

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

**Obtención de Condiciones de Elaboración de Vinagre
de Arándanos (*Vaccinium corymbosum*)
Utilizando Torta de Prensa**

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

Olivia Andrea Pizarro Casner
VALDIVIA – CHILE
2005

PROFESOR PATROCINANTE

Sr. Fernando Figuerola Rivas

Ingeniero Agrónomo

M.S. Food Science

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos _____

PROFESOR INFORMANTE

Sra. Marcia Costa Lobo

Ingeniero Civil Bioquímico, Diploma Ingeniería Industrial

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos _____

PROFESOR INFORMANTE

Sr. Haroldo Magariños Hawkins

Técnico Lechero

Magíster en Ciencia y Tecnología de la Leche

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos _____

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a la Virgen por acompañarme en todas mis actividades y entregarme la fuerza necesaria para terminar esta importante etapa de mi vida.

Agradezco a mi Profesor Patrocinante Don Fernando Figuerola, por la confianza y ayuda entregada en varios años.

A los Profesores Sra. Sade Selaive y Don Fernando Asenjo por participar activamente en esta investigación y colaborar en el término de ésta.

A los Profesores Don Bernardo Fraser y Don Erwin Carrasco, por la ayuda entregada en la realización de esta investigación y por su buena disposición que siempre tuvieron a atender mis dudas.

A los profesores informantes Sra. Marcia Costa y Don Haroldo Magariños por las sugerencias entregadas para la realización de este trabajo.

A Don Ignacio de Ory, de la Universidad de Cádiz, por la colaboración y buena disposición que tuvo para resolver mis dudas, entregarme sugerencias y la información requerida.

A mis Padres, Patricia y Jorge por la confianza puesta en Mi y por el gran esfuerzo realizado para terminar este proyecto; a mis Abuelitos Mario e Ida por todo el amor que me han dado siempre y a mis hermanitas Priscilla y Nathalie por su cariño y alegría.

A Patricio por acompañarme, darme fuerzas y mucho amor.

A mis compañeros y amigos de carrera: Yayo, Paola, Pamela, César, José, Pato Ramírez y las promociones 97, 98 y 99 que me regalaron su amistad y cariño durante el transcurso de esta etapa; agradecer lo hermosa que fue, en especial a mi gran amigo Yayo, ya que estos años de Universidad no hubiesen sido los mismos sin su amistad y a mis amigas Pamela y Paola por el hermoso vínculo creado en el desarrollo de nuestras tesis.

***A mis Abuelitos, Padres
y Hermanitas...***

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Antecedentes generales del vinagre	3
2.1.1	Condiciones óptimas de fermentación acética	4
2.1.1.1	Características de la materia prima (sustrato)	4
2.1.1.2	Influencia de la temperatura	5
2.1.1.3	Influencia de la aireación	6
2.1.1.4	Concentración del inóculo	6
2.1.2	Organismos iniciadores de la producción de vinagre	7
2.1.3	Métodos de producción de vinagre	9
2.1.3.1	Fermentación en cultivo superficial	10
2.1.3.2	Fermentación en cultivo sumergido	10
2.2	Antecedentes del vinagre de frutas	11
2.3	Antecedentes del vinagre a partir de alcohol	11
2.4	Compuestos aromáticos en vinagre	14
2.5	Antecedentes generales del arándano	15
2.5.1	Distribución de la especie en Chile	15
2.5.2	Composición química del fruto	16
2.6	Beneficios del arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i>)	16
2.7	Etapas y características del procesamiento de arándanos para la obtención de jugo concentrado y residuo de torta de prensa	18
2.7.1	Obtención del residuo de torta prensada "Press cake residue"	18
2.7.2	Extracción del pigmento	19
3	MATERIAL Y MÉTODO	21

3.1	Lugar de ensayo	21
3.2	Disponibilidad de equipos y materiales	21
3.3	Materiales	21
3.3.1	Materia prima	21
3.3.2	Solución hidroalcohólica	21
3.3.3	Nutrientes	21
3.4	Métodos	22
3.4.1	Identificación y aislación del microorganismo iniciador de la fermentación acética	22
3.4.2	Preparación del inóculo madre	25
3.4.2.1	Cálculo de la velocidad específica de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$)	25
3.4.3	Descripción del diagrama de elaboración del vinagre	26
3.4.3.1	Recepción de materia prima	26
3.4.3.2	Extracción con mezcla hidroalcohólica	26
3.4.3.3	Fermentación acética en cultivo sumergido	26
3.4.3.4	Clarificación del vinagre	27
3.4.3.5	Filtración del vinagre	27
3.4.3.6	Pasteurización del vinagre	27
3.4.4	Diseño experimental	28
3.4.5	Mediciones a realizar	30
3.4.5.1	Determinación del grado alcohólico	30
3.4.5.2	Determinación de acidez total	30
3.4.5.3	Determinación del pH	31
3.4.5.4	Determinación de concentración de etanol en vinagre	31
3.4.5.5	Determinación de rendimiento	31
3.4.5.6	Determinación de velocidad de acetificación	32
3.4.5.7	Determinación del contenido total del pigmento antocianina	32
3.4.5.8	Evaluación organoléptica del vinagre elaborado	33
3.4.6	Análisis de datos	33

4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	35
4.1	Microorganismo iniciador de la fermentación	35
4.1.1	Identificación y aislamiento del microorganismo iniciador del proceso de fermentación acética	35
4.1.2	Identificación a nivel de género	36
4.1.3	Formación de compuestos cetónicos a partir de glicerina	36
4.1.4	Formación de ácidos 2-5 cetoglucónicos y dicetoglucónicos a partir de glucosa	37
4.1.5	Crecimiento en etanol	37
4.2	Cinética de crecimiento para <i>Gluconobacter spp</i>	37
4.3	Fermentación acética	42
4.3.1	Rendimiento y velocidad de acetificación	42
4.3.1.1	Rendimiento	44
4.3.1.2	Velocidad de acetificación	47
4.4	Evaluación sensorial del vinagre	49
4.4.1	Intensidad del aroma	50
4.4.2	Color	50
4.4.3	Sabor ácido	52
4.4.4	Nivel de agrado del sabor ácido	53
4.4.5	Impresión general	53
4.4.6	Perfil sensorial del vinagre de arándanos	55
4.5	Determinación de antocianinas	56
5	CONCLUSIONES	58
6	RESUMEN	60
	SUMMARY	61
7	BIBLIOGRAFÍA	62
	ANEXOS	70

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Superficie regional de arándanos 2001	15
2	Comparación de la producción de arándanos entre los años 1997 y 2000	16
3	Composición química del arándano	17
4	Nutrientes necesarios para la fermentación acética	22
5	Medio estándar de crecimiento de bacterias acéticas	23
6	Medio para formación de compuestos cetónicos a partir de glicerina	23
7	Medio para la formación de ácidos 2 y 5 cetoglucónicos y dicetoglucónico a partir de glucosa	24
8	Medio Frateur para el crecimiento sobre etanol	24
9	Medio para la identificación a nivel de género	25
10	Diseño experimental	30
11	Condiciones del cromatógrafo	31
12	Velocidades de acetificación promedio por tratamiento	48
13	Resultados de la evaluación sensorial de vinagre de arándanos	51
14	Resultados del contenido de antocianos para las muestras de vinagre	57

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Influencia de la concentración de etanol y ácido acético sobre el crecimiento bacteriano de <i>Acetobacter aceti</i>	5
2	Utilización de sustrato por la célula en un proceso de fermentación acética en cultivo batch	9
3	Obtención del residuo de torta de prensa a partir del procesamiento de arándanos (<i>Vaccinium corymbosum</i>)	20
4	Sistema de fermentación utilizado	28
5	Línea de flujo para la elaboración de vinagre de arándanos	29
6	Acetobacterias encontradas en vinagres madres de la Xª Región del País	35
7	Resultados prueba identificación a nivel de género	36
8	Irisación de bacterias acéticas	37
9	Cinética de crecimiento para <i>Gluconobacter spp</i>	38
10	Cálculo de las velocidades específicas de crecimiento para <i>Gluconobacter spp.</i>	39
11	Cinética de crecimiento del inóculo madre de vinagre de arándanos	40
12	Evolución de la concentración de biomasa y ácido acético del inóculo madre	41
13	Cálculo de las velocidades específicas de crecimiento para el inóculo madre	42
14	Evolución de la concentración de acidez en el tiempo	43

15	Evolución de la concentración etanol en el tiempo	44
16	Rendimiento del proceso de fermentación acética	45
17	Cinética de producción de ácido acético en el tiempo	50
18	Calificaciones otorgadas por el panel sensorial para el atributo intensidad del aroma	51
19	Calificaciones otorgadas por el panel sensorial para el atributo nivel de agrado del aroma	52
20	Calificaciones otorgadas por el panel sensorial para el atributo color	53
21	Calificaciones otorgadas por el panel sensorial para el atributo de sabor ácido	54
22	Calificaciones otorgadas por el panel sensorial para el atributo nivel de agrado del sabor ácido	54
23	Calificaciones otorgadas por el panel sensorial para el atributo de impresión general	55
24	Evaluación sensorial descriptiva global	56

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Planilla de evaluación sensorial de vinagre	71
2	Valores de recuento viable en placa sobre medio estándar de crecimiento (GYC)	74
3	Evolución de la concentración de biomasa y acidez acética para el inóculo madre de vinagre de arándanos	75
4	Valores de la concentración de ácido acético y etanol por tratamiento	76
5	Valores de rendimiento para T1 a T6 por ciclo (duplicado)	77
6	Valores de velocidad de acetificación (p) para T1 a T6 (g de ácido acético/100 mLh)	80

1. INTRODUCCIÓN

El vinagre ha formado parte de la alimentación humana desde la antigüedad como condimento, conservador de alimentos y bases para remedios sencillos en hombres y animales. Las referencias más antiguas del uso del vinagre se encuentran en la cultura Babilónica (5000 A. C.) sobre la obtención de vinagre a partir de dátiles (LLAGUNO y POLO, 1991).

En la actualidad, la utilización de residuos en la elaboración de productos fermentados y específicamente la producción de vinagre ha sido constatada y llevada a cabo por diversos autores (RICHARDSON, 1967 y HORIUCHI *et al.*, 2004) como una manera de otorgar valor adicional y proponer un uso efectivo de los residuos agroindustriales.

Bajo este contexto, la línea de investigación del presente trabajo se enfoca en el proceso de fermentación acética para la producción de vinagre utilizando residuos de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L.); estos residuos se han obtenido durante el proceso de elaboración de jugo concentrado, desarrollado por la empresa Bayas del Sur S.A.

El cultivo de este frutal menor se ha intensificado en Chile y en particular en la X Región de Los Lagos a consecuencia de las óptimas condiciones agroecológicas que favorecen el establecimiento y desarrollo de las plantas, llegando a cultivarse 625 hectáreas al año 2001, lo que representa el 35,8% de la superficie a nivel de país.

El arándano se caracteriza por poseer un agradable aroma, sabor y apariencia, características organolépticas que complementan un componente funcional derivado de su alto contenido de antocianinas, polifenoles y por su capacidad antioxidante siendo muy apetecido en los mercados internacionales.

Según estos antecedentes la producción de vinagre a partir de arándanos, es una alternativa interesante para introducir en el mercado un

aderezo de sabor distinto con características organolépticas propias de los *blueberries* y con la ventaja de otorgar un valor agregado a residuos no utilizados.

La hipótesis planteada para esta investigación es la siguiente:

Es posible elaborar vinagre de arándanos utilizando residuo de torta de prensa, aplicando diversas concentraciones de etanol y aireación, y evaluar como estos factores afectan positivamente sobre el rendimiento, velocidad de acetificación, características químicas y sensoriales del vinagre.

Para lo anterior se pretende cumplir con los siguientes objetivos.

Objetivo general:

Elaborar vinagre de arándanos empleando como materia prima el residuo de torta de prensa obtenida del proceso de elaboración de jugo concentrado.

Objetivos específicos

- Aislar e identificar el microorganismo iniciador del proceso de fermentación acética, a partir de diferentes vinagres madres obtenidos en la X^a Región.
- Obtener condiciones iniciales de elaboración y procesamiento del vinagre a partir de cepas aisladas de bacterias acéticas.
- Caracterizar el vinagre evaluando características químicas y organolépticas del producto obtenido.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antecedentes generales del vinagre

El vinagre es uno de los productos fermentados más antiguos usados por el hombre. La palabra vinagre deriva de vino ácido (del Francés vinagre = vin “vino”, más agrio “ácido” o cortado) (WEISER, 1962).

Es y ha sido utilizado como condimento, aderezo en ensaladas y agente preservante de vegetales y carnes, su uso data de 4000 años A. C. (Greenshields citado por DEPPENMEIER *et al.*, 2002) y 5000 A. C. (LLAGUNO y POLO, 1991).

El proceso de fermentación toma lugar en vinos y mostos en contacto con el aire, por lo que se considera un alimento derivado del vino, es decir un subproducto del vino (Greenshields citado por DEPPENMEIER *et al.*, 2002).

El vinagre es definido como “un líquido ajustado para el consumo humano, producido por materias primas de origen agrícola, que contienen almidón y azúcares, por un proceso de doble fermentación (alcohólica y acética) y conteniendo una cantidad específica de ácido acético (FAO/WHO Food Standards programme, 1987 citado por TESFAYE *et al.*, 2002).

LLAGUNO y POLO (1991), entregan una definición del vinagre, en la cual se dice que deriva del Francés “vin aigre” (vino agrio), por lo que el procedente del vino merece ese nombre. Por extensión, se denominan vinagres a los productos resultantes de la fermentación acética de diversos sustratos alcohólicos, añadiendo al nombre vinagre el del sustrato correspondiente, como “vinagre de sidra”.

El vinagre es producido por dos fermentaciones, la primera corresponde a la conversión de azúcares fermentables a etanol por levaduras, del género *Saccharomyces* principalmente. La segunda fermentación se desarrolla a partir

de la oxidación de etanol por bacterias, del género *Acetobacter* (TESFAYE *et al.*, 2002).

El proceso de fermentación involucra, la producción de ácido acético, que es bacteriostático y/o bactericida dependiendo de su concentración. Por esto la fermentación acética, como la alcohólica, pueden ser utilizadas en procesos de preservación de alimentos (STEINKRAUS, 1997).

2.1.1 Condiciones óptimas de fermentación acética. La fermentación acética puede ser definida como un proceso bioquímico, por el cual las bacterias acéticas oxidan al etanol contenido en el sustrato alcohólico a ácido acético, bajo estrictas condiciones de aerobiosis. Las condiciones óptimas de fermentación se refieren a la ventaja de conocer la información acerca de la cinética de crecimiento bacteriano y de los procesos automatizados de fermentación (LLAGUNO y POLO, 1991).

Para que la fermentación acética ocurra se deben cumplir una serie de requisitos que incluyen el suministro de oxígeno, la temperatura óptima y las características de la materia prima.

2.1.1.1 Características de la materia prima (sustrato). Según LLAGUNO y POLO (1991), el sustrato alcohólico, debe estar libre de sabores y olores extraños, limpio, sin restos de azúcares fermentables que puedan provocar contaminaciones posteriores con levaduras. En cuanto a su graduación alcohólica, se ha venido considerando que los vinos utilizados en el proceso de acidificación deben ser de baja graduación, aunque se permite utilizar vinos con una graduación alcohólica de 10 a 12 % v.v.

En cuanto a la concentración de etanol, Gómez citado por DE ORY *et al.* (2002) plantea la influencia de la concentración de etanol sobre la fermentación acética y entrega una concentración óptima de 13 g/L. Aunque este valor depende de la concentración de otros compuestos tóxicos como ácido acético.

Otro factor que influye sobre la fermentación acética es la concentración de ácido acético. Bar citado por DE ORY *et al.* (2002), afirma que el ácido acético tiene un carácter de activador y a la vez de inhibidor, sobre la actividad del microorganismo *Acetobacter aceti*, por lo que han propuesto un efecto de activación sobre el crecimiento del microorganismo cercano a 10 g/L para el metabolismo bacteriano.

La FIGURA 1 muestra los rangos óptimos de las concentraciones de etanol y ácido acético y su influencia sobre el crecimiento bacteriano.

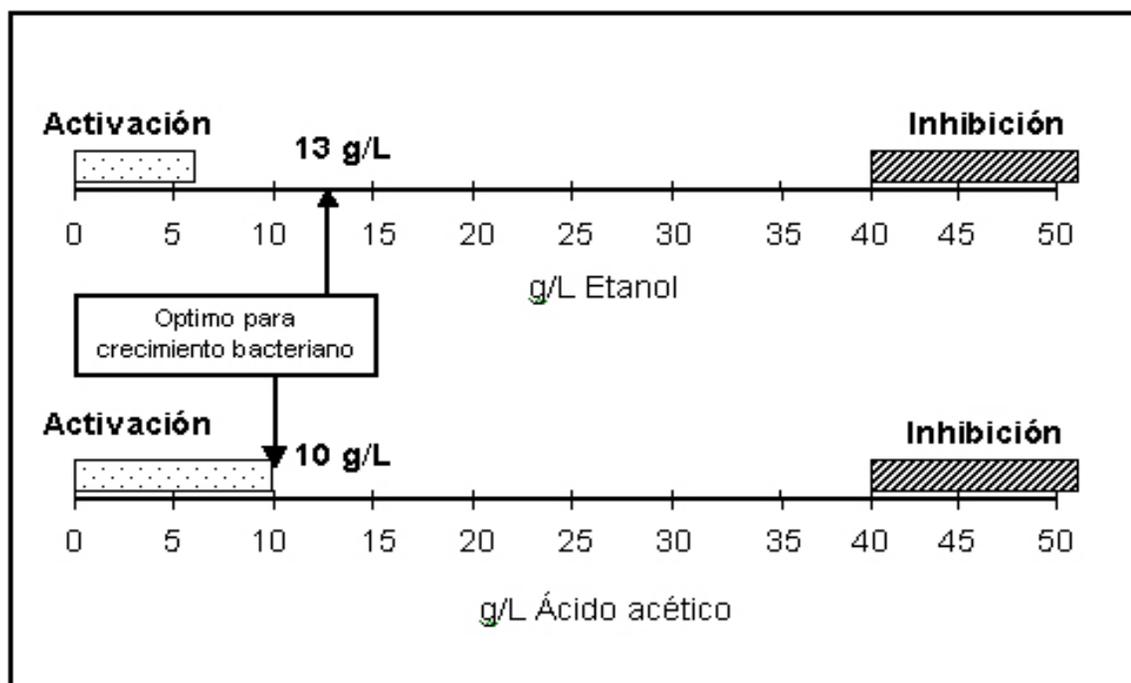


FIGURA 1. Influencia de la concentración de etanol y ácido acético sobre el crecimiento bacteriano de *Acetobacter aceti*.

FUENTE: DE ORY *et al.* (2002).

2.1.1.2 Influencia de la temperatura. La temperatura del medio influye sobre el crecimiento de microorganismo. LLAGUNO y POLO (1991), DE ORY *et al.* (1998b) y (2004) proponen una temperatura óptima de fermentación acética comprendida dentro del rango de 30 a 31 °C; de esta forma, el proceso de

fermentación es viable entre los 28 y 33 °C. Sin embargo, cuando la temperatura es superior a 33 °C o está por sobre la temperatura óptima, ocurre un proceso de desactivación bacteriana, en el cual las enzimas son denaturadas, la membrana dañada, causando que los constituyentes se dispersen y el organismo sea más sensible a los efectos tóxicos de la célula, además de aumentar las pérdidas de alcohol y productos volátiles.

2.1.1.3 Influencia de la aireación. El factor aireación, se considera fundamental, dado que las bacterias acéticas requieren de un suministro constante de oxígeno, además de una agitación orbital para homogeneizar el contenido y garantizar la aireación. La concentración de oxígeno disuelto en el medio se debe mantener constante, en torno a 2 mg/L y la cantidad de aire suministrado debe ser aproximadamente de 50 mL/min para 100 ml de medio lo que equivale a 0,5 vvm que es el volumen de aire introducido, por unidad de volumen de fermentador por minuto.¹

La incorporación de aire es un proceso esencial, dado el carácter aerobio de las bacterias acéticas. Además de la cantidad de aire suministrado, se debe considerar la pureza y calidad de éste, las bacterias acéticas son sensibles a contaminantes presentes en el aire (LLAGUNO y POLO, 1991).

No obstante, algunos autores mencionan que el proceso de fermentación acética es estrictamente dependiente sobre el oxígeno abastecido a la fase líquida y se requiere de un sistema de distribución gas-líquido para la transferencia de oxígeno, ya que afecta directamente sobre la productividad del proceso de fermentación (FREGAPANE *et al.*, 1999).

2.1.1.4 Concentración del inóculo. Las condiciones del inóculo, es un parámetro importante para una óptima fermentación. El cultivo selectivo de *Acetobacter aceti* debe estar en fase exponencial de crecimiento, con una

¹ De Ory I. Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de los alimentos y Tecnología del Medio Ambiente. Universidad de Cádiz. Comunicación personal

concentración de biomasa total, del orden de 500×10^6 cel./ mL, de acuerdo a DE ORY *et al.* (2002).

Para SOO *et al.* (1989), la producción de ácido acético se lleva a cabo con una concentración de células viables del orden de $1,9$ a $4,7 \times 10^8$ cel/mL aumentando la productividad de ácido acético.

2.1.2 Organismos iniciadores de la producción de vinagre. Los organismos involucrados en la producción de ácido acético, usualmente se desarrollan de un sustrato madre. Están compuestos por bacterias acéticas y por levaduras, las cuales crecen simbióticamente. Las principales especies del género *Acetobacter* productoras de ácido acético son *Acetobacter aceti*, *xylinum* y *ascendens* (LLAGUNO y POLO, 1991).

