

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA DE INGENIERIA EN ALIMENTOS

**Elaboración de Vinagre a partir de Vino de Arándano  
(*Vaccinium corymbosum* L.)**

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

**Paola Andrea Müller Macías**

VALDIVIA – CHILE

2005

**PROFESOR PATROCINANTE**

Fernando Figuerola R.  
Ing. Agrónomo., M. Sc. Food Science  
Instituto de Ciencia y Tecnología de  
los Alimentos

---

**PROFESOR INFORMANTE**

Marcia Costa L.  
Ingeniero Civil Bioquímico  
Instituto de Ciencia y  
Tecnología de los Alimentos

---

**PROFESOR INFORMANTE**

Haroldo Magariños  
Técnico Lechero  
Magíster en Ciencia y Tecnología de la Leche  
Instituto de Ciencia y Tecnología de  
los Alimentos

---

***Por la confianza, el esfuerzo y sobre todo el apoyo incondicional, le dedico este logro con mucho amor a mis padres.***

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer a Dios y por supuesto agradecer a mis padres, hermanos y en especial a mi hijo Vicente, quien ha sido el que me ha dado la fuerza para seguir adelante y terminar con esta etapa de mi vida tan anhelada.

Agradecer a mi profesor Fernando Figuerola, por su apoyo, comprensión y respaldo durante la realización de mi tesis. A mis profesores informantes Haroldo Magariños y Marcia Costa por su ayuda y colaboración.

Al ICYTAL, por facilitarme los laboratorios, donde lleve acabo el trabajo experimental de la presente investigación. Agradecer al profesor Fernando Asenjo, a la profesora Sade y a los auxiliares, en especial a Don José.

Agradecer a mi incondicional amiga Pamela y a su familia, particularmente al tío Alejandro y a la tía Laura, quienes siempre me tendieron una mano a lo largo de mi carrera, principalmente durante la realización de mi tesis donde me acogieron en su casa como una integrante más de la familia, gesto que jamás olvidaré.

A mis amigos Daniela, Osvaldo y Olivia, por brindarme su amistad, cariño y apoyo en los buenos y malos momentos que tuve durante el transcurso de mi carrera. Finalmente agradecer a todos mis compañeros que de algún otro modo me ofrecieron su amistad.

## ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Vino	3
2.1.1	Vino de frutas	3
2.1.2	Aspectos generales de la fermentación alcohólica	4
2.2	Vinagre	5
2.2.1	Características generales del vinagre	5
2.2.2	Factores que intervienen en la fermentación acética	6
2.2.3	Usos del vinagre	7
2.2.4	Aspectos generales del vinagre de fruta	8
2.2.5	Reacciones típicas para la obtención de vinagre de frutas	8
2.2.6	Características de los microorganismos responsables del vinagre	9
2.3	Sistemas de fermentación acética	11
2.3.1	Fermentación en cultivo superficial	11
2.3.2	Fermentación en cultivo sumergido	12
2.4	Arándano	14
2.4.1	Características generales del arándano	14
2.4.2	Composición química del fruto	15
2.4.3	Situación del arándano en Chile	16
2.4.4	Usos e industrialización del arándano	17

2.4.5	Beneficios que aporta el arándano ( <i>Vaccinium corymbosum L</i> )	18
3	MATERIAL Y MÉTODÒ	20
3.1	Lugar de ensayo	20
3.2	Materiales y equipos	20
3.2.1	Materia prima	20
3.2.2	Microorganismo iniciador de la fermentación	20
3.2.3	Disponibilidad de equipos y materiales	20
3.3	Método	21
3.3.1	Aislamiento del microorganismo	21
3.3.1.1	Pruebas bioquímicas	21
3.3.1.2	Pruebas fisiológicas	21
3.3.2	Preparación del inóculo madre	22
3.3.3	Metodología utilizada para la obtención de vinagre de arándano	23
3.3.3.1	Sustrato	24
3.3.3.2	Fermentación acética	24
3.3.3.3	Clarificación	24
3.3.3.4	Filtración	25
3.3.3.5	Envasado	25
3.3.3.6	Pasteurización	26
3.3.3.7	Almacenamiento	26
3.3.4	Diseño experimental	26
3.3.5	Mediciones a realizar	27
3.3.5.1	Determinación de la acidez total	27
3.3.5.2	Determinación de pH	27
3.3.5.3	Determinación del alcohol residual	27
3.3.5.4	Determinación de rendimiento	27

