 60:53-61.
- ARTHEY, D. y ASHURST, P. 1996. *Procesado de frutas*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. España. 273 p.
- BADUI, S. 1999. *Química de los Alimentos*. Longman de México Editores S.A. Estado de México. México. 648 p.
- BADUI, S. 1988. *Diccionario de tecnología de los alimentos*. Editorial Alambra Mexicana. Colonia del Valle. México. 300 p.
- BANWART, G., 1979. *Basic Food Microbiology*. AVI Publishing Company, Inc. Second Editions. Westport. Connecticut. 781 p.
- BIELECKI, S., KRYSZYNOWICZ, A., TURKIEWICZ, M. y KALINOWSKA, H. 2001. *Bacterial Cellulose*. Institute of Technical Biochemistry. 37-46.
- BREED, R, MURRAY, E, SMITH, N. 1957. *Bergey's. Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams & Wilkins Company. Seventh Editions. Baltimore. USA. 1094 p.
- BUZETA, A. 1997. *Chile: Berries para el 2000*. Fundación Chile. Santiago, Chile. 135 p.

- CLIFFORD, M., 2000. Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80:1063-1072.
- CRUEGER, W. y CRUEGER, A. 1993. *Biología: Manual de microbiología Industrial*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. España. 413 p.
- CHILDERS, N. 1949. *Modern Fruit science*. Horticultural Publications. New Jersey. Estados Unidos. 969 p.
- CHILE. FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA (FIA). 2002. *Estrategia para la Innovación Agraria para la Producción de Berries*. Santiago, Chile. 66 p.
- CHUNG, Y. y SHYU, Y., 1999. The effects of pH, SALT, heating and freezing on the physical properties of bacterial cellulose-nata. *International Journal of Food Science and Technology*. 34:23-26.
- DANESI, E. Y WOSIACKI, G. 1998. Optimization of nata [bacterial cellulose] production by surface fermentation. *Ciencia e Tecnología de Alimentos*. 18, 1: 131-139.
- DUCKWORTH, R. 1968. *Frutas y Verduras*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. España. 304 p.
- EMBUSCADO, M., MARKS, J. y BEMILLER, J. 1994a. Bacterial Cellulose I. Factors affecting the production of cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Food Hydrocolloids*. 8, 5:407-418.

- EMBUSCADO, M., MARKS, J. y BEMILLER, J. 1994b. Bacterial Cellulose II. Optimization of cellulose production by *Acetobacter xylinum* through response surface methodology. *Food Hydrocolloids*.8, 5:419-430.
- GIUSTI, M. y WROLSTAD, R. 2002. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. *Food Analytical Chemistry*. F1.2. 11p.
- HEO, M. y SON, H. 2002. Development of an optimised, simple chemically defined medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 36, 41-45.
- HOLT, J., KRIEG, N., SNEATH, P., STALEY, J. y WILLIAMS, S. 2000. *Bergey's. Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edithion. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. USA. 787 p.
- ISHIHARA, M., MATSUNAGA, M., HAYASHI, N. y TISLER, V. 2002. Utilization of D-xylose as carbon source for production of bacterial cellulose. *Enzyme and Microbial Technology*. 31, 986-991.
- IVERSEN, C. 1999. Black currant néctar: Effect of processing on storage anthocyanin and acid content. *Journal of Food Science*. 64. 1: 37-41.
- JU, Z. y HOWARD, L. 2003. Effects of solvent and temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

- KADER, F., ROVEL, B. y METCHE, M. 1996. Fractionation and identification of the phenolic compounds of Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*, L.). *Food Chemistry*. 55,1:35-40.
- KALT, W., MCDONALD, J. y DONNER, H. 2000. Anthocyanins, Phenolics and Antioxidant Capacity of Processed Lowbush Blueberry Products. *Food Chemistry and Toxicology*. 65, 3:390-393.
- KIMURA, S., CHEN, H., SAXENA, I., BROWN, M. y ITOH., T. 2001. Localization of c-di- GMP-Binding Protein with the Linear Terminal Complexes of *Acetobacter xylinum*. *Journal of Bacteriology*. 18,19:5668-5674.
- KOLLMANN, F. 1959. *Tecnología de la madera y sus aplicaciones*. Graficas Reunidas. Madrid. España. 675 p.
- LEE, J., DURST, R. y WROLSTAD, R. 2002. Impact of Juice Processing on Blueberry Anthocyanins and Polyphenolics: Comparison of Two Pretreatments. *Journal of Food Science*. 67, 5:1660-1667.
- LEE, S., PROSKY, L. y VRIES, J. 1992. Determination of Total, Soluble and Insoluble Dietary Fiber in Food – Enzymatic – Gravimetric Method, MES – TRIS Buffer: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*. 75, 3: 395-416.
- LEE, J y WROLSTAD, R. 2004. Extraction of Anthocyanins and Polyphenolics from Blueberry Processing Waste. *Journal of Food Science*. 69, 7: C564-573.