Según diversos autores las bacterias acéticas se clasifican en dos géneros: *Acetobacter* y *Gluconobacter* (De Ley, 1984 citado por LU, 1999; DEPPENMEIER, 2002 y Du TOIT y LAMBRECHETS, 2002). Esta clasificación se basa en la habilidad de sobre oxidar el acetato y el lactato y la posición de flagelos, puesto que *Acetobacter* prefiere oxidar el etanol más que glucosa y *Gluconobacter* prefiere oxidar glucosa más que al etanol. El tipo de bacteria utilizada en la industria del vinagre mayoritariamente es *Acetobacter*, sin embargo el género *Gluconobacter*, perteneciente al grupo de las bacterias acéticas es usada en aplicaciones industriales como fermentación de ácido glucónico, sorbosa y dihydroxiacetona. Entre las especies de *Acetobacter*, se encuentran *A. aceti*, *pasteurians*, *polyoxogenes* y *europaneus*, que son los tipos más populares usados en las industrias elaboradoras de vinagres.

La descripción del género *Acetobacter* señala a las células que van de la forma elipsoidal a la alargada, rectas o ligeramente curvadas, encontrándose aisladas, en parejas o en cadenas. Son frecuentes las formas de involuación de algunas especies: esféricas, alargadas, hinchadas, curvadas y filamentosas. Móviles o no móviles, si son móviles los flagelos son peritricos o laterales. No

forman endosporas. Gram negativas y en algunos casos gram variables (De LEY *et al.*, 1984).

Son aerobias estrictas, por lo que tienen un metabolismo respiratorio en que el oxígeno es el aceptor final de electrones. Forman colonias pálidas. Catalasa positiva, oxidasa negativa. No licuan la gelatina y no forman indol o H₂S. Oxidan el etanol a ácido acético y el acetato y el lactato a CO₂ y H₂O. El pH óptimo para su crecimiento es de 5,4 a 6,3. *Acetobacter* se encuentra en flores, frutas, vino de uva, sidra, cerveza, vinagre, virutas de madera de generadores de vinagre y acetificadores, entre otros (De LEY *et al.*, 1984).

De LEY *et al.* (1984) y DEPPENMEIER (2002) describen al género *Gluconobacter* con las mismas características del género *Acetobacter*, sólo que *Gluconobacter* es caracterizado por su incompleta oxidación en un amplio rango de carbohidratos y alcoholes. Se diferencia de *Acetobacter* ya que no es capaz de oxidar el acetato y el lactato a CO₂ y H₂O. Existen cuatro especies pertenecientes al género *Gluconobacter*, estas son *G. asaii*, *cerinus*, *frateurii* y *oxidans*, las cuales crecen en medios que presentan altas concentraciones de azúcares y otra característica es que produce una baja cantidad de biomasa. Estos organismos son capaces de crecer a altas concentraciones de azúcar y a pH bajo. Su alta tasa de oxidación correlacionado con su baja producción de biomasa, hace de *Gluconobacter* un organismo de interés por sus aplicaciones industriales, con modernos procesos fermentativos como la producción de L-sorbosa (síntesis de vitamina C) y 6-amino-L-sorbosa (producción de droga antidiabética) los que son llevados a cabo por miembros de este género.

Según autores, LLAGUNO y POLO (1991); LU *et al.* (1999) y TESFAYE *et al.* (2002), la producción de ácido acético resulta de una oxidación del etanol por las bacterias acéticas, esto involucra una reacción en dos pasos; en la primera etapa se oxida etanol a acetaldehído y la segunda el acetaldehído a ácido acético, esta oxidación es catalizada por enzimas que se encuentran en la membrana celular, específicamente en la superficie externa de la membrana citoplasmática, en contacto con el medio de cultivo donde el ácido acético se

acumula rápidamente. Estas son alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa, además existen otros dos importantes componentes que actúan en la oxidación de etanol estos son Citocromo C y terminal oxidasa. GÓMEZ y CANTERO (1998) proponen en la FIGURA 2 un modelo simplificado de la utilización de sustrato (etanol) en la célula para un proceso de fermentación acética en cultivo batch.

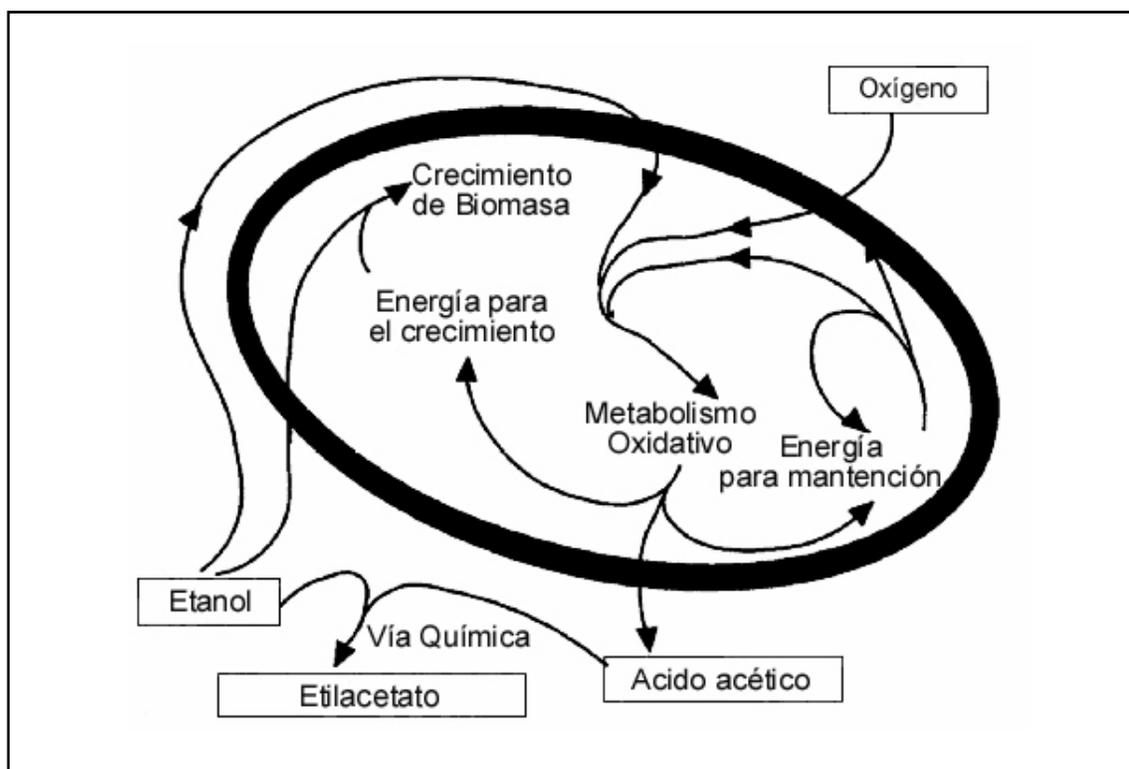


FIGURA 2. Utilización de sustrato por la célula en un proceso de fermentación acética en cultivo batch.

FUENTE: GÓMEZ y CANTERO (1998).

2.1.3 Métodos de producción de vinagre. Existen diversos métodos de producción de vinagre, específicamente dos esquemas básicos en que se realiza la fermentación acética, estos son fermentación en cultivo superficial (lento) y fermentación en cultivo sumergido (rápido).

2.1.3.1 Fermentación en cultivo superficial. La fermentación en cultivo superficial, se caracteriza porque las bacterias acéticas se encuentran en contacto directo con oxígeno gaseoso, o situadas en la interfase líquido gas, como es el caso del método Orleans o bien, fijadas a soportes de materiales tales como virutas de madera. Este sistema constituye el primer paso hacia la industrialización del proceso de fabricación de vinagre y es también precursor de las bacterias inmovilizadas. A pesar del avance tecnológico, éste método presenta desventajas, como la pérdida de sustancias volátiles por evaporación; el material de soporte, como las virutas de madera, se contamina fácilmente y es preciso reemplazarlo cada año; además es un proceso lento, por lo que se ha optado por el proceso de fermentación sumergida (WEISER, 1962 y LLAGUNO y POLO, 1991).

2.1.3.2 Fermentación en cultivo sumergido. La fermentación en cultivo sumergido ha sido descrita por EBNER *et al.* (1993 y 1999) los cuales sugieren una fermentación semicontinua y continua. Este sistema se basa en ciclos, comenzando con concentraciones de ácido acético iniciales en cada ciclo del orden de 7 a 10 % y cerca de 5% de etanol. Cuando la concentración de etanol está entre un rango de 0,05% y 0,3%, se procede a descargar el fermentador y comenzar un nuevo ciclo.

LEVONEN y LLAGUNO (1978); EBNER *et al.* (1993 y 1999); se refieren al método Frings, el cual es usado en todo el mundo para la producción de vinagre. El Acetator Frings consiste en un depósito provisto de agitación donde el mismo dispositivo consigue la aireación y la mezcla de aire con el líquido. Este dispositivo es una turbina y un estátor. La turbina succiona líquido y lo mezcla con el aire y envía esta mezcla homogénea a través del estátor al depósito. El dispositivo logra la aspiración sin usar aire comprimido.

El Acetator Frings es totalmente automatizado y así garantiza una acetificación rápida y uniforme. La introducción de una nueva carga y descarga del vinagre terminado del proceso semicontinuo de acetificación puede

ser realizada automáticamente de acuerdo al contenido de alcohol residual, ya que el Acetator contiene un instrumento automático para medir la cantidad de etanol en el líquido fermentado y el control de la refrigeración y aireación también son automáticos.

2.2 Antecedentes del vinagre de frutas

Como materia prima para la elaboración de vinagre existen diversas frutas que se utilizan en procesos de fermentación, usualmente las manzanas son las más usadas para la elaboración de vinagre, otras frutas o materias primas que producen fermentación alcohólica son las uvas, peras, melón, ciruelas, berries, miel, almíbar y cerveza, entre otras.

En orden de producir un producto de calidad, la materia prima utilizada debiera estar sin contaminación y en su estado máximo de maduración (WEISER, 1962 y WOOD, 1985).

La fruta debe ser molida y prensada, para obtener un jugo rico en carbohidratos (específicamente dextrosa) para ser posteriormente puesto en fermentadores. De esta forma ocurre una fermentación espontánea que toma lugar en corto tiempo, debido a los microorganismos presentes en el producto (WEISER, 1962 y WOOD, 1985).

BORTOLINI *et al.* (2001) consideran al vinagre de frutas superior en calidad sensorial y nutritiva, comparado con los otros tipos de vinagres, presentando características de sabor y aroma propio. En lo que se refiere a su aspecto nutricional, está compuesto por vitaminas, ácidos orgánicos, proteínas y aminoácidos provenientes del fruto y de la fermentación alcohólica.

2.3 Antecedentes del vinagre a partir de alcohol

Según LLAGUNO y POLO (1991) el vinagre de alcohol es el que se obtiene mediante la fermentación de soluciones acuosas de alcohol. Este debe proceder de la fermentación alcohólica de materias agrícolas. Por esto en la mayoría de los países se emplea alcohol, con este tipo de origen, para la

fabricación de vinagre, éste se diluye a concentraciones semejantes a las que se encuentra en el vino, siendo el proceso de fabricación similar al vinagre vínico. No obstante, el alcohol no contiene los nutrientes que contiene el vino, por lo que han de añadirse para que ocurra la multiplicación y el desarrollo de las bacterias acéticas.

Según STEPHANOPOULOS (1993) uno de los factores más importantes en la optimización de un proceso de fermentación es el diseño de un medio adecuado de crecimiento y producción. El medio debe cumplir con las necesidades para la síntesis de materiales de la célula y para los procesos de biosíntesis, así como también con los requerimientos del microorganismo. Los constituyentes que tienen mayor influencia sobre la producción de metabolitos son:

- a) Fuente de carbono. El carbono es el principal constituyente de la célula, constituyendo aproximadamente el 50% en peso seco. Los carbohidratos y los compuestos no carbohidratos (metanol y alcanos) son usados como fuente de energía y carbono y usualmente son los sustratos principales en el medio de cultivo.
- b) Fuente de nitrógeno. El nitrógeno se encuentra en segundo lugar en términos de cantidad e importancia. Constituye aproximadamente el 10 % del peso seco. Está disponible para los microorganismos en forma de sales de amonio, nitratos o urea, aminoácidos, péptidos, purina, pirimidinas y sirve como base para la síntesis de proteínas y otras moléculas macromoleculares.
- c) Micro elementos. Los micro elementos incluyen fósforo (P) el cual es requerido por la célula para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos; el azufre (S) el cual es fundamental por ser un elemento estructural en los aminoácidos cisteína y metionina. La mayoría del azufre celular procede de fuentes inorgánicas, ya sean sulfatos o sulfuros. El potasio (K), es requerido específicamente por una gran cantidad de enzimas, incluyendo varias implicadas en la síntesis de proteínas. El magnesio (Mg) estabiliza los

ribosomas, las membranas celulares, los ácidos nucleicos y se requiere para la actividad de muchas enzimas.

- d) Elementos trazas. Los elementos trazas incluyen al hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), cobre (Cu), cobalto (Co), níquel (Ni), boro (B), cloro (Cl), sodio (Na) y silicio (Si). Estos son requeridos en concentraciones extremadamente bajas, sin embargo, son tan importantes como los micronutrientes para las funciones celulares específicas. Los elementos trazas son metales, muchos de los cuales forman parte de las enzimas que son los catalizadores celulares.

SUÁREZ y LEVONEN (1981), estudiaron la composición adecuada de un medio sintético nutritivo para la obtención de vinagre de alcohol. Los autores consideraron que la producción de vinagre por bacterias acéticas a partir de vino como sustrato no presenta problemas en cuanto a las necesidades nutritivas del microorganismo, en cambio cuando se utiliza cualquier otro sustrato, es necesario conocer la composición de éste y dotar al microorganismo de los nutrientes necesarios para conseguir una buena velocidad de acidificación. El vinagre obtenido a partir de etanol como medio base presenta ventajas, entre las que se destacan la no producción de color ni turbidez.

En términos generales, la solución de etanol utilizada como sustrato debe enriquecerse con fuentes de carbono (glucosa) y nitrógeno (fosfato diamónico), sales minerales (cloro, sodio, magnesio, manganeso y hierro) que aporten los oligoelementos imprescindibles y vitaminas (tiamina) necesarias para que ocurra el proceso de fermentación.

Algunas materias primas no requieren la adición de nutrientes extras, sin embargo, para la producción de vinagre de alcohol, se requiere una mezcla de nutrientes, considerando que las bacterias acéticas necesitan para una óptima fermentación los siguientes nutrientes: glucosa, potasio, sodio, magnesio, calcio, amonio como fosfato de amonio, sulfato y cloro. Además de minerales

trazas como fierro, manganeso, cobalto, cobre, molibdeno, vanadio y zinc (EBNER, 1993).

2.4 Compuestos aromáticos en vinagre

Considerando que los constituyentes volátiles son específicos para algunos vinagres, éstos se pueden determinar por las características de la materia prima utilizada y por la tecnología de procesamiento experimentada durante su producción. Es lógico suponer que los vinagres podrían ser caracterizados y diferenciados por la cantidad y calidad de los análisis de sus componentes volátiles (CASTRO *et al.*, 2002).

En orden de considerar la calidad de los vinagres, han sido usados compuestos volátiles para caracterizar el proceso de acetificación. Los volátiles más característicos son acetaldehído, etil acetato, acetoína, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol (Gerbi 1995 citado por TESHAYE 2002, MORALES *et al.*, 2001 y DE ORY *et al.*, 2004).

Los volátiles de los *blueberries* han sido estudiados por PARLIMENT y KOLOR (1975) y SIMON *et al.* (1996), los cuales establecen la importancia de estos compuestos en características sensoriales, como el aroma. Más de cincuenta compuestos volátiles han sido asociados con *blueberries*, pero sólo unos pocos han sido asociados con el aroma y sabor de los berries frescos, éstos son trans-2-hexenal, trans-2-hexanol, linalool y 1-hexanol, 1-hexenal.

Con el desarrollo de la cromatografía de gases y las técnicas de identificación como espectroscopía infrarroja o de masa, los métodos analíticos han ido mejorando y ahora son más eficientes. En los años 1990 la microextracción en fase sólida (SPME) fue desarrollada como un método rápido y económico que se usa en combinación con la cromatografía de gases y es aplicada a una extensa variedad de componentes, especialmente para la extracción de componentes volátiles (CASTRO *et al.*, 2002 y NATERA MARIN *et al.*, 2002).

2.5 Antecedentes generales del arándano

Arándano es la denominación común para un grupo de especies frutales arbustivas pertenecientes a la familia Ericaceae, género *Vaccinium* y que se desarrollan principalmente en el hemisferio norte, en áreas de clima templado a templado frío en suelos ácidos, con alto contenido de materia orgánica y una gran retención de agua (SUDZUKI, 1993).

El arándano o blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) es un frutal menor nativo de Norteamérica, considerado dentro del grupo de los berries, que fue introducido a Chile a principios de la década de 1980. Los tipos de arándano que existen son tres: arándano “alto”, *Vaccinium corymbosum* L.; el arándano “ojo de conejo” (rabbiteye) *V. ashei* R. y el arándano “bajo” (lowbush), *V. angustifolium* (BUZETA, 1997).

SUDZUKI (1993) señala que la fruta de todas las especies es de color azul, con un tono gris opaco producto de ceras epicuticulares. En general son arbustos bajos (<50 cm de altura).

2.5.1 Distribución de la especie en Chile. Según Campos, 1991 citado por SUDZUKI (1993) la distribución del arándano en Chile se concentraba entre la VI y Xª Regiones, con un total de 160 hectáreas plantadas entre los años 1989-1990. El aumento de la superficie cultivada del arándano no ha sido igual en todas las regiones del país; debido a los requerimientos agro climáticos de éste frutal, su desarrollo se ha localizado en la zona centro sur. El CUADRO 1 elaborado por ODEPA muestra la distribución regional de los cultivos de arándanos, al año 2001.

CUADRO 1. Superficie regional de arándanos 2001.

Región	IV	V	RM	VI	VII	VIII	IX	X	TOTAL
Hectáreas	3	59	115	55	202	429	362	685	1910
Porcentaje	0,16	3,1	6,0	2,9	10,6	22,4	18,9	35,8	100

FUENTE: CHILE. Oficina de Políticas Agrarias. ODEPA (2001).

Como es posible apreciar en el cuadro anterior, el 77,1% de la superficie de arándanos se encuentra entre las regiones VIII y X^a, siendo esta última la de mayor relevancia en cuanto a superficie².

Si se considera una superficie actual de 1.500 hectáreas y un rendimiento promedio de 3 Ton/ha, se puede estimar un volumen aproximado de producción nacional de 4.500 toneladas. El CUADRO 2 muestra el balance de producción estimada para los distintos procesos (fresco, congelado y jugo) y su comparación con la producción del año 1997 y la producción del año 2000³.

CUADRO 2. Comparación de la producción de arándano entre los años 1997 y 2000.

Producción arándanos	1997	2000
Superficie Estimada (ha)	1.172	1.500
Rendimiento (Ton/ha)	1,7	3,2
Producción Anual Estimada (Ton)	1.972	4.761
Exportación Fresco	1.667	4.041
Exportación Congelado	173,0	93
Exportación Jugo 65 °Brix Equivalente Fresco	52	436
Total Exportaciones Fresco Equivalentes (Ton)	1.893	4.570
Pérdidas (4% Sin uso comercial) (Ton)	79	190

FUENTE: CHILE. Servicio Nacional de Aduanas (2000).

2.5.2 Composición química del fruto. En el CUADRO 3 se muestra la composición química del fruto arándano según DINAMARCA *et al.* (1986)

2.6 Beneficios del arándano (*Vaccinium corymbosum*)

El interés por la composición de estas frutas se ha intensificado por un aumento del conocimiento de los posibles beneficios a la salud de algunos de sus micronutrientes. Dentro de los efectos beneficiosos que se describen para

² <http://www.iris.cl/Articulos/Arandano/Default.htm>

³ <http://www.arandanoschile.cl>

los arándanos silvestres y cultivados, incluye la reducción de las enfermedades coronarias, desordenes en el tracto urinario, tratamientos de desordenes circulatorios y su actividad anticancerígena. Muchas de estas propiedades biológicas han sido asociadas con la actividad antioxidante del pigmento antocianina, flavonoides y otros compuestos fenólicos (SKREDE *et al.*, 2000).

De acuerdo con WROLSTAD *et al.* (2002) un mayor beneficio a la dieta es incrementando el consumo de antioxidantes que incluye compuestos como flavones, isoflavones, flavonones, catequinas y pigmentos rojos, azules y púrpuras conocidas como antocianos.

CUADRO 3. Composición química del arándano.

Componente	Cantidad
Agua (%)	83,2
Carbohidratos (%)	15,3
Fibras (%)	1,5
Proteínas (%)	0,7
Grasas (%)	0,5
Pectinas (%)	0,5
Azúcares totales (%)	10-14
Azúcares reductores (%)*	>95
Sacarosa (%)	0,24
Fructosa (%)	4,04
Glucosa (%)	3,92
Contenido de sólidos solubles (%)	10,1-14,2
Acidez titulable (%)	0,3-0,8
Principal ácido orgánico	Cítrico
Pigmentos	
Antocianinas (ug 100 grs.)	
Carotenoides (ug 100 grs.)	0,2-0,3
β Carotenos (ug 100 grs.)	
Vitamina A (U.I)	100
Ácido ascórbico (ug 100 grs.)	14
Fenoles (%)	
Componentes volátiles de significancia organoléptica.	trans-2-hexanol

* Sobre azúcar total.

FUENTE: DINAMARCA *et al.* (1986).