3.3.5.5	Determinación del contenido de antocianinas	27
3.3.5.6	Evaluación sensorial de las características organolépticas del vinagre	27
3.3.6	Análisis de datos	29
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	30
4.1	Microorganismo iniciador de la fermentación acética	30
4.2	Acetificación	32
4.3	Rendimiento	35
4.4	Contenido de antocianinas	38
4.5	Evaluación sensorial	41
4.5.1	Intensidad del aroma	41
4.5.2	Color	43
4.5.3	Sabor ácido	44
4.5.4	Nivel de agrado del sabor ácido	45
4.5.5	Impresión general	45
5	CONCLUSIONES	48
6	RESUMEN	50
	SUMMARY	51
7	BIBLIOGRAFÍA	52
	ANEXOS	58

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Composición química del arándano	16
2	Superficie regional de arándanos	17
3	Medios de cultivo para el aislamiento y conservación de las bacterias acéticas	23
4	Especificaciones del cromatógrafo de gases	29
5	Resultados de las pruebas bioquímicas y fisiológicas, efectuadas al microorganismo iniciador del proceso de fermentación acética del vino de arándano	31
6	Rendimientos (%) para cada tratamiento en la fermentación acética	36
7	Resultados del contenido de antocianinas de la materia prima clarificada y sin clarificar, utilizada al inicio de cada tratamiento	38
8	Resultados del contenido de antocianinas para cada tratamiento, al finalizar la fermentación acética	39
9	Valores de los resultados promedio de los atributos: intensidad del aroma, color, sabor ácido, nivel de agrado del sabor ácido e impresión general de los tratamientos	42



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Clasificación de bacterias acéticas	10
2	Arándano ( <i>Vaccinium corymbosum</i> L.)	15
3	Sistema implementado para la fermentación acética	25
4	Diagrama de elaboración del vinagre de arándano	28
5	Crecimiento de <i>Gluconobacter ssp.</i>	32
6	Evolución de la concentración de acidez acética en el tiempo	33
7	Evolución de la concentración de etanol en el tiempo	33
8	Rendimientos para cada tratamiento de vinagre	37
9	Contenido de antocianinas entre materia prima y los tratamientos	40
10	Resultados del atributo intensidad del aroma de cada tratamiento	43
11	Resultados del atributo color de cada tratamiento	44
12	Resultados del atributo sabor ácido de cada tratamiento	46
13	Resultados del nivel de agrado del sabor ácido de cada tratamiento	47
14	Resultados de la impresión general de cada tratamiento	47

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Planilla de evaluación sensorial para los vinagres	59
2	Resultados de las concentraciones de ácido acético y de alcohol residual (g/L) de los tratamientos correspondientes al diseño	62
3	Rendimientos (%), obtenidos en los dos ciclos de cada tratamiento al finalizar la fermentación acética	63
4	Contenido de antocianinas (mg/L) de cada tratamiento al término de la fermentación acética	64
5	Resultados de la evaluación sensorial	65

## 1. INTRODUCCIÓN

El vinagre es esencialmente una solución de ácido acético elaborado por fermentación, a partir de diversos sustratos alcohólicos. Muchos jugos de frutas se prestan para la fermentación alcohólica si contienen la proporción apropiada de azúcar, otorgando aromas y sabores característicos de la fruta empleada.

Se conoce que el vinagre fue usado en Babilonia 5.000 años antes de Cristo. En algunos países, como Francia el vinagre era hecho de uvas para el consumo del hogar y para la exportación, en Inglaterra el vinagre era hecho de malta, en América no se sabe con certeza cuando aparece, pero debió ser muy temprano como un producto del hogar y en los Estados Unidos, el jugo de manzana se usa en gran medida para este fin.

El vinagre puede ser utilizado de diversas formas, es decir, como: condimento, preservante natural, agente medicinal, elemento de limpieza; el vinagre se utiliza en cualquier medio donde se requiera de un acidulante natural, no obstante, el vinagre de vino se considera actualmente como un condimento muy apreciado por los países de la cuenca del mediterráneo, por tratarse de un producto especial ya que posee características organolépticas superiores a otros tipos de vinagre elaborados a partir de distintas materias primas.