- LIN, K. y LIN, H. 2004. Quality Characteristics of Chinese-style Meatball Containing Bacterial Cellulose (Nata). *Journal Food Science*. 69. 3:107-111.
- LINDEN, G. y LORIENT, D. 1996. *Bioquímica Agroindustrial*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. España. 428 p.
- LLAGUNO, C. y POLO, C. 1991. *El Vinagre de Vino*. Emcomp S.A. Madrid. España. 238 p.
- MATEUS, N., PROENCA, S., RIBEIRO, P., MACHADO, J. y DE FREITAS, V. 2001. Grape and wine polyphenolic composition of red *Vitis vinifera* varieties concerning vineyard altitude. *Ciencia y tecnología de los alimentos*. 3, 2:102-110.
- MATISSEK, R., SCHNEPEL, F. y STEINER, G. 1992. *Análisis de los alimentos*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. España. 416 p.
- MUÑOZ, C. 1988. Arándano: antecedentes generales. Seminario: El cultivo del arándano.
- RIZZOLO, A., NANI, R., VISCARDI, D., BERTOLO, G. y TORREGGIANI, D. 2003. Modification of glass transition temperature through carbohydrates addition and anthocyanin and soluble phenol stability of frozen blueberry juices. *Journal of Food Engineering*. 56:229-231.
- ROMERO, C. Y BAKKER, J. 2000. Anthocyanin and color evolution during maturation of four port wines: effect of pyruvic acid addition. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 81: 252-260.

- SAKAIRI, N., ASANO, H., OGAWA, M., NISHI, N. y TOKURA, S. 1998. A method for harvest of bacterial cellulose filaments during continuous cultivation of *Acetobacter xylinum*. *Carbohydrate Polymer*. 35:233-237.
- SENER, F y SCHERZ, H. 1999. Tablas de composición de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. España. 430 p.
- SCOTT, L. 1999. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology*. 70, 1:1-9.
- SHAIJI, F y NACZK, M. 1995. Food Phenolics. Technomic Publishing Book, Inc. Pennsylvania, USA. 331 p.
- SHEU, F., WANG, C. y SHYU, Y. 2000. Fermentation of *Monascus purpureus* on Bacterial Cellulose-nata and the Color Stability of Monascus-nata Complex. *Journal of Food Science*. 65, 2:342-345.
- SMITH, M., MARLEY, K., SEIGLER, D., SINGLETARY, K. y MELINE, B. 2000. Bioactive Properties of Wild Blueberry Fruits. *Journal of Food Science* 65, 2: 352-356.
- SON, H.J, KIM, H.G, KIM, K.K., KIM, H.S., KIM, Y.G. y LEE. S.J. 2003. Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions. *Bioresource Technology*. 86:215-219.
- STRASBURGER, E., NOLL, F., SCHENCK, H. y SHIMPER, A. 1965. Tratado de Botánica. Editorial Marín S.A. Quinta Edición. Barcelona. España. 651 p.

- SKREDE, G., WROLSTAD, R. y DURST, R. 2000. Changes in Anthoyanins and Polyphenolics During Juice Processing of Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum L.*). Journal of Food Science. 65. 2:357-364.
- SUDZUKI, F. 2002. Cultivo de frutales menores. Editorial Universitaria. Séptima Edición. Santiago, Chile. 194 p.
- VANDAMME, E., DE BAETS, S., VANBAELEN, A., JORIS, K. y DE WULF, P. 1998. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. Polymer Degradation and Stability. 59, 1-3: 93-99. (Abstracts).
- VERSCHUREN, P., CARDONA, T., NOUT, R., GOOIJER, K. y VAN DEN HEUVEL, J. 2000. Location and limitation of cellulose production by *Acetobacter xylinum* established from oxygen profiles. Journal of Bioscience and Bioengineering. 89, 5:414-419. (Abstracts).
- WOOD, B. 1985. Microbiology of Fermented Foods. Elsevier Applied Science Publishers. Ltda. New York. USA. 371.
- ZIPORA, G. y HESTRIN, S. 1963. Synthesis of Cellulose by *Acetobacter xylinum*. Journal Bacteriology. 83, 284-292.