Las antocianinas y polifenoles son metabolitos producidos por las plantas, estos compuestos son importantes en la calidad de los alimentos por su beneficio a la apariencia, sabor y a la salud LEE *et al.* (2002).

PRIOR *et al.* (1998) señala que los arándanos son una de las fuentes con mayor concentración de antioxidantes de las frutas frescas y vegetales.

Las plantas de arándanos producen naturalmente el pigmento antocianina, esta sustancia es responsable del color rojo azulado de muchos alimentos y relativamente los flavonoides los que son considerados como beneficiosos para la salud. Muchas de las propiedades biológicas de los blueberries son atribuidas a los ácidos fenólicos y a los varios tipos de flavonoides que contienen estas frutas (SMITH *et al.*, 2000). La capacidad antioxidante se correlaciona altamente con el contenido total de compuestos fenólicos y las antocianinas, mientras que el contenido de vitamina C tiene una pequeña contribución a la capacidad antioxidante total (KALT *et al.*, 2000).

2.7 Etapas y características del procesamiento de arándanos para la obtención de jugo concentrado y residuo de torta de prensa

Según el estudio realizado por SKREDE *et al.* (2000) los arándanos son procesados a jugo o jugo concentrado para su uso en bebidas, jarabes y productos alimenticios y es sabido el cambio en los pigmentos de antocianinas durante el procesamiento de los arándanos y su importante rol en la calidad del producto final, específicamente en el atributo del color.

2.7.1 Obtención del residuo de torta prensada “Press cake residue”.

Como lo especifican en una investigación reciente LEE y WROLSTAD (2004), el procesamiento del jugo genera inevitables residuos que consisten en semillas, tallos y piel, los que se encuentran en el residuo de torta de prensa. Este residuo presenta altas cantidades de antocianinas y polifenoles (LEE *et al.* 2002) por lo que se considera como una fuente de colorante natural y de nutraceuticos.

Según SKREDE *et al.* (2000) el rendimiento del jugo es de 83% con un residuo de torta prensada cercano al 10% de la materia prima inicial; el 7% restante se debe a pérdida natural la cual se deja en el proceso de corte, maceración enzimática y prensado. La FIGURA 3 presenta el proceso de

obtención del residuo de torta prensada, a partir del procesamiento de arándanos.

Así el contenido inicial de antocianinas del jugo prensado es de 33,6 mg/ 100 g, mientras que en residuo de torta prensada es de 18,2 mg/ 100 g; con esto el residuo de torta prensada es una potencial fuente de pigmentos, considerando que del total de pigmento, ésta representa el 18% de las antocianinas de la materia prima inicial.

2.7.2 Extracción del pigmento. Como es sabido los berries son ricos en compuestos bioactivos, por lo que es necesario extraer las antocianinas y otros polifenoles.

Como lo confirman varios autores (METIVIER *et al.*, 1980 y CACAE y MAZZA, 2003) la extracción de fitoquímicos desde plantas usando solventes constituye una importante técnica de extracción, para la utilización de pigmentos como colorantes naturales. De este modo, estos autores describieron la extracción de antocianinas usando como solvente etanol. El tiempo seleccionado, para asegurar una completa extracción, fue de 15 a 40 horas, de esta forma se obtuvo un amplio tiempo de extracción, considerando que se desarrolló un proceso sin agitación. Este proceso se ve afectado por la temperatura, obteniendo valores máximos entre 30 y 35 °C.

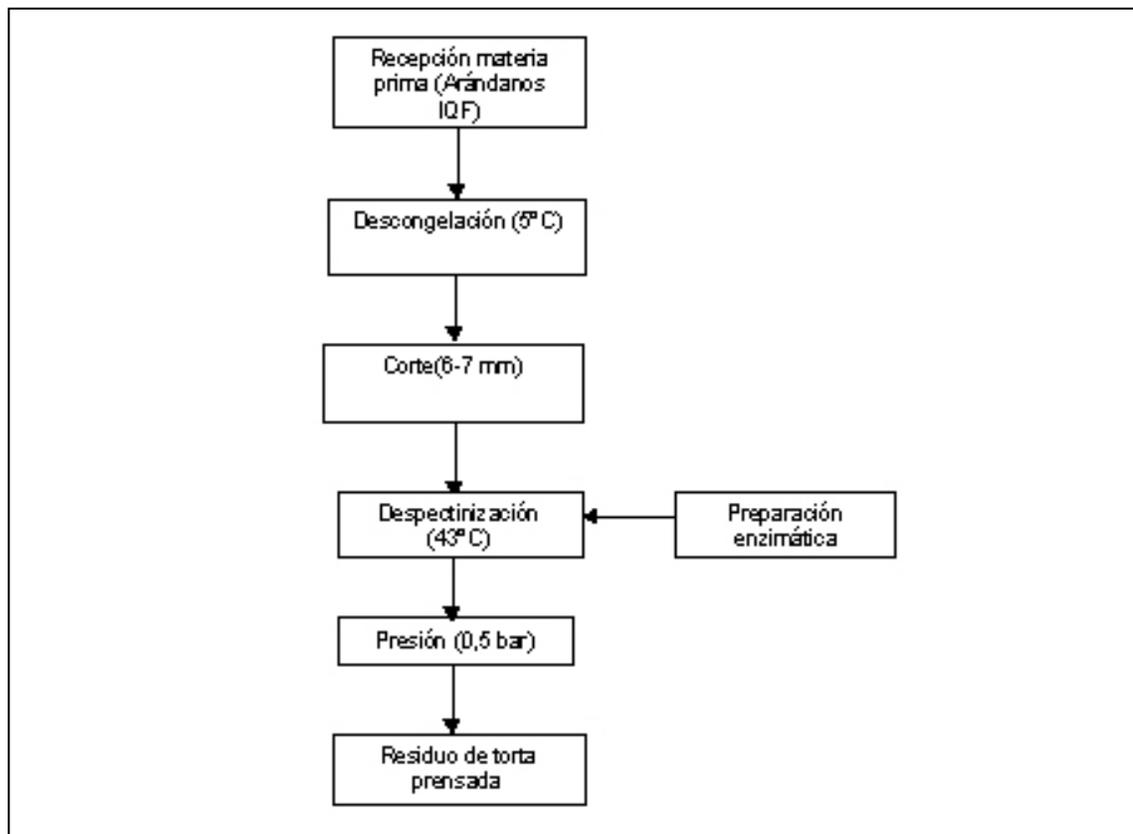


FIGURA 3. Obtención del residuo de torta de prensa a partir del procesamiento de arándanos (*Vaccinium corymbosum*).

FUENTE: SKREDE *et al.* (2000).

3. MATERIAL Y METODO

3.1 Lugar de ensayo

El proceso y los análisis se realizaron en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y en el Centro experimental Santa Rosa, ambos pertenecientes a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Austral de Chile.

3.2 Disponibilidad de equipos y materiales

Tanto los equipos como los materiales fueron proporcionados por el lugar de ensayo antes mencionado.

3.3 Materiales

La descripción de los materiales se detalla a continuación.

3.3.1 Materia prima. Se utilizó residuo de torta prensada de arándano, siendo proporcionada por la empresa Bayas del sur S.A., X^a Región, de su proceso de elaboración de jugo concentrado.

3.3.2 Solución hidroalcohólica. Se utilizaron tres concentraciones de la mezcla de alcohol de vino rectificado y agua, a 8%, 10% y 12 %v/v, simulando las condiciones del sustrato alcohólico, como el vino.

3.3.3 Nutrientes. Los nutrientes necesarios para desarrollar el proceso de fermentación acética sobre el extracto, se muestran en el CUADRO 4:

CUADRO 4. Nutrientes necesarios para la fermentación acética.

Nombre Común	Fórmula Química	Cantidad (g/L)
Glucosa	$C_6H_{12}O_6$	2,00
Cloruro de Sodio	NaCl	2,00
Fosfato de Potasio	KH_2PO_4	1,00
Fosfato Diamónico	$(NH_4)_2HPO_4$	0,60
Extracto de levadura		0,43
Citrato de Sodio	Na- citrato	0,24
Sulfato de Magnesio	$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,20
Sulfato de Manganeso	$MnSO_4 \times 4H_2O$	0,01
Vitamina del Complejo B		trazas

FUENTE: SUAREZ y LEVONEN (1981).

3.4 Métodos

3.4.1 Identificación y aislamiento del microorganismo iniciador de la fermentación acética. Las bacterias acéticas fueron aisladas desde inóculos madres de vinagres de vino de la X^a Región del país, durante el período de Octubre de 2003 a Marzo del 2004.

El proceso de aislamiento siguió el procedimiento propuesto por De LEY *et al.* (1984), LLAGUNO y POLO (1991), SOKOLLEK *et al.* (1998) y DUTOIT y LAMBRECHETS (2002), el cual consistió en tomar 100 μ L de vinagre madre y sembrarlo sobre un medio selectivo de crecimiento y aislamiento (GYC) sólido y líquido.

Se realizaron una serie de diluciones, cada una de las cuales fue sembrada en duplicado e incubadas a 30 °C por 3 a 5 días.

A las colonias preliminarmente identificadas como bacterias acéticas se realizaron test bioquímicos de catalasa, oxidasa, indol y gram. Las colonias representativas se traspararon sobre medio GYC (sólido y líquido), se incubaron para posteriormente repetir los tests bioquímicos nombrados anteriormente y desarrollar test fisiológicos de crecimiento sobre etanol (medio

Frateur), formación de compuestos cetónicos desde glicerina, formación de ácidos 2 y 5 cetoglucónico y dicetoglucónico a partir de glucosa, y capacidad de oxidar el acetato y el lactato a CO₂ y H₂O (De LEY *et al.*, 1984).

A continuación se presenta una descripción y composición de cada uno de los medios utilizados para la identificación de las bacterias acéticas.

- ◆ Medio estándar GYC. Medio selectivo para el aislamiento y conservación de las bacterias acéticas. CUADRO 5

CUADRO 5. Medio estándar de crecimiento de bacterias acéticas.

Ingrediente	Cantidad (g/L)
Glucosa Lab. Merck	100
Extracto de levadura Lab. Difco	10
Carbonato de Calcio Lab. W & S	20
Agar Lab. Merck	15

Esterilizar, sembrar e incubar a 30 °C/ 3 a 5 días.

- ◆ Medio Carr citado por De LEY *et al.* (1984). Formación de compuestos cetónicos a partir de glicerina. CUADRO 6.

CUADRO 6. Medio de formación de compuestos cetónicos a partir de glicerina.

Ingrediente	Cantidad (%)
Extracto de levadura Lab. Difco	3
Glicerina Lab. W & S	3 % v/v
Agar Lab. Merck	2

Esterilizar, sembrar e incubar a 28 °C/ 2 días.

- ◆ Formación de ácidos 2 y 5 cetoglucónico y dicetoglucónico a partir de glucosa, sobre medio Frateur citado por De LEY *et al.* (1984) CUADRO 7.

CUADRO 7. Medio para la formación de ácidos 2 y 5 cetoglucónicos y dicetoglucónico a partir de glucosa.

Ingrediente	Cantidad (%)
Glucosa Lab. Merck	10
Carbonato cálcico Lab. W & S	3
Extracto de levadura Lab. Difco	0,1

Esterilizar, sembrar e incubar 30 °C/ 10 a 15 días.

- ◆ Crecimiento en etanol sobre medio Frateur (De LEY *et al.*, 1984) propone un método para verificar el crecimiento sobre etanol en el medio propuesto en el CUADRO 8.

CUADRO 8. Medio Frateur para el crecimiento sobre etanol.

Ingrediente	Cantidad (g/L)
Carbonato cálcico Lab. W & S	20
Etanol Lab. Merck	20
Agar Lab. Merck	20
Extracto de levadura Lab. Difco	10

Esterilizar, sembrar e incubar a 30 °C/ 3-5 días.

- ◆ Identificación a nivel de género. La sobre oxidación del etanol es suficiente para diferenciar entre *Acetobacter* y *Gluconobacter*. *Acetobacter* oxida el etanol a ácido acético, que a su vez vuelve a ser oxidado a CO₂ y H₂O, mientras que *Gluconobacter* no lleva a cabo esta doble oxidación. El medio utilizado para verificar esta prueba es el medio de Carr citado por De LEY *et al.* (1984) CUADRO 9.

El medio se distribuyó en tubos de ensayo con 6,5 ml de medio; se esterilizó y se añadió etanol al 15% en agua estéril. Para posteriormente incubar a 28 °C por 10 a 15 días.

CUADRO 9. Medio para la identificación a nivel de género.

Ingrediente	Cantidad (%)
Extracto de levadura Lab. Difco	3
Agar	2
Verde de bromo cresol 2%	0,1

3.4.2 Preparación del inóculo madre. La fase de crecimiento del microorganismo, fue llevada a cabo en un matraz Erlenmeyer de 1 L, con 200 mL de medio estándar GYC. La condición de aerobiosis fue mantenida por la agitación del matraz en un Lab-Line Environ Shaker a 150 rpm, manteniendo la temperatura en 30 °C.

Se extrajo el 50% del medio inicial y se incubó sobre medio GYC, a partir de este proceso se registró la cinética de crecimiento del microorganismo *Gluconobacter spp.* efectuando un recuento viable en placa sobre medio GYC. Se incubó a 30 °C por 3 a 5 días y se contaron las colonias representativas de la cepa aislada. Las mediciones se realizaron por 12 días.

Siguiendo la etapa de crecimiento de la cepa, se extrajo el 50% del medio puro de bacterias acéticas y se incubó en el sustrato alcohólico que para este caso fue el extracto obtenido del proceso de lavado de la torta prensada de arándanos, con una graduación alcohólica de 10 °GL. Posteriormente se registró la nueva cinética de crecimiento sobre el sustrato a utilizar y se realizó recuento viable en placa sobre medio estándar GYC.

3.4.2.1 Cálculo de la velocidad específica de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$). El crecimiento de la población bacteriana se modeló con una reacción de primer orden: $dX/dt = \mu X$, donde X representa la concentración celular y μ es la velocidad específica de crecimiento en (t^{-1}), resolviendo $X = X_0 e^{\mu t}$.

3.4.3 Descripción del diagrama de elaboración de vinagre. Se proporciona un protocolo de fabricación de vinagre de arándanos usando residuo de este frutal menor.

3.4.3.1 Recepción de materia prima. La materia prima (torta prensada de arándanos) se recibe congelada en bloques de 1 Kg (-18 °C) y se descongela a temperatura ambiente.

3.4.3.2 Extracción con mezcla hidroalcohólica. 1Kg de muestra de torta prensada (68% humedad) fue necesario para extraer los pigmentos (antocianos) desde el residuo usando una solución de alcohol en agua. El alcohol utilizado, es alcohol de vino rectificado 96 %v/v el cual se diluye a una concentración de 30% v/v, la que se vuelve a diluir a concentraciones similares al vino, para empezar el proceso de fermentación acética.

Las condiciones de la extracción fueron las siguientes: 1 Kg de residuo fue dispersado en 4 litros de solvente, usando una columna de 5L de capacidad. La temperatura se mantuvo constante a 40 °C. El tiempo de extracción fue de 24 horas, considerando un tiempo de equilibrio para la extracción de los pigmentos, para esto se usó un proceso sin agitación, el cual fue reportado anteriormente por METIEVER *et al.* (1975).

3.4.3.3 Fermentación acética en cultivo sumergido. La fermentación acética en cultivo sumergido es llevada a cabo bajo la modalidad de cultivos batch repetidos, por consiguiente una operación cíclica. Se utilizó una proporción de carga vino/ vinagre de 1:1.

Las experiencias se realizaron simulando las condiciones de un fermentador de 1 L de capacidad, bajo condiciones controladas de laboratorio, de aireación, temperatura, agitación, pH, acidez acética y concentración de etanol. Junto con esterilizar el medio, se esterilizaron todos los accesorios que

mantuvieran contacto directo con el medio a fermentar, como matraces, filtros de aire, mangueras, entre otros.

El controlador de volumen de aire se ajustó a 0,5 y 0,8 vvm, la temperatura se mantuvo constante a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, usando un termostato regulador de la temperatura marca ECS 57; el factor agitación se accionó a 150 rpm usando un agitador Corning Hot Plate PC- 351; el pH se midió diariamente usando un pH metro Corning pH meter 430.

Finalmente se tomaron muestras diarias para verificar la acidez acética y la concentración de etanol.

La FIGURA 4 muestra el sistema de fermentación utilizado para la elaboración de vinagre.

3.4.3.4 Clarificación del vinagre. El vinagre obtenido de la descarga del fermentador, al final de cada ciclo de producción, fue clarificado, por presentar un grado de turbidez, con enzima pectolítica, agregando 0,4 g/L, el cual forma un gel en solución acuosa atrapando a las partículas, favoreciendo la decantación rápida sin alterar la composición del vinagre.

3.4.3.5 Filtración del vinagre. La operación de filtración se realizó con vacío teniendo como finalidad la separación definitiva de las impurezas del vinagre mediante el empleo de un material filtrante. La materia filtrante que se utilizó fue tierra de diatomeas 0,5 g/ L, usando papel filtro Wathman N° 42. Se requiere que la calidad de estas tierras no provoque alteraciones sobre las características organolépticas del vinagre, de esta forma se obtuvo un líquido sin impurezas con adecuado grado de brillantez.

3.4.3.6 Pasteurización del vinagre. Este proceso se realizó para estabilizar el vinagre obtenido. A través de este tratamiento térmico se destruyen las bacterias y se inactivan las enzimas responsables de posteriores alteraciones del vinagre. La temperatura de pasteurización correspondió a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se aplicó

por 5 minutos. Con este último proceso el vinagre está en su etapa final y en condiciones de ser almacenado a temperatura ambiente.

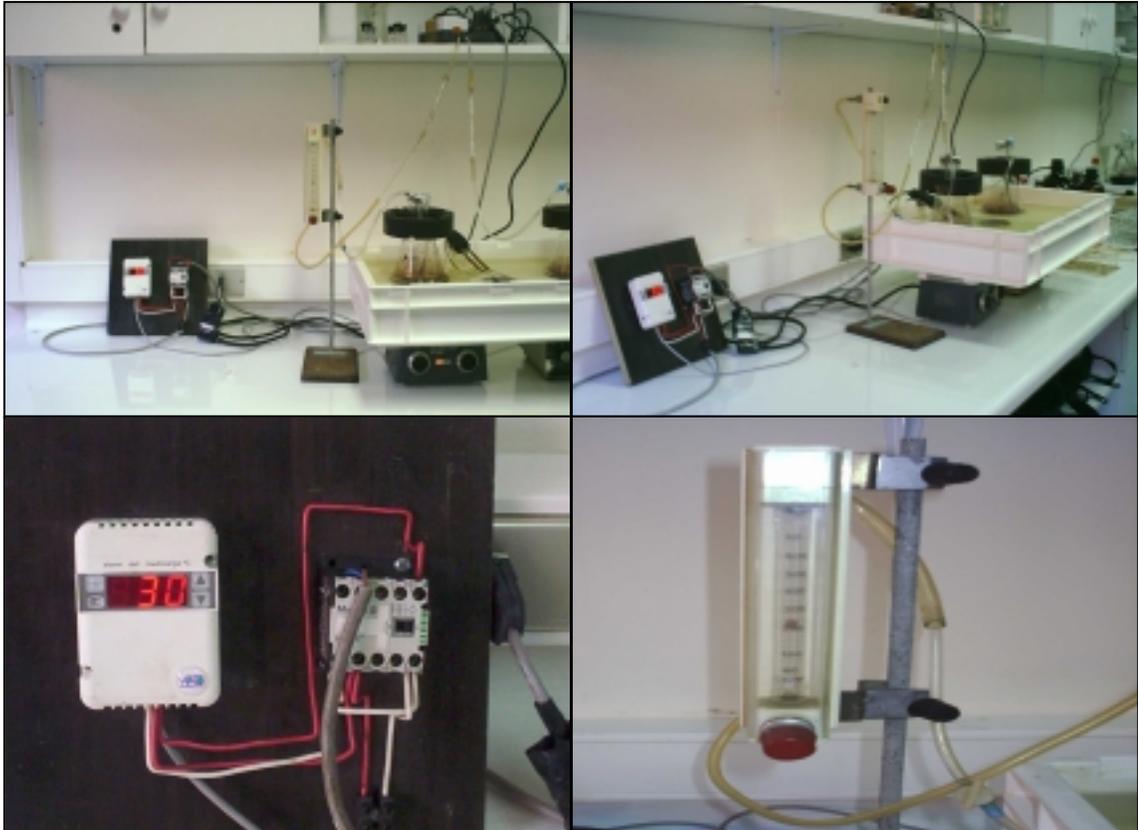


FIGURA 4. Sistema de fermentación utilizado.

La FIGURA 5 muestra el diagrama de flujo de obtención de vinagre de residuo de arándanos.

3.4.4 Diseño experimental. Se estudiaron dos variables que intervienen en el proceso de fermentación acética, estos son la concentración inicial de etanol a tres niveles (8, 10 y 12% v/v) y la cantidad de aire suministrada al proceso a dos niveles (0,5 y 0,8 vvm), que equivale a 50 mL de aire/ min y 80 mL de aire/ min, respectivamente. Así el diseño experimental es un diseño factorial en duplicado, que resulta un total de 12 tratamientos. En el CUADRO 10 se observan los tratamientos con su respectiva codificación.