En el caso de la presente investigación, la materia prima a utilizar para la elaboración de vinagre corresponde a un vino de frutas, específicamente de arándano (*Vaccinium corymbosum L.*), de esta manera se pretende obtener un producto natural, con un color y sabor característico a la fruta y que aporte beneficios para la salud.

La hipótesis planteada es la siguiente.

El grado alcohólico de la materia prima (vino de arándano) y el grado de clarificación afectan el proceso de fermentación acética, además de incidir directamente en las características químicas y organolépticas del producto final.

El objetivo general de este trabajo fue la elaboración de vinagre a partir de vino de arándano, cuya finalidad fue obtener un producto, de buena calidad, saludable y atractivo al consumidor.

Los objetivos específicos para este trabajo fueron los siguientes:

- Aislar un microorganismo que permitiera la elaboración del vinagre, a partir de diferentes sustratos madres obtenidos en la X región.
- Cuantificar el efecto del grado alcohólico del vino materia prima, sobre el rendimiento del vinagre.
- Analizar el efecto de la clarificación sobre la calidad y eficiencia del proceso en la producción de vinagre.
- Implementar un sistema de elaboración de vinagre de arándano, que proporcionara un producto con características similares a un vinagre tradicional.
- Realizar una evaluación sensorial, con el fin de caracterizar el producto y observar la aceptabilidad de dicho producto por el panel.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Vino

El vino es una bebida que se obtiene del jugo de uva, el que es sometido a un proceso fermentación alcohólica mediante la presencia de levaduras (CHRISTAKI y TIZA, 2002).

El mismo autor señala, que todos los vinos son elaborados a partir de un proceso común, con variaciones dependiendo del tipo de vino que se procesará.

Las variedades y los nombres de los vinos son muy numerosos, reflejan su región de origen y las variedades de uvas empleadas en su elaboración (POTTER y HOTCHKISS, 1999).

La graduación alcohólica, la acidez, la fracción aromática y polifenólica, así como el color son los parámetros más importantes que definen la calidad de un vino, siendo lógico que estos mismos parámetros sean los que se utilicen en la valoración de la calidad de la uva (ALADREN y CRESPO, 1999).

Sea cual sea el modo de vinificación buscado, concretamente si se trata de elaborar vinos tintos o blancos, el mosto de uva, producto obtenido tras el prensado de los granos de uva, constituye un excelente medio de cultivo para las levaduras (BELTRAN, 1994).

**2.1.1 Vino de frutas.** El vino de frutas se define como una bebida que proviene de mostos de frutas frescas, distintos de la uva, sometidos a la fermentación alcohólica y que han sufrido procesos semejantes a los exigidos para los vinos (BERNAL DE RAMIREZ, 1993).

Un vino de frutas debe ser agradable al paladar y debe consumirse con moderación. Un vino de frutas tiene que saber a la fruta de la que está hecho, debe mantener el aroma fresco y agradable que caracteriza a esta fruta (DONATH, 1992).

Según el mismo autor, una condición indispensable para elaborar un buen vino de frutas, es que éste se realice con frutas sanas y maduras, desechando las frutas podridas o en mal estado.

Entre las frutas utilizadas en la elaboración de vinos de frutas por fermentación, se encuentran: manzanas, cerezas, grosellas, peras, ciruelas y fresas, y frutos salvajes, como arándanos y moras (ARTHEY y ASHURT, 1996).

**2.1.2 Aspectos generales de la fermentación alcohólica.** Se puede definir la fermentación alcohólica como el proceso bioquímico por el cual las levaduras transforman los azúcares del mosto en etanol y CO<sub>2</sub>. Para que la fermentación tenga lugar, el mosto debe hallarse en condiciones de limitación de oxígeno (MESAS y ALEGRE, 1999).

La fermentación alcohólica es conducida generalmente por las levaduras que pertenecen al género *Saccharomyces* y a la especie *cerevisiae*. Industrialmente estas levaduras son organismos altamente especializados (QUEROL *et al.*, 2003).