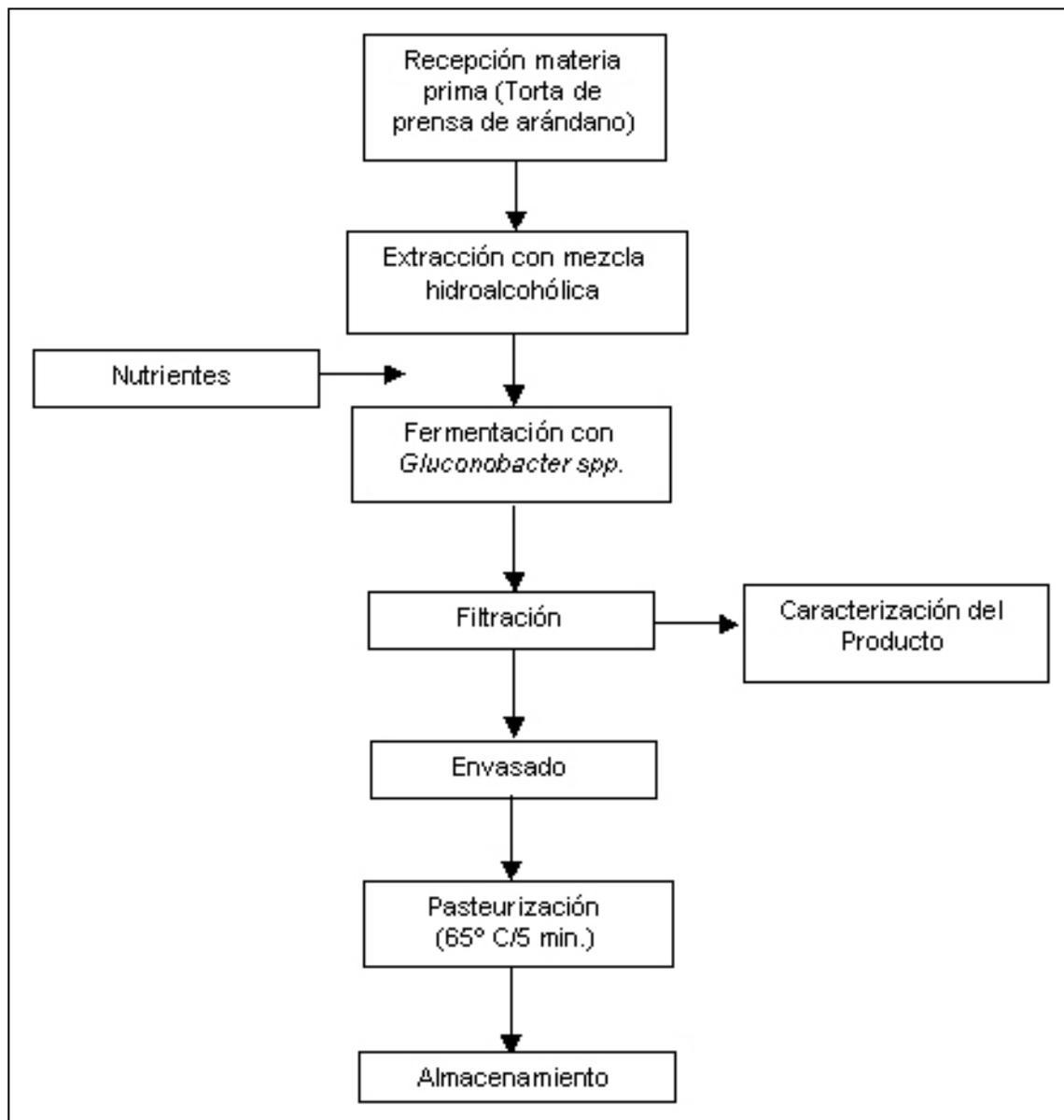


FIGURA 5. Línea de flujo para la elaboración de vinagre de arándanos.

FUENTE: Elaboración propia.

CUADRO 10. Diseño experimental.

Etanol (% V/V)	Aireación (vvm)	Codificación
12	0,5	T1
12	0,5	T1
10	0,5	T2
10	0,5	T2
8	0,5	T3
8	0,5	T3
12	0,8	T4
12	0,8	T4
10	0,8	T5
10	0,8	T5
8	0,8	T6
8	0,8	T6

FUENTE: Elaboración propia.

3.4.5 Mediciones a realizar. Se tomó las muestras del extracto al término del proceso de lavado de la torta de arándano, para verificar la graduación alcohólica del extracto y durante todo el proceso de fermentación acética, para el cual se pretende alcanzar un nivel de acidez mínimo de 4% p/v (g de ácido acético/100 mL de solución).

3.4.5.1 Determinación del grado alcohólico. Se midió la concentración de alcohol mediante destilación simple y con un densímetro para alcohol al final del proceso de lavado de la torta, con el fin de verificar la graduación alcohólica del extracto DEL VALLE y VALDEVENITO (1996).

3.4.5.2 Determinación de acidez total. Según MÉTODO AOAC 930.35 se determinó la acidez total en vinagre expresada en acidez acética.

3.4.5.3 Determinación de pH. Se establece el método potenciómetro para determinar el pH en vinagre.

3.4.5.4 Determinación de concentración de etanol en vinagre. Se determinó la concentración de etanol en el líquido fermentado usando cromatografía de gases (CATALDI, 1996). El análisis para determinar la concentración de etanol se realizó usando un equipo cromatográfico de gases Perkin- Elmer con un detector de ionización de llama (FID).

Se utilizó como estándar interno, una solución de alcohol etílico de grado analítico en agua para la curva de calibración de etanol. Un μL de muestra fue inyectado de forma manual. Las condiciones del análisis se observan en el CUADRO 11.

CUADRO 11. Condiciones del cromatógrafo.

Característica	Variable
Columna	Empacada
Fase estacionaria	SP - 1200
Largo	3 pies
Diámetro	4 mm
Temperatura inicial	60 °C /2 min
Tasa de incremento de la temperatura	6 °C/ min
Temperatura final	200 °C
Temperatura inyector	250 °C
Flujo de gas	N ₂ a 20 mL/min

3.4.5.5 Determinación de rendimiento. Los sistemas de fermentación originaron un cálculo del rendimiento real de este proceso, comparando la concentración total del vinagre descargado con la concentración total de la materia prima. En ambos casos, la concentración total es la suma de la acidez total (expresada en g de ácido acético/100 mL) y de la acidez que se espera obtener por transformación de alcohol presente. Introduciendo un factor de corrección para compensar las distintas formas de expresar las concentraciones de ambos productos, este se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$Rendimiento = \frac{C_{Tvinagre}}{C_{Tvino}} \times 100 \quad (\text{Ec. 1}) \quad (\text{LLAGUNO y POLO, 1991})$$

Donde:

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

3.4.5.6 Determinación de velocidad de acetificación. El cálculo de la velocidad de acetificación se obtuvo con las mediciones diarias de la concentración de ácido acético, mediante la siguiente fórmula:

$$p = \frac{C_{A2} - C_{A1}}{t_2 - t_1} \quad (\text{Ec. 2}) \quad (\text{LLAGUNO y POLO, 1991})$$

Donde:

$$p = \text{velocidad de acetificación}$$

3.4.5.7 Determinación del contenido total del pigmento antocianina. La totalidad de las antocianinas monoméricas fue determinado por el método diferencial de pH (GIUSTI y WROLSTAD, 2002). La absorbancia se determinó a 520 nm y a 700 nm en un espectrofotómetro Genesys 5 Spectronic Instruments. El contenido de pigmento fue calculado como cianidin-3-glucoside usando un coeficiente de extinción molar de $26.900 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ y el peso molecular de 445 gmol^{-1} , utilizando la siguiente fórmula:

$$mg/L = \frac{A \times PM \times FD \times 1000}{e} \quad (\text{Ec. 3}) \quad (\text{GIUSTI y WROLSTAD, 2002})$$

Donde:

$$A = \text{Absorbancia} = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

PM = Peso molecular

FD = Factor de corrección

e = Coeficiente de extinción molar

3.4.5.8 Evaluación organoléptica del vinagre elaborado. Un panel de 8 jueces fue constituido para la realización de la evaluación sensorial de las 6 muestras de vinagre de arándanos. Los atributos evaluados de aceptabilidad fueron:

- Intensidad de aroma y su nivel de agrado. Utilizando una escala de 5 puntos.
- Color. Usando una escala de 5 puntos.
- Sabor ácido. Utilizando una escala no estructurada de 15 cm con los valores extremos de “Falta de acidez” y “Exceso de acidez”. Esta escala fue llevada a una escala de 5 puntos para homogeneizar la evaluación de datos. En este mismo punto se pidió al juez el registro del grado de acidez que estime ideal.
- Nivel de agrado del sabor ácido. Utilizando una escala no estructurada de 15 cm con los valores extremos de “Muy desagradable” y “muy agradable”, la cual fue ajustada a 5 puntos.
- Impresión general, con una escala de 5 puntos.

Las muestras fueron presentadas al azar en copas y en condiciones reales de consumo, utilizando lechuga (*Lactuca serriola*). La evaluación se realizó en triplicado, mientras que la planilla de la evaluación descriptiva global se encuentra en el ANEXO 1.

La planificación de la evaluación sensorial coincide con lo realizado por diferentes autores. Entre ellos GERBI *et al.* (1998) y TESFAYE *et al.* (2004), que evaluaron muestras de vinagres en escalas no estructuradas, anclada a los costados y entre los atributos evaluados por los panelistas se encontraron: intensidad del aroma, sensación ácida, riqueza del aroma y aroma a madera.

3.4.6 Análisis de datos. Se realizaron los siguientes análisis de datos.

- ◆ Análisis de varianza para los factores que afectan sobre las características finales del producto.

- ◆ Análisis de comparación múltiple para promedios (TUKEY, HSD con un 95% de confianza).
- ◆ Métodos gráficos de representación de resultados.
- ◆ Regresión lineal múltiple.

Los análisis estadísticos anteriormente mencionados se realizaron con el software *Statgraphics plus 5.1®*.

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1 Microorganismo iniciador de la fermentación.

4.1.1 Identificación y aislamiento del microorganismo iniciador del proceso de fermentación acética.

Las bacterias acéticas fueron obtenidas desde vinagres de vino obtenidos en la X^a Región de Chile.

El procedimiento consistió en seleccionar muestras de estos vinagres y sembrarlas sobre medio GYC.

A las colonias identificadas se les realizó test bioquímicos de gram (-), catalasa (+), oxidasa (-) e indol (-).

En la FIGURA 6, se muestra las acetobacterias encontradas en las muestras de vinagres madres de la zona.

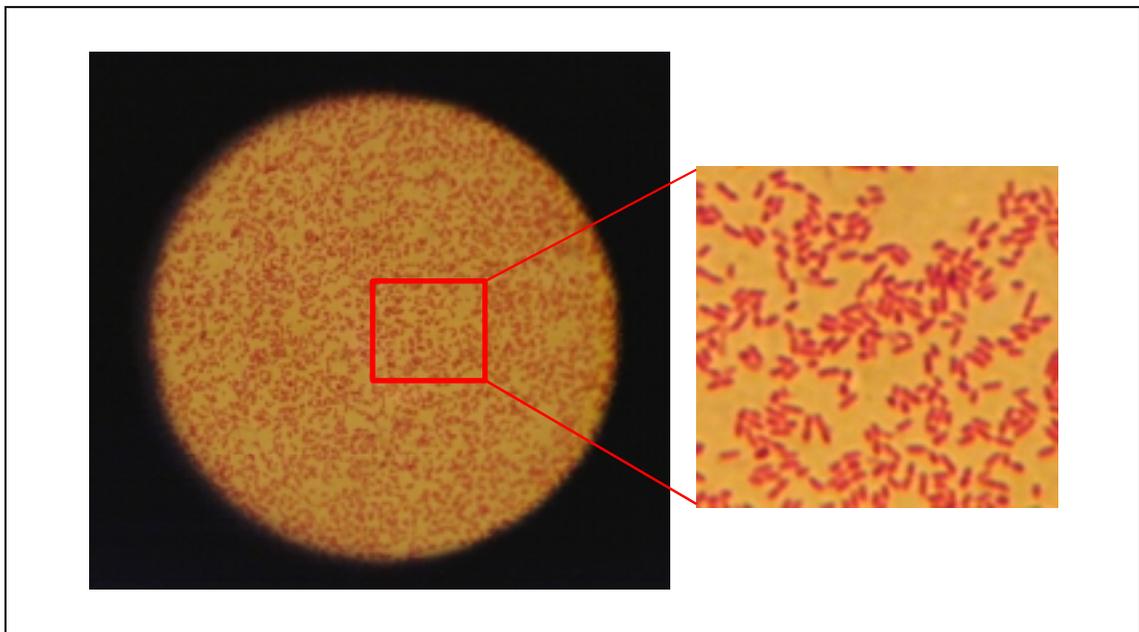


FIGURA 6. Acetobacterias encontradas en vinagres madres de la X^a Región del país.

4.1.2 Identificación a nivel de género. Las bacterias del género *Acetobacter* son capaces de sobre oxidar el etanol a ácido acético, el que a su vez vuelve a ser oxidado a CO_2 y H_2O , mientras que *Gluconobacter* no realiza esta doble oxidación.

La prueba de identificación a nivel de género usando medio Carr, 1968 citado por De LEY *et al.* (1984) determinó que el microorganismo aislado pertenece al género *Gluconobacter spp.*

La reacción positiva tuvo lugar cuando el indicador (verde de bromo cresol) cambio dos veces de color, un primer viraje a amarillo y se produce cuando el medio es ácido; el segundo viraje tiene lugar cuando desaparece la acidez del medio.

La FIGURA 7 muestra el resultado de la prueba de identificación a nivel de género.

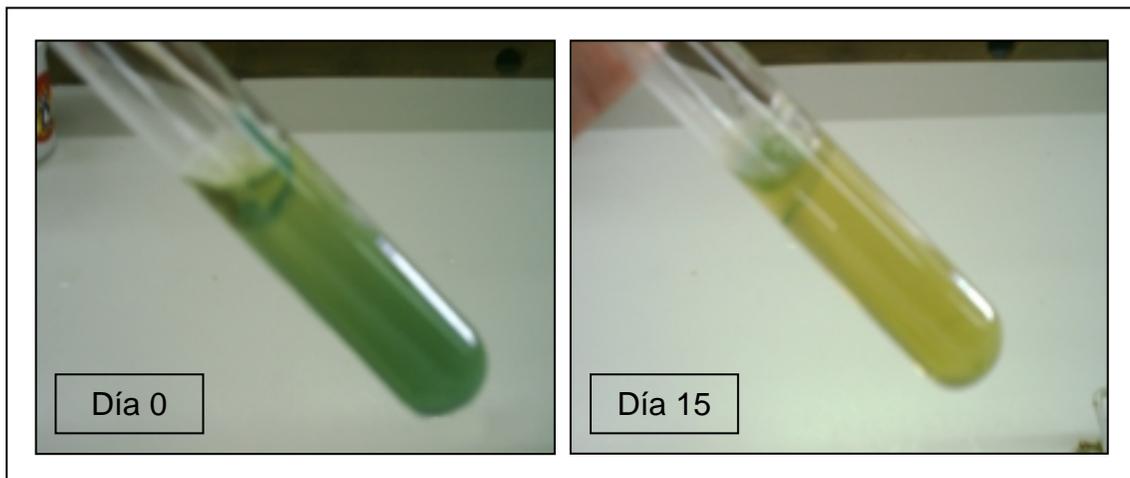


FIGURA 7. Resultados prueba de identificación a nivel de género.

4.1.3 Formación de compuestos cétonicos a partir de glicerina. La reacción fue positiva ya que al agregar unas gotas de los reactivos Fehling A y B, apareció un halo rojo alrededor de la colonia y ésta adquirió también dicho color. La formación de estos compuestos se observó en el aislado por la tinción de ésta.

4.1.4 Formación de ácidos 2-5 cetoglucónico y dicetoglucónico a partir de glucosa. Frateur, 1954 citado por De LEY *et al.* (1984) propone esta prueba para estudiar la producción de compuestos cetónicos a partir de glucosa, la prueba resultó positiva ya que se visualizó un velo característico de 2 cetogluconato. En medios que contienen glucosa, las bacterias acéticas crecen en la superficie en forma de película o film acompañado, eventualmente por presencia de turbidez en un medio líquido.

4.1.5 Crecimiento en etanol. Frateur, 1950 citado por De LEY *et al.* (1984) en su método para verificar el crecimiento sobre etanol de las bacterias acéticas, afirma que el ácido acético formado disuelve el carbonato y se forma una zona clara, de hasta 12 mm desde el borde de la colonia hacia afuera. Este proceso tiene por nombre “irisación”. En la FIGURA 8 se observa la reacción de las bacterias acéticas aisladas.

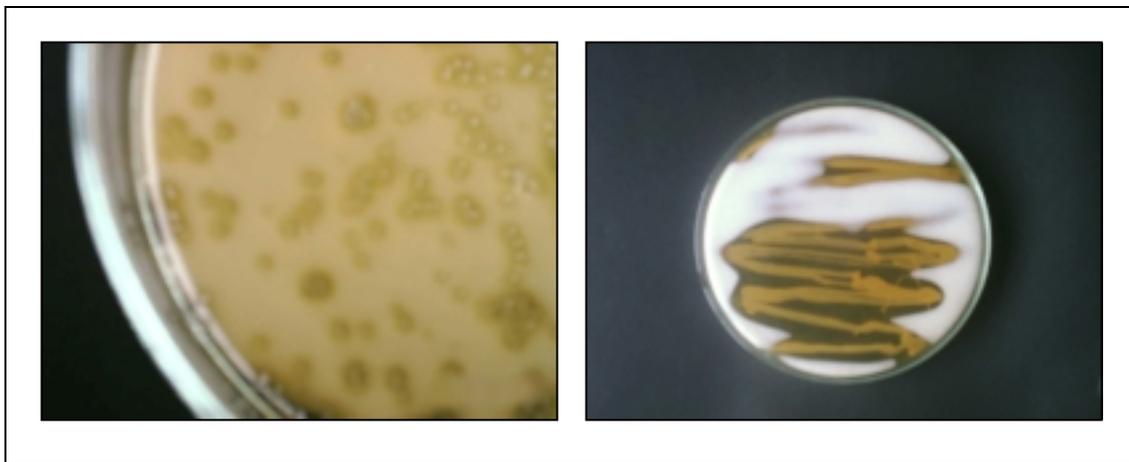


FIGURA 8. Irisación de bacterias acéticas.

4.2 Cinética de crecimiento para *Gluconobacter spp.* La herramienta básica para simular la evolución de un bioproceso, como el proceso industrial de fermentación acética, es un modelo cinético. El modelo debe tener una alta habilidad de pronosticar y dar resultados capaces de explicar el real comportamiento de los microorganismos (PIZARRO *et al.* 2003). En la FIGURA

9 se presentan las curvas de crecimiento de la cepa aislada de *Gluconobacter spp* obtenida mediante recuento viable en placa sobre medio estándar.

El análisis se realizó en duplicado. En el ANEXO 2 se observan los datos del recuento viable en placa en UFC/ mL.

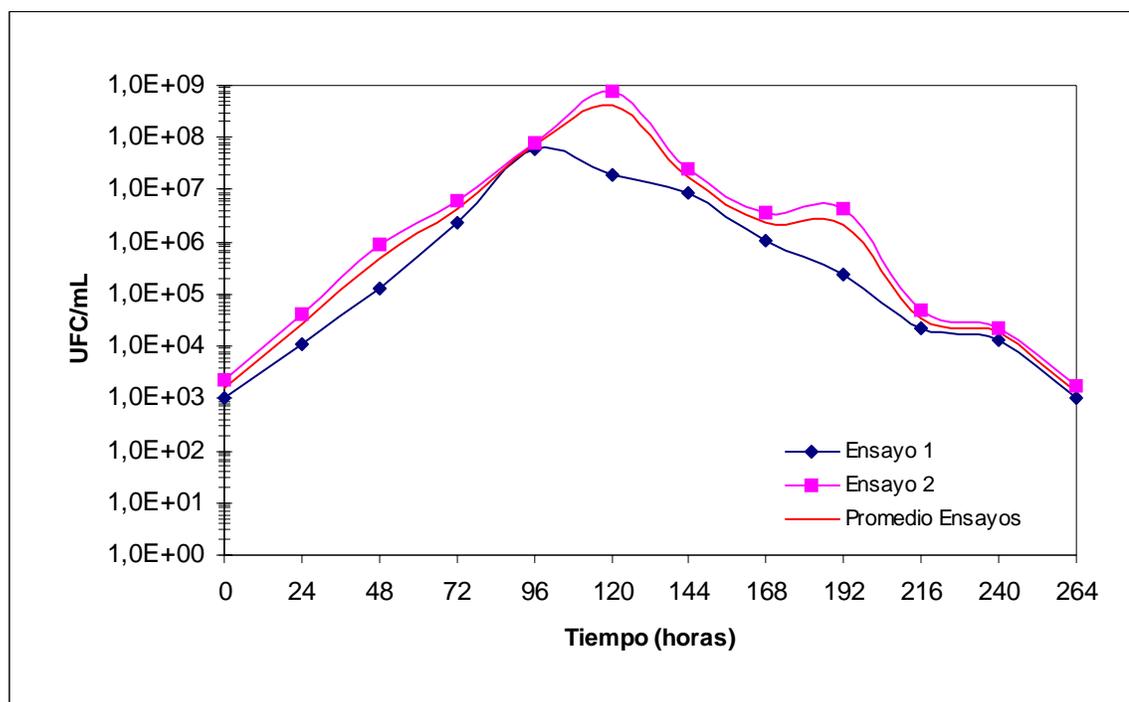


FIGURA 9. Cinética de crecimiento para *Gluconobacter spp*.

Como se observa en la FIGURA 9, los recuentos de la cepa aislada de *Gluconobacter spp*. presentaron una fase exponencial hasta el día 4, alcanzando un máximo del orden de 4×10^8 UFC/mL, luego se visualiza una fuerte caída de las curvas, en ambos ensayos.

Este comportamiento ha sido descrito por Peleg, 1996 citado por PELEG (1997), el cual describe que la tasa de crecimiento declina abruptamente y no con moderación, esto es causado por la disminución de nutrientes u otro recurso esencial, pero además por la acumulación, dentro y fuera de la célula, de metabolitos tóxicos que provocan inhibición. Una situación de esta clase puede ser considerada como una competencia entre crecimiento y letalidad.

Los parámetros continuos de diferentes patrones de comportamiento, fueron expresados cuantitativamente y comparados. Esto permite medir el efecto de las condiciones externas como temperatura, pH y aireación y/o otros factores como agitación sobre el crecimiento/ muerte Peleg, 1996 citado por PELEG (1997).

El cálculo de la velocidad específica de crecimiento y muerte, se observa en la FIGURA 10, resultando del orden de $0,1089 \text{ h}^{-1}$ para el crecimiento y de $-0,083 \text{ h}^{-1}$ para la velocidad específica de muerte.

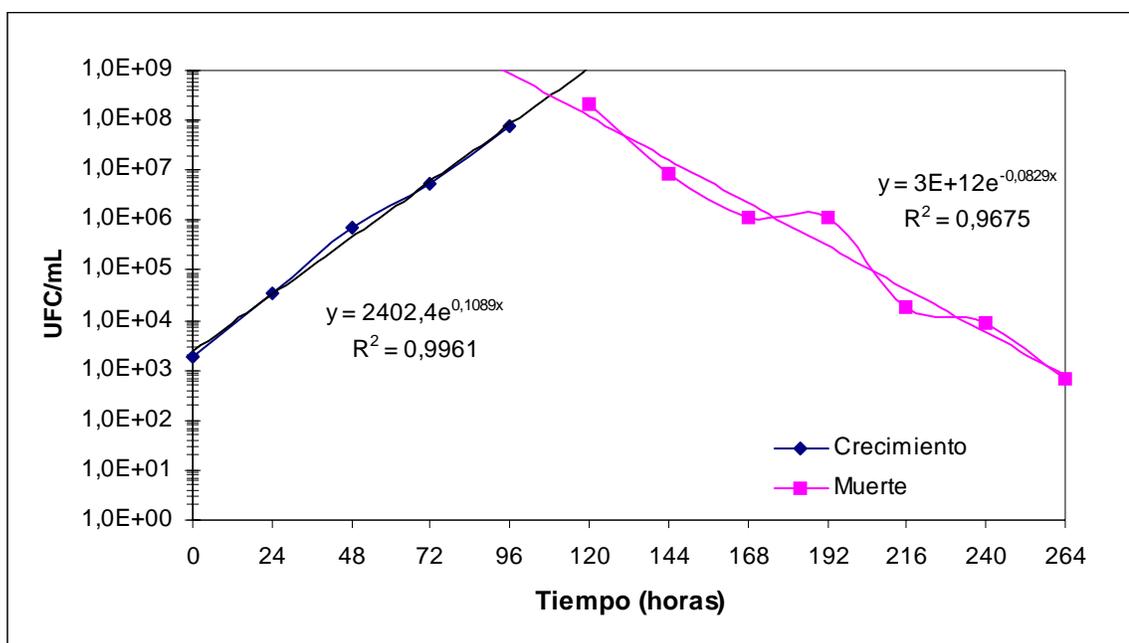


FIGURA 10. Cálculo de las velocidades específicas de crecimiento para *Gluconobacter spp.*

La FIGURA 11 presenta las curvas de crecimiento del inóculo madre de vinagre de arándanos, se observa una fase exponencial del día 0 al día 4 con un máximo de $1,2 \times 10^8$ UFC/mL, en la misma figura se distingue una caída de la curva por la fuerte inhibición que provoca el ácido acético, LA FIGURA 12 indica que del día 0 al día 4 hay un aumento exponencial de las bacterias acéticas, luego, a partir del día 4 hay un rápido aumento de la acidez acética y una baja en la producción de biomasa por inhibición (ANEXO 3).

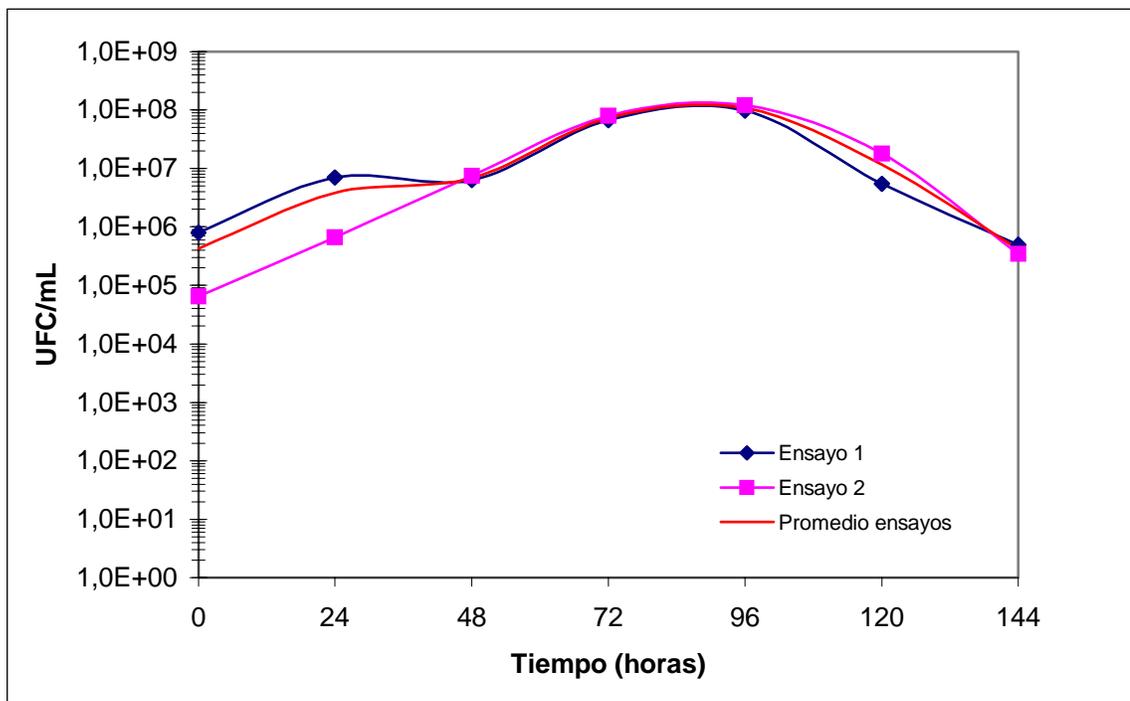


FIGURA 11. Cinética de crecimiento del inóculo madre de vinagre de arándanos.

El cálculo de la velocidad específica de crecimiento y muerte del inóculo madre de vinagre de arándanos, se observa en la FIGURA 13, resultando del orden de $0,0702 \text{ h}^{-1}$ para el crecimiento y de $-0,1158 \text{ h}^{-1}$ para la velocidad específica de muerte.

MACIAS *et al.* (1997) obtuvieron valores de parámetros cinéticos para la tasa de crecimiento de $0,24 \text{ h}^{-1}$ mientras que en esta investigación fueron del orden de $0,1089 \text{ h}^{-1}$ para el microorganismo sobre el medio sintético nutritivo de crecimiento y $0,0702 \text{ h}^{-1}$ para el inóculo madre. Los valores obtenidos son menores a los de este autor, pero similares a los valores obtenidos por POCHAT *et al.* (1999) los cuales describieron la cinética de crecimiento de las bacterias acéticas, con un valor de $0,055 \text{ h}^{-1}$ para la tasa específica de crecimiento (μ_{max}), observando influencias negativas sobre el crecimiento de las bacterias a niveles máximos de acidez. Por lo tanto, cuando la fermentación es prolongada la producción de biomasa se retrasa y las bacterias disminuyen su habilidad de

multiplicarse y el cultivo es dañado por las altas concentraciones de ácido acético.

DE ORY *et al.* (1998b) obtuvo valores de la velocidad específica de crecimiento (μ_{max}) a 30 °C de $0,0944 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$ para describir el comportamiento de las bacterias acéticas, concordando con lo obtenido en esta investigación.

Los valores cinéticos de tasa de mortalidad de las bacterias acéticas se mantuvieron en el orden de lo esperado, desde el punto de vista biológico, según PIZARRO *et al.* (2003) entregan rangos para μ_d desde 0,01 hasta $0,1 \text{ h}^{-1}$. En esta investigación los valores fueron de $0,083 \text{ h}^{-1}$ y $0,1158 \text{ h}^{-1}$, para el microorganismo sobre medio GYC y sobre el sustrato, respectivamente, por lo tanto concuerdan con lo propuesto por PIZARRO *et al.* (2003).

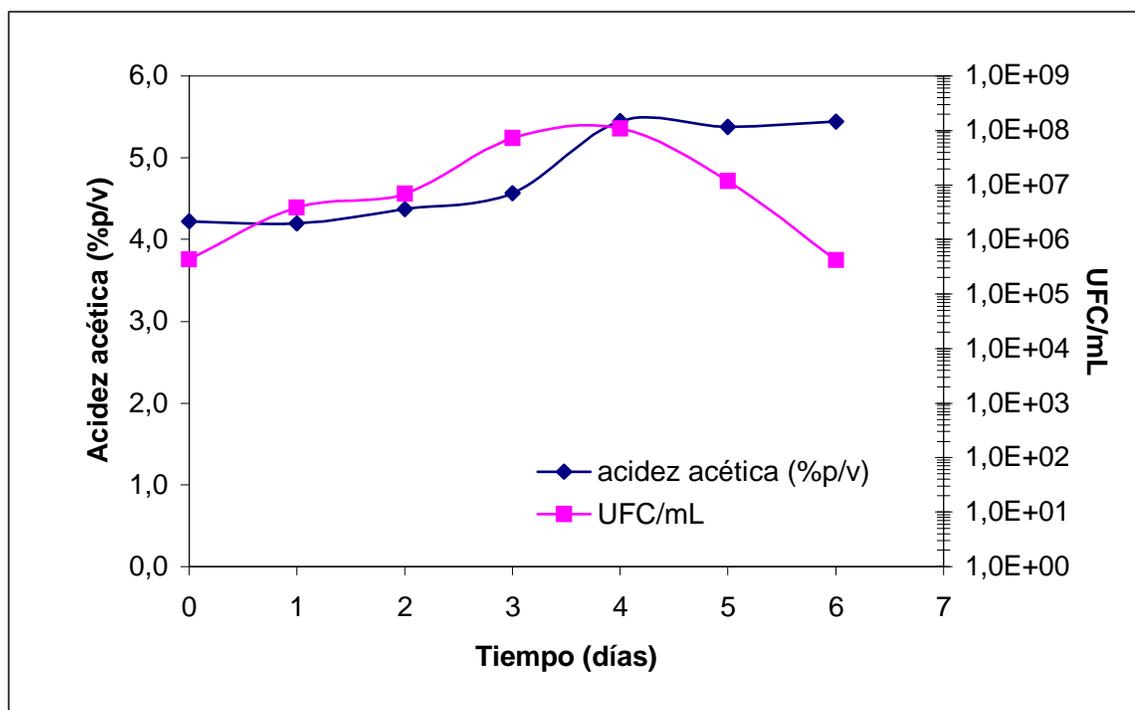


FIGURA 12. Evolución de la concentración de biomasa y ácido acético del inóculo madre.

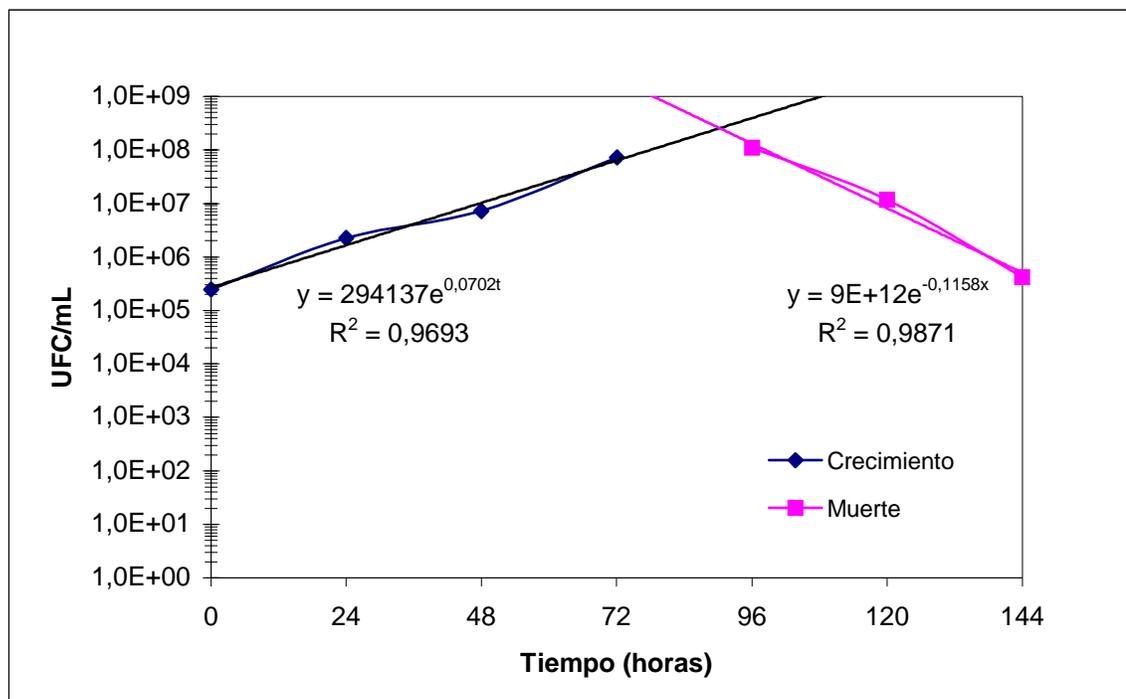


FIGURA 13. Cálculo de las velocidades específicas de crecimiento para el inóculo madre.

4.3 Fermentación acética

Las variables que más influenciaron sobre el metabolismo de las bacterias acéticas fueron la concentración de etanol, de ácido acético, la concentración de oxígeno disuelto, el pH, la densidad de la población y la temperatura de cultivo. Algunos de los factores más frecuentemente estudiados en el metabolismo son los efectos de las concentraciones de sustrato y producto (DE ORY *et al.*, 1998b).

4.3.1 Rendimiento y velocidad de acetificación. La FIGURA 14 muestra la evolución de la concentración de ácido acético para todos los tratamientos (T1 a T6) durante dos ciclos mientras que en la FIGURA 15 se observa la variación de la concentración de etanol en el tiempo para cada tratamiento. Los datos de ambas concentraciones se encuentran el ANEXO 4.

Con los antecedentes anteriores se estima el rendimiento del proceso fermentativo para cada tratamiento y la velocidad de acetificación media y cual de los factores ejerce un efecto significativo sobre el rendimiento y la velocidad de acetificación. Se evaluó el efecto de cada variable y se propone una ecuación de regresión lineal múltiple para el rendimiento de la fermentación.

El comportamiento del etanol y el ácido acético versus tiempo muestran la típica tendencia de los microorganismos. En los primeros tratamientos se observa una fase lag, que en términos generales podría ser resumido como una fase en la cual las bacterias consumen el máximo de su energía para la adaptación metabólica a las nuevas condiciones ambientales del cultivo y se observa claramente en la FIGURA 14 en que los primeros tres tratamientos T1, T2 y T3 tienen mayores fases lag y por consiguiente se aumenta el tiempo de fermentación acética, llegando a concentraciones de acidez acética en 6 días, esto coincide con Barley & Ollis citado por DE ORY *et al.* (2004).

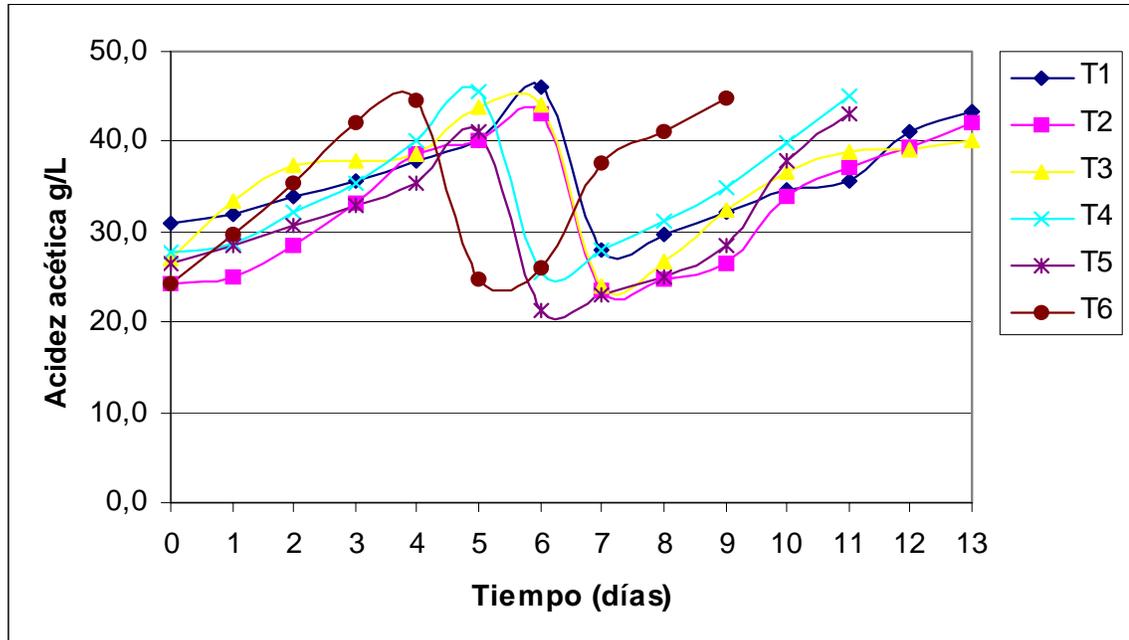


FIGURA 14. Evolución de la concentración de acidez en el tiempo.

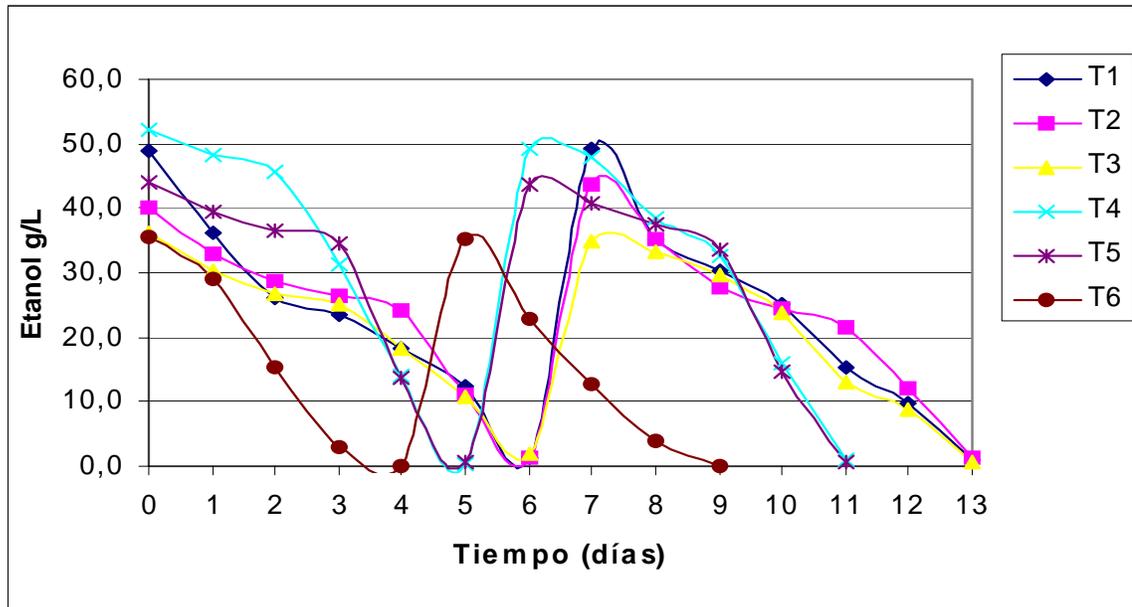


FIGURA 15. Evolución de la concentración de etanol en el tiempo.

4.3.1.1 Rendimiento. Los resultados de los rendimientos fermentativos para cada uno de los tratamientos realizados se presentan en la FIGURA 16, los datos se encuentran en el ANEXO 5.

Del diseño experimental para las dos variables se obtuvo que la variable crítica para obtener un mejor rendimiento es la concentración inicial de etanol ($p < 0,05$), específicamente la concentración inicial de 8% v/v. (ANEXO 5.1).

El efecto de la concentración de etanol sobre la producción de ácido acético por la cepa aislada mostró un máximo rendimiento cuando la concentración de etanol correspondió a un 8 %v/v, para los tratamientos T3 y T6 (lo que para el proceso de fermentación, equivale a 4 %v/v, por la proporción de carga 1:1 vino: vinagre). Similares resultados reportaron LU *et al.* (1999) los cuales realizaron un perfil sobre un rango de concentraciones iniciales de 0 a 10% v/v, con un máximo en la producción de ácido acético, en 5% v/v, en concentraciones de etanol de 1 a 5 % v/v la cantidad de ácido acético producido, incremento proporcionalmente a la concentración de etanol, en concentraciones superiores a 5 %, la cantidad de ácido acético producido disminuyó proporcionalmente.

Los resultados revelaron que las bacterias del género *Gluconobacter spp.* disminuyeron su actividad cuando la concentración de etanol en la fase de alimentación se vio incrementada.

El rendimiento usual de ácido acético por bacterias acéticas va del orden de 60 a 92 % (Bar *et al.* citado por LU *et al.*, 1999).