El dulzor y el contenido de alcohol de los vinos están interrelacionados porque la fermentación convierte los azúcares de la uva en etanol. A medida que se va produciendo alcohol, el dulzor disminuye y una vez que el vino no presenta dulzor teóricamente todo el azúcar ha sido fermentado y se dice que es un vino seco. Los vinos secos contienen todo el alcohol que la uva en cuestión es capaz de proporcionar bajo las condiciones de fermentación, y que generalmente es de 12-14% de alcohol en volumen (POTTER y HOTCHKISS, 1999).

Desde el punto de vista organoléptico, el aroma del vino es el resultado de una compleja combinación de componentes que proporcionan a cada vino distintas características. Una gran fracción de componentes aromáticos son producidos durante la fermentación alcohólica (MALLOUCHOS *et al.*, 2003).

## **2.2 Vinagre**

El vinagre es definido como “un líquido ajustado para el consumo humano, elaborado a partir de materias primas de origen agrícola, que contenga almidón, azúcar o almidón y azúcares mediante el 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).

**2.2.1 Características generales del vinagre.** El vinagre es el producto de dos fermentaciones, como se señala en 2.2. En la primera fermentación las levaduras, usualmente del género *Saccharomyces*, convierten el azúcar en etanol anaeróticamente, mientras que en la segunda fermentación el etanol es oxidado a ácido acético aeróticamente por bacterias del género *Acetobacter* (ADAMS y MOSS, 2000).

Existe una gran variedad de tipos de vinagre como por ejemplo de vino, de frutas, de vino envejecido, de sidra, de alcohol, etc. LLAGUNO y POLO (1991), señalan que es necesario cumplir con ciertos requisitos para que la fermentación acética se lleve a cabo sin problemas utilizando vino como materia prima, a saber:

- Los vinos utilizados como materia prima han de ser sanos y potables, libres de olores y sabores extraños.
- Además deben ser secos, sin restos de azúcares que puedan provocar contaminaciones posteriores con levaduras.
- En cuanto a su graduación alcohólica, tradicionalmente se ha considerado que los vinos utilizados en la acetificación habían de ser de baja graduación. En la

actualidad, sin embargo las técnicas de fermentación permiten utilizar vinos con graduación alcohólica de 8 a 12% v/v.

El vinagre es considerado tradicionalmente como un producto industrial secundario, sin embargo existe una diversidad de productos que contienen vinagre (salsas, ketchup, mayonesa, etc) (DE ORY *et al.*, 2002).

**2.2.2 Factores que intervienen en la fermentación acética.** Los principales factores que intervienen en la fermentación acética son el tipo y la densidad de bacterias presentes, la temperatura, la concentración de etanol, de ácido acético y la de oxígeno disuelto. Otro posible factor que puede afectar la acetificación es la presencia de nutrientes, sin embargo, en el caso de la fabricación del vinagre de vino de uva no es preciso tener en cuenta su adición, ya que tales nutrientes se encuentran en cantidades suficientes en los vinos empleados como materia prima (LLAGUNO y POLO, 1991).

Las óptimas condiciones de fermentación se refieren a la adquisición de información sobre el crecimiento bacteriano y los procesos de fermentación automatizados (TESFAYE *et al.*, 2002).

El mismo autor señala, que la evaporación de los componentes volátiles, es una de las causas de disminución del rendimiento durante el proceso de fermentación acética, incluyendo el sustrato (etanol), el intermediario (acetaldehído), así como el producto final (ácido acético).

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).

Las condiciones del inóculo, es un parámetro importante para una óptima fermentación. El cultivo selectivo de bacterias acéticas debe estar en fase exponencial de crecimiento, con una concentración de biomasa total, del orden de  $500 \times 10^6$  ufc / mL, de acuerdo a (DE ORY *et al.*, 2002).



La temperatura de operación óptima que se utiliza para la fermentación acética, se encuentra entre el rango de 30-31° C, la cual puede ser suministrada, en la mayoría de los casos por un intercambiador de calor interno, conectado a un termostato (DE ORY *et al.*, 2004a).

Temperaturas menores a 26° C favorecen a una fermentación más lenta, altas temperaturas, sobre 34° C aceleran la evaporación del alcohol, ácido acético y sustancias volátiles que contribuyen a las características del sabor y aroma del vinagre (WEISER, 1962).

La calidad final del vinagre está determinada por el sistema de acetificación efectuado, materia prima, el sustrato y eventualmente por el periodo de envejecimiento o maduración en barriles de madera (TESFAYE *et al.*, 2002).