Resultados obtenidos por *Gluconobacter oxydans*, indican para la bacteria que los valores de acidez total se encuentran en un rango de 3,4% a 6%, mientras que en el proceso de fermentación acética los ensayos arrojaron rendimientos del orden de 70% a 82% CIANI (1998) y de 90% a 92% para tipos de *Acetobacter* (RICHARDSON *et al.*, 1967).

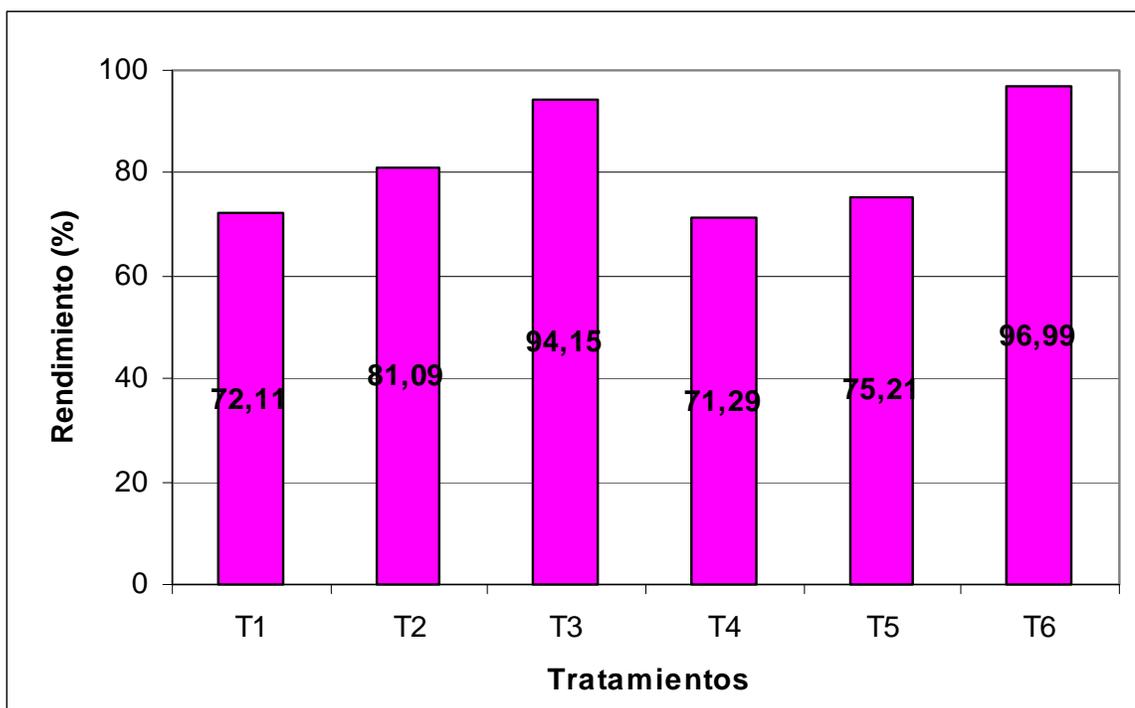


FIGURA 16. Rendimiento del proceso de fermentación acética.

Para MACÍAS *et al.* (1997) la alimentación de etanol a elevadas concentraciones implica un bajo rendimiento del proceso, lo que indica un efecto inhibitorio del etanol sobre la biomasa. EBNER *et al.* (1993) proponen una concentración inicial de etanol en la alimentación de 5%, con el fin de

obtener mejores rendimientos de fermentación ya que a menores concentraciones de etanol, se produce una mejor adaptación de las bacterias acéticas al medio a fermentar, no produciéndose una inhibición del microorganismo.

Iguales reducciones se observaron para la tasa de acetificación por ciclo cuando se incrementó la concentración inicial de etanol, así la concentración de etanol óptima para la alimentación correspondió a 37,5 g/L que equivale a 4,6 % v/v, coincidiendo con LU *et al.* (1999).

Los análisis realizados determinaron que a mayores concentraciones iniciales de ácido acético (T1 y T4 de 12% v/v de etanol) con concentraciones iniciales de ácido acético del orden de 3% p/v, se obtuvieron los valores más bajos de rendimiento, concordando de esta forma con MACÍAS *et al.* (1997), que indican un fuerte efecto inhibitorio de ácido acético inicial sobre el rendimiento, tasa de acetificación y el grado de acidez final, valores cercanos a 0,5 % p/v son considerados favorables para aumentar el rendimiento.

Diferentes autores han reportado dificultades experimentadas cuando crece algún tipo de *Acetobacter aceti*, en medios que contienen elevadas concentraciones iniciales de etanol (sobre 15% v/v) y la alta inhibición a concentraciones de ácido acético en la alimentación de 10 g/L y 30 g/L, (Drysdale y Fleet, 1985; Joex *et al.*, 1984 citado por DE ORY *et al.*, 1998b y 1999).

A continuación se muestra los resultados del ajuste de un modelo de regresión lineal múltiple para describir la relación entre rendimiento con la concentración de etanol y aireación. La ecuación del modelo es la siguiente:

$$Rendimiento = 144,393 - 6,00625xEtanol - 3,96111xAire \text{ (Ec. 4)}$$

$$R^2 = 84,30\%$$

$$R^2 \text{ (ajustado para g.l.)} = 80,82\%$$

Dado que el p-valor es inferior a 0,01, existe relación estadísticamente significativa entre las variables para un nivel de confianza del 99%, además se

observa que la variable concentración inicial de etanol contribuye significativamente al ajuste del modelo de regresión múltiple (ANEXO 5.2)

La investigación propuesta por Tesfaye *et al.* 2000 citado por TESFAYE *et al.* (2002), propone una ecuación de regresión lineal múltiple, en el que se seleccionaron las variables de: velocidad de agitación, volumen de carga y proporción de carga en función del rendimiento. Los resultados demostraron que el rendimiento del proceso incrementa cuando la tasa de proporción de carga del sustrato es 1:1; la razón de estos incrementos se explica en términos de descarga de bacterias acéticas, de esta forma la proporción de bacterias acéticas remanentes en el medio, inoculan el siguiente ciclo, siendo suficiente la cantidad de bacterias acéticas para que ocurra el siguiente proceso de fermentación acética bajo una proporción de carga 1:1 vino/vinagre.

4.3.1.2 Velocidad de acetificación. La concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo durante la fermentación tiene un efecto significativo sobre el crecimiento bacteriano y la tasa de producción de ácido acético (Ghommidh *et al.*, 1982 y Park *et al.*, 1989 citados por RUBIO-FERNANDEZ *et al.*, 2004).

Los factores más importantes que afectan la concentración de oxígeno disuelto son la tasa de transferencia de O_2 , el flujo de aire y la presión parcial de O_2 en el aire suministrado al bioreactor.

Los sistemas de cultivo sumergido, en los que las bacterias acéticas se encuentran homogéneamente suspendidas en el seno del líquido a acetificar, con condiciones adecuadas de agitación y aireación, presentan ventajas como una mayor uniformidad en la calidad del producto y sobre todo unas elevadas velocidades de acetificación debidas a la mayor transferencia de oxígeno (DE ORY *et al.*, 1998a).

La cantidad de aire que se introduce en el bioreactor se expresa habitualmente como caudal de aire suministrado por unidad útil del fermentador (min^{-1}), empleándose la abreviatura vvm para este parámetro.

Los valores de velocidades de acetificación se encuentran en el ANEXO 6, los valores promedios de las velocidades de acetificación por hora y por día, para cada tratamiento se presentan en el CUADRO 12.

CUADRO 12. Velocidades de acetificación promedio por tratamiento.

Tratamiento	Cantidad de aire suministrado (vvm)	Velocidad de acetificación (g/Lh)	Velocidad de acetificación (g/Ld)
T1	0,5	0,110	2,640
T2	0,5	0,130	3,120
T3	0,5	0,120	2,880
T4	0,8	0,170	4,080
T5	0,8	0,150	3,600
T6	0,8	0,210	5,040

Del CUADRO 12 se observa un aumento de la velocidad de acetificación, cuando se utiliza una mayor aireación; este parámetro incrementa de 0,12 g/Lh a 0,5 vvm a 0,18 g/Lh a 0,8 vvm aproximadamente. Con esto el tiempo de proceso disminuye de 144 h (6 días) a 96 h (4 días), reduciendo el tiempo de proceso. La tasa media de acetificación, tuvo una tendencia para los ciclos consecutivos de fermentación, en la cual fue aumentando de 0,110 g/Lh a 0,210 g/Lh; sin embargo estas tasas son menores a las obtenidas por otros autores, mostrando valores entre 0,24 g/Lh y 0,45 g/Lh (DE ORY *et al.*, 2004).

DE ORY *et al.* (2004), explica el progresivo incremento de las tasas de acetificación en términos de “adaptación celular” del cultivo a las condiciones de fermentación. La presente biomasa progresivamente aclimatada al reactor, da como resultado en el cultivo, un incremento en su habilidad para fermentar y aumentar las tasas de acetificación.

El diseño experimental arrojó que la variable crítica para obtener una mayor velocidad de acetificación corresponde a la aireación ($p < 0,05$ en

ANEXO 6.1), específicamente a una cantidad de 80 mL de aire/ min, lo que equivale a 0,8 vvm.

Mayores valores a la tasa de producción de ácido acético (0,72 g/Lh y un tiempo de proceso cercano a 65 h) fueron reportados por RUBIO-FERNANDEZ *et al.* (2004). Al compararlos con los resultados de esta investigación, la diferencia radica principalmente en el sistema de fermentación utilizado, ya que el sistema de fermentación continuo es más productivo que el sistema batch utilizado en esta investigación.

LU *et al.* (1999), observaron que *Acetobacter sp* I142 generó ácido acético a tasas de 0,61 y 0,59 g/Lh a 30 y 35 °C, respectivamente. *Acetobacter rances* S3 y F11 produjo ácido acético a 0,23 y 0,26 g/Lh, respectivamente, además la tasa de *Acetobacter sp* 249 fue de 0,23 g/Lh. Estos valores coinciden levemente con los valores propuestos en esta investigación.

Los valores de concentración acética (%), para cada tratamiento llegaron a una acidez mínima de 4 % en distintos días, no obstante la mayoría lo hace en seis y cinco, el tratamiento 6 (8% de etanol inicial y 0,8 vvm) tarda 4 días (FIGURA 17).

La evolución de diferentes procesos fermentativos de forma semicontinua a diversos niveles de aireación arrojó resultados de 0,75 g/Lh a 1,76 g/Lh. A medida que aumentaba el suministro de aire la tasa de producción de ácido acético lo hizo de la misma forma, coincidiendo con los resultados de esta investigación. RUBIO-FERNANDEZ *et al.* (2000).

4.4 Evaluación sensorial del vinagre

La evaluación sensorial es una valiosa herramienta de calidad en alimentos (TESFAYE *et al.*, 2004). Para valorar la calidad del vinagre de vino está se relaciona con su composición química y la evaluación sensorial Gerbi *et al.* (1997) citado por MORALES *et al.* (2001).

En el CUADRO 13 se observa el promedio de tres repeticiones, para cada uno de los atributos, de las calificaciones que entregaron los 8 jueces que componen el panel sensorial.

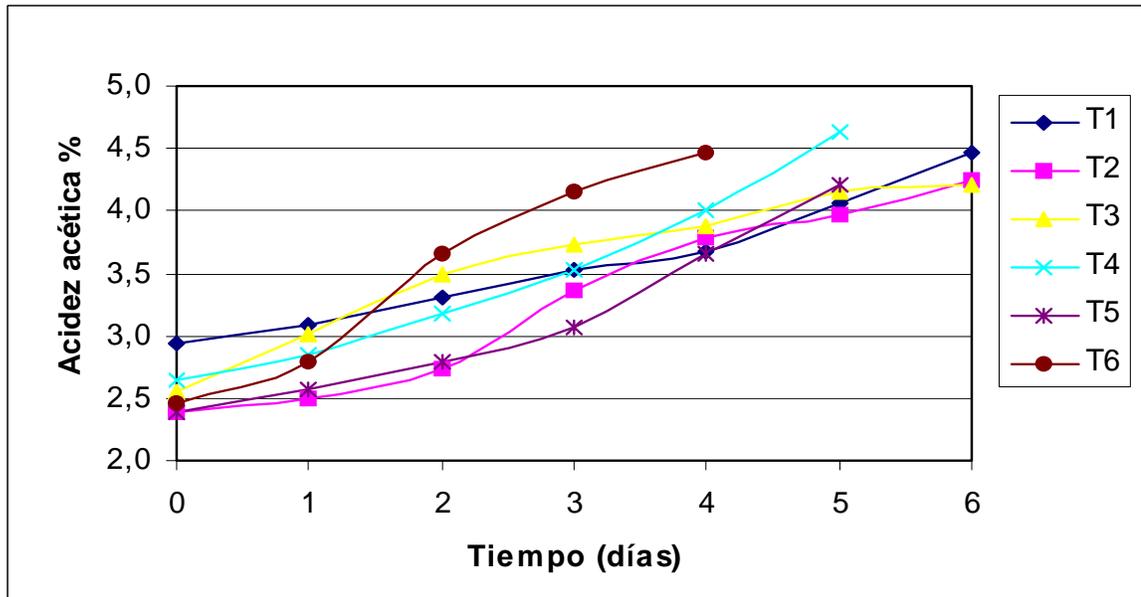


FIGURA 17. Cinética de producción de ácido acético en el tiempo.

4.4.1 Intensidad del aroma. Los análisis estadísticos arrojaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos (CUADRO 13). Los tratamientos 1 y 5 obtienen un aroma entre débil y moderado, no así los tratamientos 2, 3, 4 y 6 los cuales fueron calificados con un aroma entre moderado e intenso; los tratamientos mejores calificados fueron el tratamiento 3 y 6, FIGURA 18.

El nivel de agrado del aroma, se observa en la FIGURA 19. El tratamiento mejor evaluado fue el 6, con un 100% de aceptación de los jueces, mientras que el tratamiento con mayor desagrado, en el atributo aroma correspondió al 3.

4.4.2 Color. Para este atributo los resultados arrojaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$). El tratamiento distinto en color es

el 3 (FIGURA 20). Todos los tratamientos a excepción del 3, fueron calificados, asignándoles el nivel entre “regular” y “ligeramente atractivo”.

CUADRO 13. Resultados evaluación sensorial de vinagre de arándanos*.

Trat.	Atributos				
	Intensidad del Aroma	Color	Sabor Acido	Nivel de agrado del sabor ácido	Impresión general
T 1	2,00 ± 0,00 ^c	3,75 ± 0,79 ^a	10,66 ± 1,54 ^a	8,37 ± 2,11	3,38 ± 0,56 ^{bc}
T 2	3,00 ± 0,00 ^{ab}	3,75 ± 0,89 ^a	8,94 ± 1,80 ^{bc}	8,87 ± 2,78	3,67 ± 0,69 ^{ab}
T 3	4,00 ± 0,00 ^{ab}	2,95 ± 1,12 ^b	9,70 ± 1,94 ^{ab}	8,87 ± 2,42	3,25 ± 0,83 ^{bc}
T 4	3,25 ± 0,88 ^{ab}	3,71 ± 0,80 ^a	9,28 ± 1,24 ^{ab}	8,45 ± 2,09	3,54 ± 0,50 ^{ab}
T 5	2,83 ± 0,80 ^c	3,75 ± 0,84 ^a	9,12 ± 1,58 ^{bc}	9,04 ± 1,94	3,38 ± 0,70 ^{bc}
T 6	3,63 ± 0,75 ^a	3,75 ± 0,73 ^a	9,84 ± 1,72 ^{ab}	9,93 ± 1,56	4,04 ± 0,45 ^a

* Promedio ± D.E de las evaluaciones de 8 jueces.

Letras distintas en las filas indican diferencia significativa entre tratamientos.

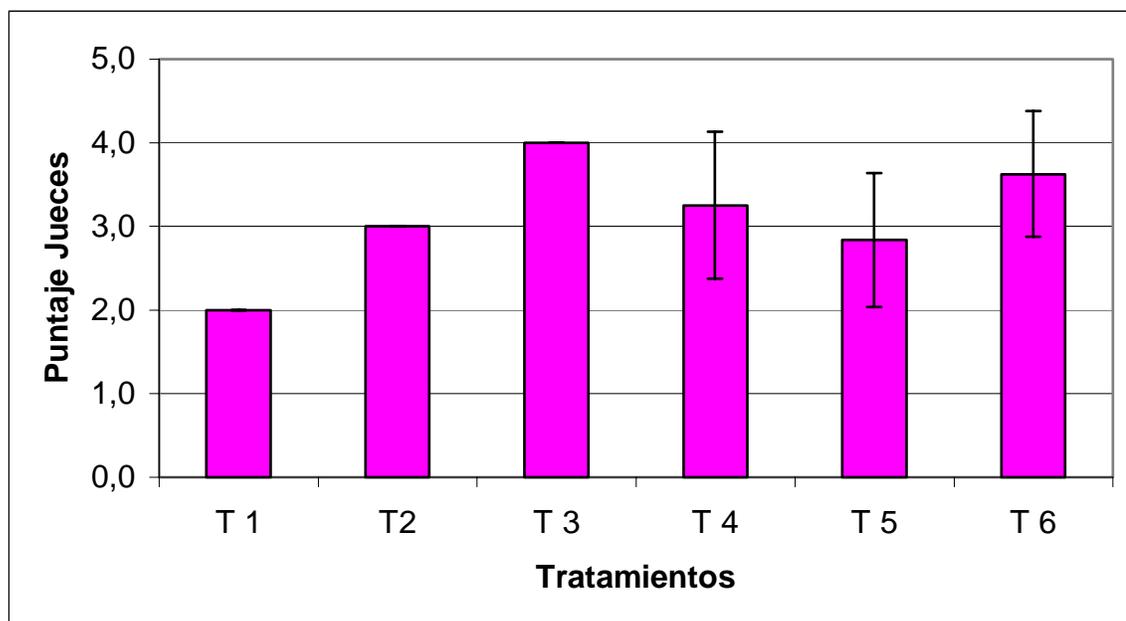


FIGURA 18. Calificaciones otorgadas por el panel sensorial para el atributo intensidad del aroma.

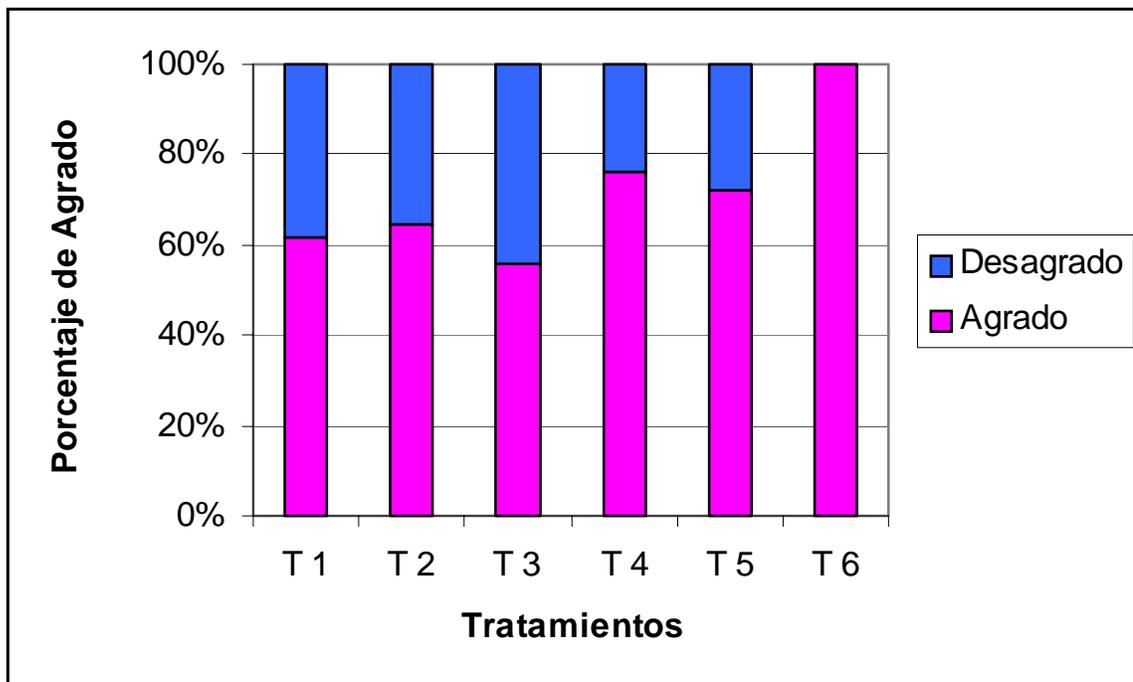


FIGURA 19. Calificaciones otorgadas por el panel sensorial para el atributo nivel de agrado del aroma.

4.4.3 Sabor ácido. Las calificaciones entregadas por los jueces en este atributo se observan en la FIGURA 21.

Los resultados en este atributo arrojaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos, los registros indican que los jueces calificaron el sabor ácido entre 8,95 y 10,66 cm, lo que en la escala ajustada de 5 puntos, equivale a un nivel comprendido entre 3 y 4 puntos (ligeramente ácido).

El test de comparación múltiple de Tukey, indica que el tratamiento 2 es el que obtuvo la menor calificación, no así el tratamiento 1 que fue evaluado como el más ácido.

En esta etapa se pidió al panelista que marcara la acidez que encontraba como “Acidez Ideal”, la cual resultó en 9,70 cm, que en la escala ajustada equivale a “ligeramente ácido”.

Con los valores entregados en el CUADRO 13, los panelistas indicaron que los tratamientos con condición ideal de acidez fueron el 3 y el 6.