**2.2.3 Usos del vinagre.** El vinagre puede ser usado en muchas formas. A veces se piensa que sólo es utilizado en la cocina como acompañante de las ensaladas, sin embargo, es posible usarlo de distintas maneras como <sup>1</sup>

- Resaltador del sabor o condimento
- Preservante natural, evita la contaminación bacterial de los alimentos
- Agente medicinal, ayuda como remedio casero en la prevención de enfermedades.
- Ingrediente versátil en la limpieza de muchos materiales en el hogar y en equipos utilizados en la industria de alimentos.
- Neutraliza los malos olores.

Por lo tanto, la fermentación acética es usada con el fin de dar una mayor seguridad a los alimentos, siendo el ácido acético bacteriostático o bactericida. Dependiendo de la concentración, el ácido acético es un fuerte preservante (STEINKRAUS, 1997).

---

<sup>1</sup> <http://www.proluxsa.com/spanish/elvinagre.html>

**2.2.4 Aspectos generales del vinagre de fruta.** El vinagre de manzana es el más reconocido, sin embargo cualquier fruta que produzca fermentación alcohólica es buena para elaborar este producto, siendo posible obtener variedad de sabores a partir de una gran cantidad de materias primas, tales como: uvas, peras, ciruelas, naranja, berries, miel, azúcar, almidón hidrolizado, cerveza y vino (WEISER, 1962).

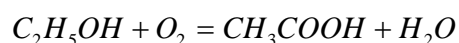
Un vinagre de buena calidad, es aquel que se elabora a partir de una fruta sana y madura. Las frutas son mecánicamente molidas y prensadas, para obtener el jugo dulce debido a la cantidad de carbohidratos presentes, especialmente la dextrosa. El jugo es puesto en contenedores llamados fermentadores. Una fermentación espontánea puede tomar lugar en corto tiempo debido a los microorganismos transientes, los cuales normalmente están presentes en el producto (WEISER, 1962).

**2.2.5 Reacciones típicas para la obtención de vinagre de frutas.** Según WOOD (1985), normalmente las levaduras usadas en la fermentación alcohólica, pertenecen al género *Saccharomyces* y a la especie *cerevisiae* y la transformación del azúcar por esta levadura puede ser representada químicamente en la siguiente reacción:



La oxidación del etanol por *Acetobacter* se realiza en dos etapas, en la primera etapa se oxida el etanol a acetaldehído y en la segunda el acetaldehído a ácido acético (LLAGUNO y POLO, 1991).

Lo cual es representado en la siguiente reacción (WEISER, 1962).



La concentración de alcohol entre 10 y 13% es la necesaria para una buena fermentación. Si el contenido de alcohol fuese mucho más alto que 13%, el alcohol no es completamente oxidado a ácido acético. Con una baja

concentración de alcohol resulta una pérdida de rendimiento del vinagre debido a la oxidación del ácido acético (WEISER, 1962).

**2.2.6 Características de los microorganismos responsables del vinagre.** El organismo que está involucrado en la producción de ácido acético crece usualmente sobre el sustrato como una masa espesa gelatinosa, comúnmente conocida como sustrato madre (WEISER, 1962).

Los microorganismos que oxidan el etanol a ácido acético son comúnmente llamadas bacterias ácido acéticas. Estas bacterias son polimorfas. Son células Gram (-), que van de la forma elipsoidal a la alargada, rectas o ligeramente curvadas de 0,6 a 0,8  $\mu\text{m}$  de largo, encontrándose aisladas, en parejas o en cadenas (EBNER *et al.*, 1999).

Las bacterias acéticas 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  $\text{H}_2\text{S}$ . Oxidan el etanol a ácido acético y el acetato y el lactato a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . 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).