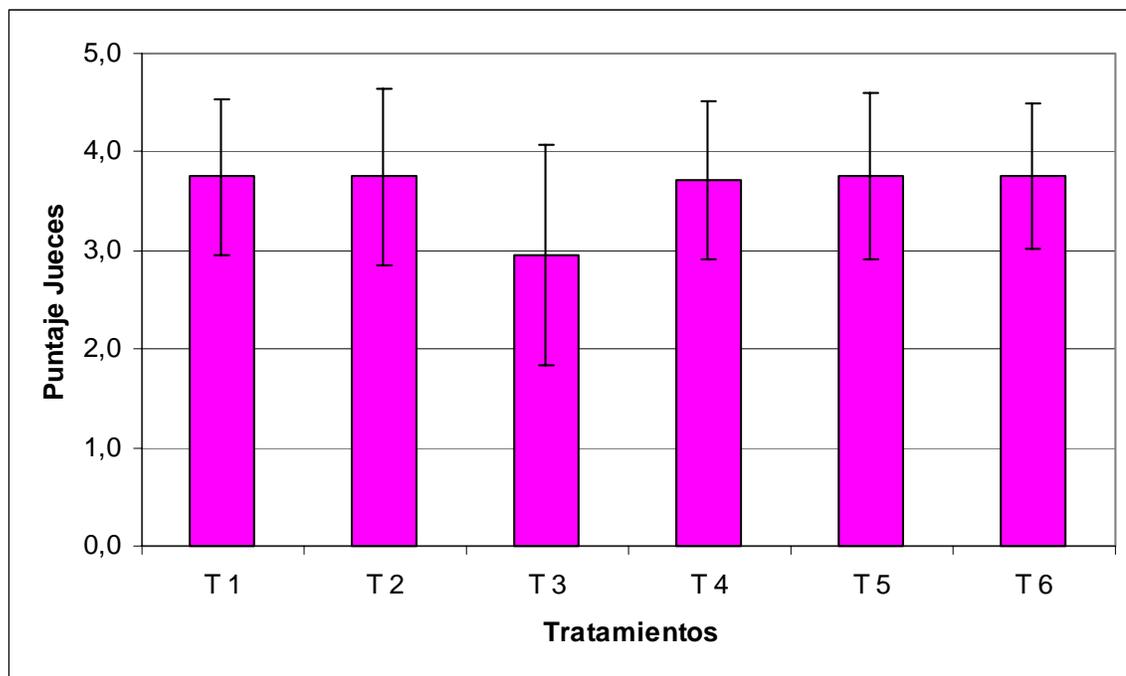


FIGURA 20. Calificaciones otorgadas por el panel sensorial para el atributo color.

4.4.4 Nivel de agrado del sabor ácido. Los jueces no encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos, fueron calificados entre “ni muy agradable, ni muy desagradable” y “agradable” (FIGURA 22). Así, el tratamiento con mayor puntaje entregado fue el 6, coincidiendo con el atributo de acidez ideal.

4.4.5 Impresión general. Los jueces encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos, según test de Tukey, con un 95% de confianza, existen diferencias entre T1, T3 y T5 con T6. El tratamiento mejor evaluado por los panelistas fue el 6, y evaluaron como “bueno”, los restantes tratamientos fueron evaluados entre “regular” y “bueno” (FIGURA 23).

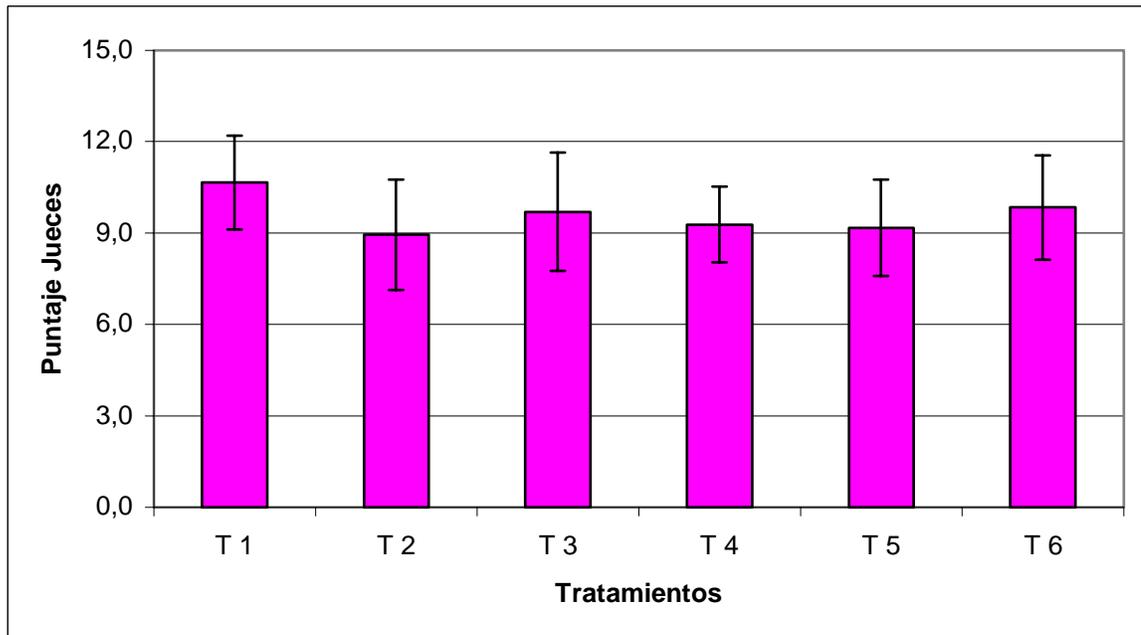


FIGURA 21. Calificaciones otorgadas por el panel sensorial para el atributo de sabor ácido.

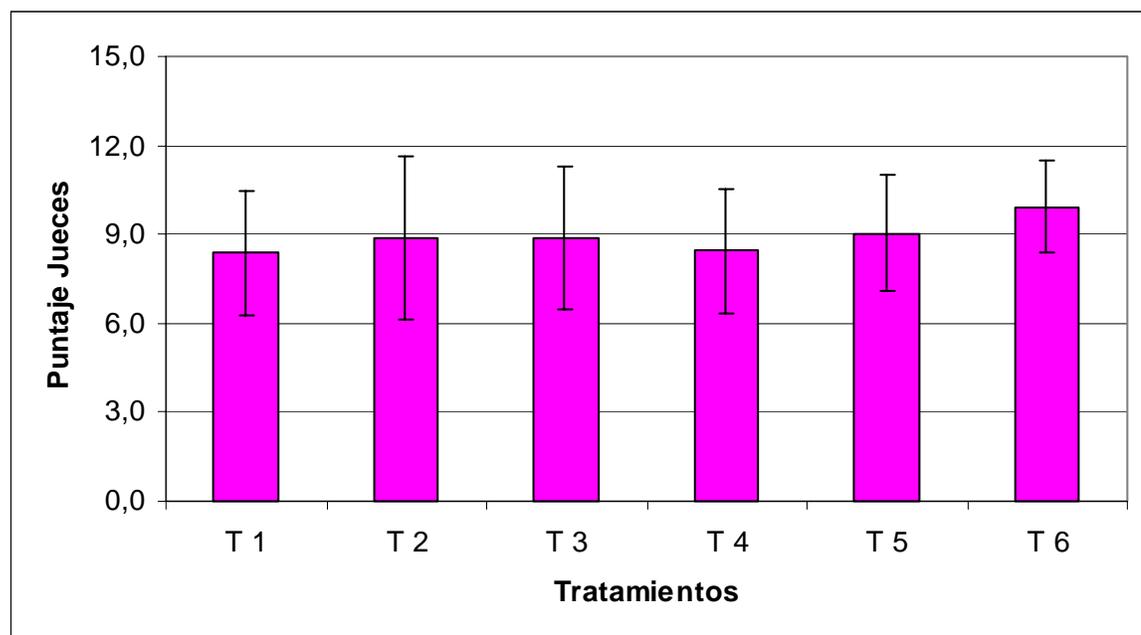


FIGURA 22. Calificaciones otorgadas por el panel sensorial para el atributo de nivel de agrado del sabor ácido.

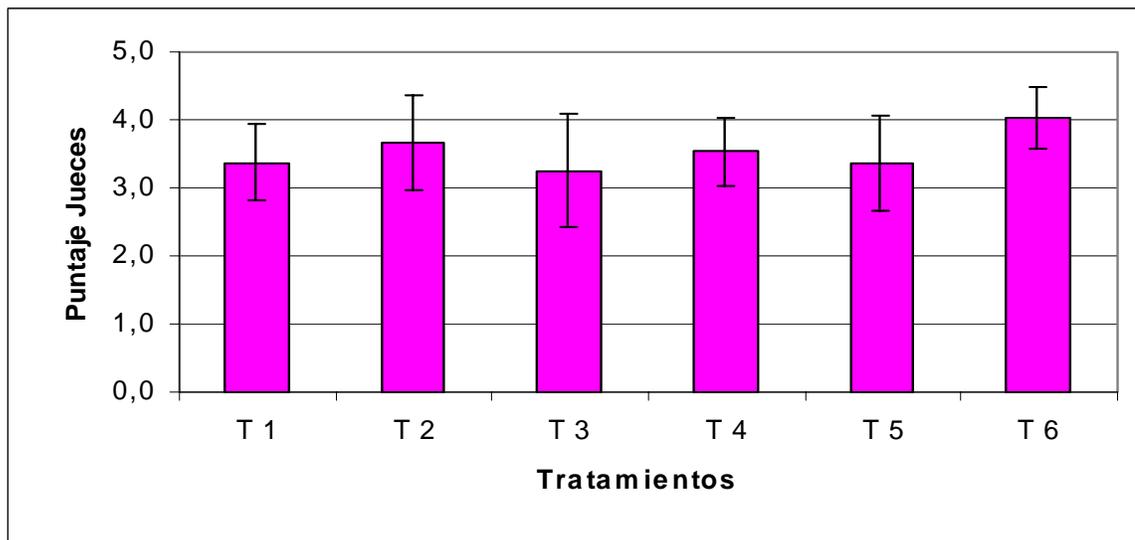


FIGURA 23. Calificaciones otorgadas por el panel sensorial para el atributo de impresión general.

4.4.6 Perfil sensorial de vinagre de arándanos. La evolución de los atributos seleccionados se observa en la FIGURA 24 representada en un gráfico de araña. El tratamiento mejor evaluado por los panelistas fue el 6, no así el 3, el cual obtuvo las calificaciones más bajas. El panel encontró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para la mayoría de los atributos, lo que coincide con resultados entregados por otras investigaciones (GERBI *et al.* 1998 y TESFAYE *et al.* 2004) en los cuales los jueces detectan diferencias entre muestras, estableciendo un criterio de calidad para la elaboración de vinagre de residuo de arándanos.

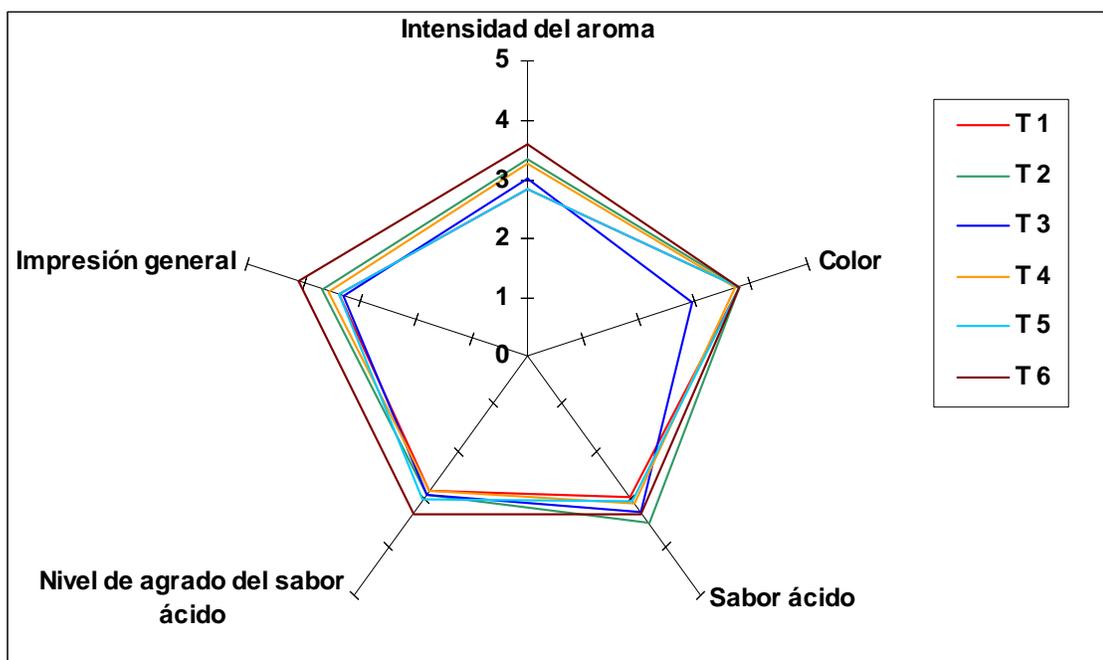


FIGURA 24. Evaluación sensorial descriptiva global.

4.5 Determinación de antocianinas

El contenido de antocianos al sustrato extraído desde la torta prensada de arándanos, arrojó como resultado una cantidad de antocianinas de 70,80 mg/L; en las muestras de vinagre se observó una disminución desde el contenido inicial de antocianinas al término del proceso de fermentación acética; diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$) fueron encontradas en la concentración de antocianos (CUADRO 14). El tratamiento con menor contenido de antocianinas fue el 3 con 19,70 mg/L, mientras que el tratamiento con mayor concentración fue el 6 con una cantidad de 28,16 mg/L.

Un estudio similar, donde se evaluó la capacidad de extracción de diversos solventes reveló mayores rendimientos de extracción de fenoles a partir de grosellas negras, utilizando metanol como solvente (MEYER y LANDBO, 2001).

El valor promedio de antocianos fue de 34 mg/L, siendo este valor menor, al valor encontrado en esta investigación al momento de extraer antocianinas fue 70,80 mg/L, usando como solvente etanol.

CUADRO 14. Resultados del contenido de antocianos para las muestras de vinagre *.

Tratamiento	Cyanidin-3-glucoside (mg/L)
T 1	25,73 ± 0,552 ^{ab}
T 2	24,93 ± 1,103 ^{ab}
T 3	19,70 ± 2,333 ^{bc}
T 4	25,14 ± 1,916 ^{ab}
T 5	25,02 ± 0,898 ^{ab}
T 6	28,16 ± 1,541 ^a

* Media ± D.E, letras diferentes en las filas indican diferencias significativas entre tratamientos $p < 0,05$.

La degradación de los antocianos desde el sustrato inicial al vinagre es consecuencia del tiempo de fermentación y la temperatura, considerando que se ha reportado que altas temperaturas, degradan las antocianinas (Iversen, 1999 y Skrede *et al.* 2000 citados por CACAE y MAZA, 2003). A 35 °C comienza la degradación del pigmento, mientras que el proceso de fermentación se prolongó por 6 días y a 30 °C.

KADER *et al.* (1998) estudiaron la degradación de cyanidin- 3- glucoside (Cy-3-glc) obteniendo resultados en los cuales aseguran que en presencia de ácido clorogénico y polifenol oxidasa, Cy-3-glc fue rápidamente degradado.

Un estudio evaluó la calidad de vinagres de vino de sherry, utilizando como indicador la variabilidad de compuestos fenólicos durante el proceso de acetificación, no encontraron diferencias significativas en la concentración de tales compuestos (MORALES *et al.* 2001).

5. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en las condiciones que se llevo a cabo este estudio, se puede concluir que:

Los vinagres madres utilizados en el proceso de aislación e identificación del microorganismo iniciador del proceso de fermentación acética, determinaron al microorganismo *Gluconobacter spp.* como predominante en las cepas.

El proceso de extracción resultó efectivo en la obtención de pigmentos y aromas característicos de *Vaccinium corymbosum*. Sin embargo, se recomienda incorporar variantes que permitan optimizar el proceso de extracción, con el fin de obtener un mayor rendimiento en el contenido total de antocianinas.

El establecimiento de las condiciones que permiten el proceso de fermentación acética reveló que a concentraciones menores de etanol produjeron los mayores rendimientos.

Se demostró que la tasa de producción de ácido acético aumentó al incorporar un flujo de mayor de aire.

La evaluación sensorial, demostró que los tratamientos mejores evaluados, fueron aquellos que produjeron ácido acético en menor tiempo, comprobando que no hubo muchas pérdidas de compuestos volátiles, que son los que dan al vinagre la característica de calidad final.

Se determinó que el contenido de antocianos responde de manera directa y proporcional a la velocidad de acetificación, no así los tratamientos que demoraron en llegar a la acidez mínima.

Finalmente es posible elaborar vinagre a partir de residuo de torta de prensa de arándanos, abriendo al mercado un producto con características químicas y sensoriales típicas de los berries, con buenas proyecciones para la agroindustria alimentaria.

6. RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo principal elaborar vinagre de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) empleando residuos de torta de prensa obtenida del proceso de elaboración de jugo concentrado. De esta manera se pretende otorgar un valor adicional y proponer un uso efectivo de los residuos agroindustriales.

Se aislaron e identificaron microorganismos de la familia *Acetobacteraceae*, iniciadores del proceso de fermentación acética, a partir de vinagres madres obtenidos en la Xª Región del País. La investigación determinó sus características de crecimiento y metabolismo sobre diversos medios de cultivos, a través de pruebas bioquímicas (catalasa, oxidasa, gram e indol) y fisiológicas (crecimiento sobre etanol, formación de compuestos cetónicos desde glicerina, y de ácidos 2 y 5 cetoglucónico a partir de glucosa y finalmente su capacidad de oxidar el acetato). Estas pruebas establecieron que la bacteria aislada pertenece al género *Gluconobacter spp.*, con una cantidad de células viables superior a 1×10^7 UFC/ mL sobre medio estándar de crecimiento. La tasa de crecimiento fue del orden de 0,0702 a 0,1089 h⁻¹ y la tasa de mortalidad entre de 0,0737 a 0,083 h⁻¹.

La influencia de la concentración de etanol y el volumen de aire suministrado en el proceso fermentativo reveló que a 8 % v/v de etanol y una cantidad de 0,8 vvm de aire suministrado, el rendimiento del proceso fue 95% y la velocidad de acetificación fue de 0,210 g/Lh, en un periodo de 96 h, siendo este tratamiento el mejor evaluado por el panel sensorial.

SUMMARY

The main goal of this work was to manufacture blueberry vinegar (*Vaccinium corymbosum* L.) using press cake residues from elaboration of concentrated juice process. By this way an additional value and an affective use of the residues was proponed.

Microorganisms from Acetobactereace family, that are the acetic fermentation initiation bacteria, were isolated from regional vinegars and identified.

Growth and metabolic characteristics on several cultivation media were investigated as well as biochemical (catalase, oxidase, gram and indol) and physiological (growth on etanol, ketonic compounds formation from glycerin; 2,5 ketogluconic acid formation from glucose and acetate oxidation capacity) tests. By these means was confirmed the bacteria belonged to *Gluconobacter spp.* genus presenting a viable number higher than 1×10^7 UFC/mL on a standar growth media. The growth rate was from 0.0702 to 0.1089 h⁻¹ and the lethality rate was from 0.0737 to 0.083 h⁻¹.

The ethanol concentration and air supply volume showed that 8%v/v and 0.8 vvm of air, the process yield was 95% and acetification rate was 0.210g/Lh in a 96 h period, being the best sensory evaluated treatment.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Association Official Analytical Chemistry. A.O.A.C. 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International. Vol II. 16th Ed. Cap. 43.
- BORTOLINI F., SANT' ANNA E.S. y TORRES R.C. 2001. Comportamiento de la fermentación alcohólica y acética de zumos de kiwi (*Actinidia deliciosa*); composición de mostos y métodos de fermentación acética. Cienc.Tecnol.Aliment., Campinas 21: 236-243.
- BUZETA A. 1997. Chile: Berries para el 2000. Fundación Chile. Departamento Agroindustrial. Santiago. Chile. 133 p.
- CACAE J. y MAZZA G. 2003. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. J. of Food Science. 68: 240247.
- CASTRO M., NATERA MARÌN R., GARCIA M^a. y GARCIA F. 2002. Optimisation of headspace solid-phase microextraction analysis of aroma compounds in vinegar. J. of Chromatography A 953:7-15.
- CATALDI T., CENTONZE D. y DESIMONI E. 1996. Sensitive determination of ethanol in low alcohol samples by ion-exclusion chromatography with EC detection using a ruthenium-based inorganic film electrode. Food Chemistry. 55: 17-21.
- CIANI M. 1998. Wine vinegar production using base wines made with different yeast species. J. Sci. Food Agriculture. 78:290-294.

- DE LEY J., GILLIS M. y SWINGS J. 1984. Family VI. Acetobacteraceae 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 L., CANTERO D. 1998a. Operación y puesta a punto de un acetificador semi-industrial de máximo rendimiento. Alimentación, equipos y tecnología. Enero 1: 175-178.
- DE ORY I., ROMERO L. y CANTERO D. 1998b. Modelling the kinetics of *Acetobacter aceti* in discontinuous culture: influence of the temperature of operation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 189-193.
- DE ORY I., ROMERO L. y CANTERO D. 1999. Maximum yield acetic acid fermenter. Comparative fed-batch and continuous operation studies at pilot plant scales. Bioprocess Engineering. 21: 187-190.
- DE ORY I., ROMERO L. y CANTERO D. 2002. Optimum starting- up protocol of a pilot scale acetifier for vinegar production. J. of Food Engineering. 52:31-37.
- DE ORY I., ROMERO L. y CANTERO D. 2004. Operation in semi-continuous with a closed pilot plant scale acetifier for vinegar production. J. of Food Engineering. 63: 39-45.
- DEL VALLE M. y VALDEVENITO N. 1996. Mediciones y métodos de separación, purificación y análisis en el laboratorio químico. Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Química. 162 p.

- DEPPENMEIER U., HOFFMEISTER M. y PRUST C. 2002. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 60: 233-242.
- DINAMARCA P., POBLETE R. y SÁNCHEZ R. 1986. Aspectos técnico-económicos en la producción de berries. Fundación Chile. Departamento Agroindustrial (Publicación Técnica N° 16). Santiago. Chile.
- DU TOIT W. y LAMBRECHETS G. 2002. The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology.* 74: 54-64.
- EBNER H., SELLMER S. y FOLLMANN H. 1993. Acetic Acid. Capítulo 12. En: *Biotechnology. A multi-Volume Comprehensive Treatise. Volumen 6.* 2 Ed. Editado por Rehm H., Reed G., Pühler A., Stadler P. Editorial VCH. Weinheim. Alemania. 739 p.
- EBNER H., SELLMER S. y FOLLMANN H. 1999. Vinegar. En: *Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis, and bioseparation.* Editado por Flickinger M. Vol. 1 - 5. 2720 p.
- FREGAPANE G., RUBIO-FERNÁNDEZ H., NIETO J. y SALVADOR M. 1999. Wine vinegar using a noncommercial 100- litre column reactor equipped with a novel type of dynamic sparger. *Biotechnology and Bioengineering* 63: 141-146.
- GERBI V., ZEPPA G., BELTRAMO R., CARNACINI A. y ANTONELLI A. 1998. Characterisation of white vinegars of different sources with artificial neural networks. *J. Sci. Food Agric.* 78: 417-422.

- GIUSTI M. y WROLSTAD R. 2002. Characterization and measurement of anthocyanins by UV- visible spectroscopy. *Food Analytical Chemistry*. F1.2. 11p.
- GÓMEZ J. y CANTERO D. 1998. Kinetics of substrate consumption and product formation in closed acetic fermentation systems. *Bioprocess and Bioengineering*. 18: 439-444.
- HORIUCHI J., TADA K., KOBAYASHI M., KANNO T. y EBIE K. 2004. Biological approach for effective utilization of worthless onions- vinegar production and composting. *Resources, Conservation and Recycling*. 40:97-109.
- KADER F., HALUK J., NOCOLAS J. y METCHE M. 1998. Degradation of cyanidin- 3- glucoside by blueberry polyphenol oxidase: kinetic studies and mechanisms. *J. Agric. Food Chem*. 46:3060-3065.
- KALT W., McDONALDS J. y DONNER H. 2000. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant blueberry products. *J. of Food Science* 65:390-393.
- LEE J., DURST R. y WROLSTAD R. 2002. Impact of juice processing on blueberry anthocyanins and polyphenolics: Comparison of two pretreatments. *J. of Food Science*. 67: 1660-1667.
- LEE J. y WROLSTAD R. 2004. Extracion de anthocyanins and polyphenolics from blueberry processing waste. *J. of Food Science*. 69:564-573.
- LEVONEN E. y LLAGUNO C. 1978. Tecnología de la fabricación del vinagre. *Rev. Agroquím. Technol. Aliment*. 18: 289-296.

- LLAGUNO C. y POLO C. 1991. El vinagre de vino. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid. España. 238 p.
- LU S., LEE F. y CHEN H. 1999. A thermotolerant and high acetic acid producing bacterium *Acetobacter* sp. I14-2. J. of Applied Microbiology 86:55-62.
- MACÍAS M., CARO I. y CANTERO D. 1997. Optimum operating conditions in closed- system industrial acetifiers (semi- continuous operation): a study by computer simulation. Chemical Engineering Journal. 65: 201-207.
- METIVIER R., FRANCIS F. y CLYDESDALE F. 1980. Solvent extraction of anthocyanins from wine pomace. J. of Food Science. 45: 1099-1100.
- MEYER A. y LANDBO A. 2001. Enzyme assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*). J. Agric. Food Chem. 49: 3169-3177.
- MORALES M., TESFAYE W., GARCÍA-PARRILLA M., CASAS J. y TRONCOSO A. 2001. Sherry wine vinegar: physicochemical changes during the acetification process. J. Sci. Food Agriculture. 81: 611-619.
- NATERA MARÍN R., CASTRO M., GARCÍA R., GARCIA M^a. y GARCIA B. 2002. Headspace solid-phase microextraction analysis of aroma compounds in Vinegar. Validation study. J. of Chromatography A 967:261-267.
- PARLIMENT T. y KOLOR M. 1975. Identification of the major volatile components of blueberry. J. Food Science. 40: 762-763.

- PELEG M. 1997. Modelling microbial populations with the original and modified versions of the continuous and discrete logistic equations. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 37: 471-490.
- PIZARRO C., GONZÁLEZ-SAIZ J. y GARRIDO-VIDAL D. 2003. Kinetic modelling of acetic fermentation in an industrial process by genetic algorithms with a desirability function. *J. of Chemometrics*. 17: 453-462.
- POCHAT C., BOHATIER C. y GHOMMIDH C. 1999. Modeling the kinetics of growth of acetic acid bacteria to increase vinegar production: analogy with mechanical modeling. *Environ. Technol.* 20:995-1000.
- PRIOR R.L., MARTIN G., McEWAN S., O'BRIEN C. y LISCHNER N. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic content, maturity and variety of *Vaccinium* species. *J. Agric.Food Chem.* 46:2686-2693.
- RICHARDSON K. 1967. Submerged acetification of a vinegar base produced from waste pineapple juice. *Biotechnology and Bioengineering*. 9: 171-186.
- RUBIO-FERNÁNDEZ H., SALVADOR M. y FREGAPANE G. 2000. Contribución a la mejora del proceso de acetificación para la producción industrial de vinagre de vino. *Alimentación, Equipos y Tecnología*. 1: 209-214.
- RUBIO-FERNÁNDEZ H., SALVADOR M. y FREGAPANE G. 2004. Influence of fermentation oxygen partial pressure on semicontinuous acetification for wine vinegar production. *Eur. Food Res. Technol.* 219: 393- 397.

- SIMON J., HETZRONI A., BORDELON B., MILES G., y CHARLES D. 1996. Electronic sensing of aromatic volatiles for quality sorting of blueberry. *J. Food Science*. 61:967-969.
- SKREDE G., WROLSTAD R. y DURST R. 2000. Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corybosum* L.). *J. of Food Science* 65:357-364.
- SMITH M., MARLEY K., SEIGLER D., SINGLETARY K. y MELINE B. 2000. Bioactive properties of wild blueberry fruits. *J. of Food Science* 65:352-356.
- SOKOLLEK S., HERTEL C. y HAMMES W. 1998. Cultivation and preservation of vinegar bacteria. *J. of Biotechnology*. 60:195-206.
- SOO Y., OTHAKE H. y TODA K. (1989). Acetic acid using a fermentor equipped with a hollow fiber filter module. *Biotechnology and Bioengineering* 33: 918-923.
- STEINKRAUS K. 1997. Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control*. 8:311-317
- STEPHANOPOULOS G. 1993. Bioprocessing. En: *Biotechnology. A multi-Volume Comprehensive Treatise*. Volumen 3. 2 Edición. Editado por Rehm, H. J. y Reed, G. Editorial VCH. Weinheim, RFA. pp. 1-157.
- SUÁREZ M. y LEVONEN E. 1981. Medio sintético nutritivo para la fabricación de vinagre de alcohol. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 21:259-266
- SUDZUKI F. 1993. *Frutales menores nuevas alternativas de cultivo*. Universidad de Chile. Santiago. Chile. 286 p.

TESFAYE W., MORALES M., TRONCOSO A. y GARCÍA-PARRILLA M. 2002. Wine Vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. Trends in Food Science & technology. 13:12-21.

TESFAYE W., MORALES M., BENÍTEZ B., GARCÍA-PARRILLA M. y TRONCOSO A. 2004. Evolution of wine vinegar composition during accelerated aging with oak chips. Analitica Chimica Acta. Artículo en prensa.

WEISER H., 1962. Practical Food Microbiology. The Avi Publishing Company, Inc. USA. 345 p.

WROLSTAD R., MOYER R., HUMMER K., FINN C. y FREI B. 2002. Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus and Ribes. J. Agricultural and Food Chemistry. 50: 519-525.

WOOD B. 1985. Microbiology of fermented food. Vol 1. Elsevier Applied Science publisher LTD. New York. USA. 371 p.

ANEXOS

ANEXO 1
PLANILLA DE EVALUACIÓN SENSORIAL DE VINAGRE

Nombre:

Instrucciones

Evalúe las siguientes muestras de Vinagre, realizando la tarea en el orden señalado, colocando en el casillero correspondiente la calificación que mejor represente su opinión. No olvide enjuagar su boca entre cada muestra

INTENSIDAD DEL AROMA

Sírvase evaluar el aroma de las muestras de vinagre haciendo girar la copa de forma circular y luego inclinarla en un ángulo de 45° respecto a la nariz, para capturar el aroma.

Recuerde que la evaluación debe ser realizada entre intervalos de 1 minuto entre cada muestra.

Calificación	Muestra					Nivel de agrado						
1. Muy débil.												
2. Débil												
3. Moderado												
4. Intenso												
5. Muy intenso												

Descripción de la calificación:

1. Muy débil: la muestra no posee aroma a ácido acético o vinagre. No es necesario agregar su nivel de agrado.
2. Débil: la muestra posee una baja intensidad del aroma. No es necesario agregar su nivel de agrado.
3. Moderado: la muestra posee un aroma suave a ácido acético o vinagre. Es necesario que agregue su nivel de agrado. (Agrado ó Desagrado, A ó D)
4. Intenso. La muestra posee un aroma intenso a ácido acético o vinagre. Es necesario que agregue su nivel de agrado. (A ó D)
5. Muy intenso: la muestra posee un aroma muy intenso a ácido acético o vinagre. Es necesario que agregue su nivel de agrado. (A ó D)

COMENTARIOS

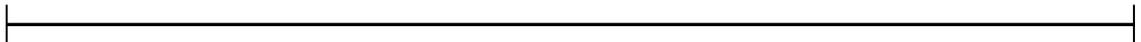
COLOR

Califique las muestras de vinagre según el nivel de agrado que le produce a Ud. el color. Frente a la muestra correspondiente marque el espacio que estime conveniente.

Muestra	1 Menos atractivo	2	3	4	5 Más atractivo

SABOR ÁCIDO

Su tarea consiste en indicar el grado de acidez de cada una de las muestras. Introduzca la cuchara en el vinagre. Sobre la línea horizontal trace una línea vertical en aquel punto que mejor represente su estimación acerca del atributo; sobre aquella anote el código de la muestra. Es importante que en la línea horizontal marque la acidez que estime ideal para el producto.

A**B**

Demasiado débil

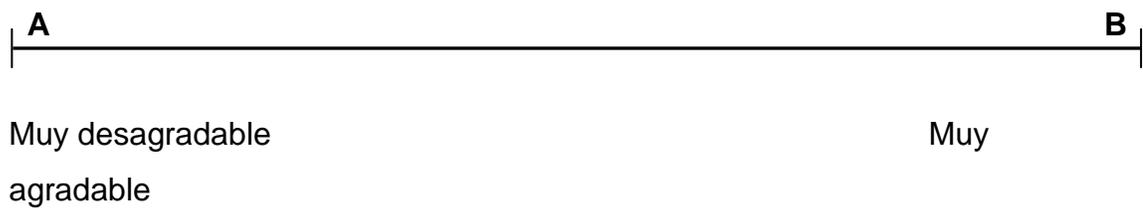
Falta de acidez

Demasiado intenso

Exceso de acidez

NIVEL DE AGRADO DEL SABOR ÁCIDO

Proceda a evaluar el nivel de agrado o desagrado que le provoca el sabor ácido de cada una de las muestras, bajo condiciones normales de consumo del vinagre, esto es utilizando ensalada de lechuga. Sobre la línea horizontal trace una línea vertical en aquel punto que mejor represente su estimación acerca del atributo, recuerde anotar el código de la muestra.



IMPRESION GENERAL

Evalúe las muestras de vinagre con la ensalada de lechuga y coloque la calificación que mejor represente su opinión.

Calificación	Muestras					
1. Muy malo						
2. Malo						
3. Regular						
4. Bueno						
5. Excelente						

COMENTARIOS:

ANEXO 2

Valores de recuento viable en placa sobre medio estándar de crecimiento GYC.

Tiempo (días)	UFC/mL (Ensayo 1)	UFC/mL (Ensayo 2)
0	1,07E+03	2,20E+03
1	1,11E+04	4,30E+04
2	1,26E+05	8,70E+05
3	2,25E+06	6,30E+06
4	5,90E+07	7,89E+07
5	1,87E+07	7,90E+08
6	8,90E+06	2,54E+07
7	1,03E+06	3,70E+06
8	2,30E+05	4,20E+06
9	2,17E+04	4,90E+04
10	1,30E+04	2,30E+04
11	1,00E+03	1,70E+03

ANEXO 3

Evolución de la concentración de biomasa y acidez acética para el inóculo madre de vinagre de arándanos

Tiempo (días)	acidez acética% (ensayo 1)	acidez acética% (ensayo 2)	Promedio acidez acética %p/v	UFC/ mL (Ensayo1)	UFC/mL (Ensayo 2)	Promedio UFC/mL
0	4,180	4,260	4,220	7,96E+05	6,45E+04	4,30E+05
1	4,260	4,140	4,200	7,00E+06	6,58E+05	3,83E+06
2	4,357	4,390	4,373	6,30E+06	7,50E+06	6,90E+06
3	4,456	4,680	4,568	6,70E+07	7,90E+07	7,30E+07
4	5,480	5,420	5,450	9,80E+07	1,20E+08	1,09E+08
5	5,280	5,480	5,380	5,50E+06	1,80E+07	1,18E+07
6	5,340	5,550	5,445	4,92E+05	3,50E+05	4,21E+05

ANEXO 4

Valores de la concentración de ácido acético y etanol por tratamiento.

Tratamiento	Tpo (días)	HAc (g/L)	Etanol (g/L)	Tratamiento	Tpo (días)	HAc (g/L)	Etanol (g/L)
T 1	0	24,24	40,21	T3	10	36,60	23,78
T 1	1	25,08	33,10	T3	11	38,79	12,89
T 1	2	28,44	28,70	T3	12	39,20	8,96
T 1	3	33,24	26,30	T3	13	40,01	0,65
T 1	4	38,50	24,10	T4	0	27,60	52,15
T 1	5	40,15	10,99	T4	1	28,80	48,22
T 1	6	42,96	1,28	T4	2	32,16	45,78
T 1	7	23,52	43,69	T4	3	35,40	31,22
T 1	8	24,84	35,33	T4	4	40,08	14,03
T 1	9	26,40	27,83	T4	5	45,64	0,29
T 1	10	34,00	24,56	T4	6	25,40	49,20
T 1	11	37,12	21,53	T4	7	28,00	47,89
T 1	12	39,32	12,12	T4	8	31,25	38,54
T 1	13	42,00	1,45	T4	9	34,99	32,58
T2	0	30,84	48,86	T4	10	39,89	16,14
T2	1	32,04	36,15	T4	11	45,04	0,86
T2	2	33,84	26,07	T5	0	26,52	44,06
T2	3	35,76	23,49	T5	1	28,44	39,30
T2	4	37,92	18,17	T5	2	30,72	36,68
T2	5	40,10	12,38	T5	3	33,00	34,56
T2	6	45,96	1,26	T5	4	35,40	13,61
T2	7	27,89	49,31	T5	5	41,20	0,58
T2	8	29,76	35,15	T5	6	21,36	43,60
T2	9	32,28	30,18	T5	7	23,04	40,65
T2	10	34,68	25,13	T5	8	25,08	37,63
T2	11	35,52	15,46	T5	9	28,44	33,60
T2	12	41,20	9,87	T5	10	37,80	14,58
T2	13	43,21	1,12	T5	11	43,00	0,75
T3	0	26,88	36,12	T6	0	24,24	35,42
T3	1	33,36	30,25	T6	1	29,64	29,08
T3	2	37,44	26,78	T6	2	35,40	15,31
T3	3	37,92	25,12	T6	3	42,00	3,02
T3	4	38,64	18,14	T6	4	44,52	0,00
T3	5	43,80	10,63	T6	5	24,84	35,31
T3	6	44,12	1,87	T6	6	26,04	22,87
T3	7	24,00	35,04	T6	7	37,56	12,76
T3	8	26,80	33,15	T6	8	41,06	4,05
T3	9	32,52	29,63	T6	9	44,76	0,12

ANEXO 5**Valores de rendimiento para T1 a T6 por ciclo (duplicado).**

Tratamiento	Rendimiento (%)
T1	85,13
T1	77,05
T2	74,73
T2	69,48
T3	98,87
T3	89,44
T4	70,62
T4	71,96
T5	73,04
T5	77,37
T6	96,41
T6	97,57

ANEXO 5.1

Análisis estadístico para Rendimiento fermentativo

Análisis de la Varianza para Rendimiento

Fuente	SC	GL	CM	F	Valor p
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Etanol	1232,52	2	616,261	37,40	0,0004
B:Aireación	4,23641	1	4,23641	0,26	0,6302
INTERACCIONES					
AB	38,6993	2	19,3496	1,17	0,3712
RESIDUOS	98,862	6	16,477		
TOTAL (corr.)	1374,32	11			

Test de comparación múltiple para Rendimiento según Etanol

Método: HSD de Tukey, 95,0 %

Etanol	Recuento	Media	Sigma	Grupos Homogéneos
12	4	71,5475	3,56838	X
10	4	78,1475	3,56838	X
8	4	95,5725	3,56838	X

ANEXO 5.2

Análisis de regresión múltiple para variable rendimiento.

Variable dependiente: Rendimiento

Análisis de Regresión Múltiple

Variable dependiente: Rendimiento

Parámetro	Estimación	Error estándar	Estadístico T	Valor-p
CONSTANTE	144,393	10,6952	13,5008	0,0000
Etanol	-6,00625	0,865387	-6,94054	0,0001
Aire	-3,96111	9,42114	-0,420449	0,6840

Análisis de Varianza

Fuente	SC	GL	CM	F	Valor p
Modelo	1158,64	2	579,319	24,17	0,0002
Residuo	215,682	9	23,9646		
Total (Corr.)	1374,32	11			

ANEXO 6

Valores de velocidad de acetificación (p) para T1 a T6 (g de ácido acético/100 mLh).

Tratamiento	Etanol	Aire	p	Tratamiento	Etanol	Aire	p
T1	10	0,5	0,0035	T 3	8	0,5	0,0170
T1	10	0,5	0,0140	T 3	8	0,5	0,0091
T1	10	0,5	0,0200	T 3	8	0,5	0,0017
T1	10	0,5	0,0219	T 3	8	0,5	0,0034
T1	10	0,5	0,0069	T 4	12	0,8	0,0050
T1	10	0,5	0,0117	T 4	12	0,8	0,0140
T1	10	0,5	0,0055	T 4	12	0,8	0,0135
T1	10	0,5	0,0065	T 4	12	0,8	0,0195
T1	10	0,5	0,0317	T 4	12	0,8	0,0315
T1	10	0,5	0,0130	T 4	12	0,8	0,0108
T1	10	0,5	0,0092	T 4	12	0,8	0,0135
T1	10	0,5	0,0112	T 4	12	0,8	0,0156
T 2	12	0,5	0,0050	T 4	12	0,8	0,0204
T 2	12	0,5	0,0075	T 4	12	0,8	0,0215
T 2	12	0,5	0,0080	T 5	10	0,8	0,0080
T 2	12	0,5	0,0090	T 5	10	0,8	0,0095
T 2	12	0,5	0,0091	T 5	10	0,8	0,0095
T 2	12	0,5	0,0244	T 5	10	0,8	0,0100
T 2	12	0,5	0,0078	T 5	10	0,8	0,0242
T 2	12	0,5	0,0105	T 5	10	0,8	0,0070
T 2	12	0,5	0,0100	T 5	10	0,8	0,0085
T 2	12	0,5	0,0035	T 5	10	0,8	0,0140
T 2	12	0,5	0,0237	T 5	10	0,8	0,0390
T 2	12	0,5	0,0084	T 5	10	0,8	0,0217
T 3	8	0,5	0,0270	T 6	8	0,8	0,0225
T 3	8	0,5	0,0170	T 6	8	0,8	0,0240
T 3	8	0,5	0,0020	T 6	8	0,8	0,0275
T 3	8	0,5	0,0030	T 6	8	0,8	0,0105
T 3	8	0,5	0,0215	T 6	8	0,8	0,0050
T 3	8	0,5	0,0013	T 6	8	0,8	0,0480
T 3	8	0,5	0,0117	T 6	8	0,8	0,0146
T 3	8	0,5	0,0238	T 6	8	0,8	0,0154

ANEXO 6.1

Análisis estadístico para velocidad de acetificación.

Análisis de Varianza para Velocidad de acetificación

Fuente	SC	GL	CM	F	Valor p

EFECTOS PRINCIPALES					
A:Etanol	0,000059	2	0,000029	0,36	0,6978
B:Aire	0,000511	1	0,000511	6,20	0,0156
RESIDUOS	0,00495	60	0,000082		

TOTAL (CORR)	0,0055	63			

Test de Comparación múltiple (Tukey, 95%) para velocidad de acetificación por factor aireación

Aire	Recuento	Media	Sigma	Grupos Homogéneos
0,5	36	0,01168	0,00151	X
0,8	28	0,01738	0,00172	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites		

0,5 - 0,8	*-0,00570	0,00458		

* Diferencia estadísticamente significativa.