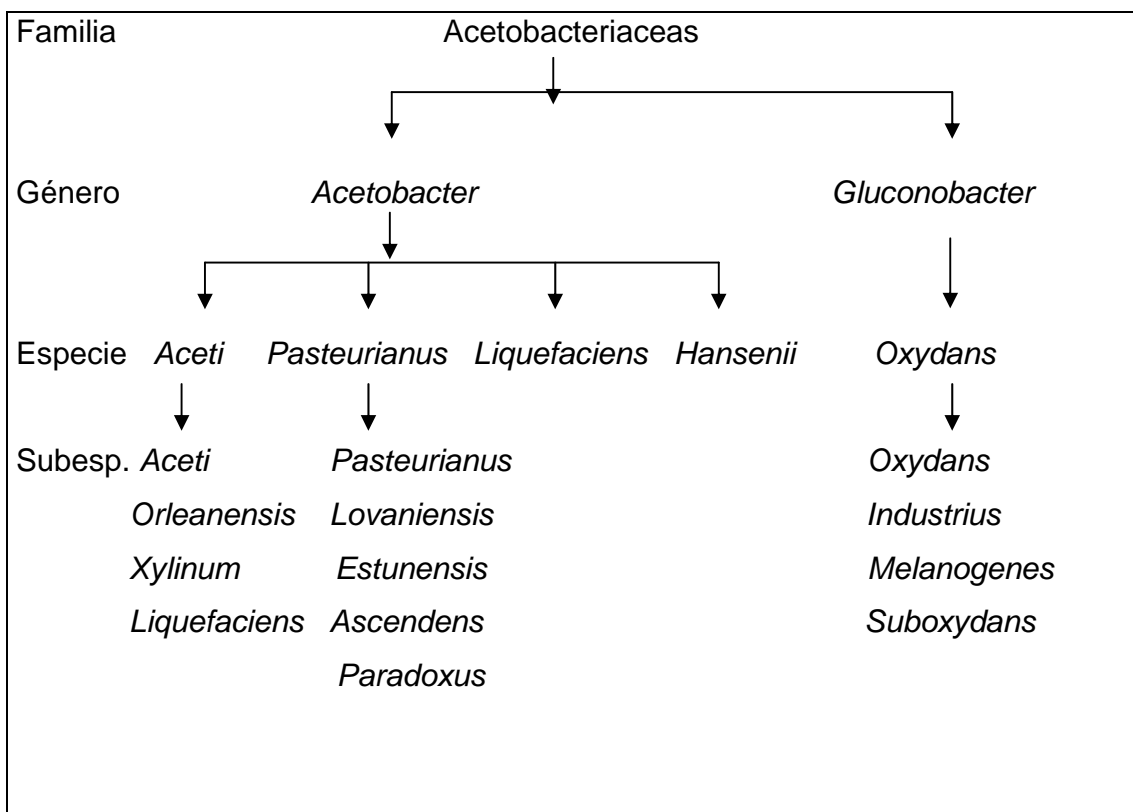
Según DE LEY *et al.* (1984), las bacterias ácido acéticas pertenecen a la familia Acetobacteraceas, cuya clasificación se aprecia en la FIGURA 1.

Muchos autores han demostrado que sepas del género *Acetobacter* y *Gluconobacter*, son capaces de transformar alcoholes en ácidos. Sin embargo, estudios sobre las óptimas condiciones de estas biotransformaciones son muy escasas y únicamente se enfocan en la producción de ácido acético (DRUAUX *et al.*, 1997).

La fermentación acética es el proceso bioquímico por el cual el *Acetobacter* oxida al etanol a ácido acético, que a su vez vuelve a ser oxidado a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ ,

mientras que el *Gluconobacter* no lleva a cabo esta doble oxidación (LLAGUNO y POLO, 1991).

El *Acetobacter* oxida al etanol más fuertemente que a la glucosa, mientras que el *Gluconobacter* oxida a la glucosa más fuertemente que al etanol. El *Acetobacter aceti* es la bacteria frecuentemente usada en la industria del vinagre, sin embargo, está demostrado que *Gluconobacter oxidans* es ventajosa para la producción de vinagre (TESFAYE *et al.*, 2002).



**FIGURA 1 Clasificación de bacterias acéticas.**

FUENTE: DE LEY *et al.* (1984).

Según estudios, el *Gluconobacter* predomina en el mosto fresco, ya que como su nombre lo indica prefiere un medio rico en azúcar, mientras que bacterias del género *Acetobacter* predominan durante la fermentación alcohólica (DU TOIT y LAMBRECHTS, 2002).

## 2.3 Sistemas de fermentación acética

A continuación se mencionan los siguientes sistemas de fermentación:

**2.3.1 Fermentación en cultivo superficial.** Esta fermentación se caracteriza porque las bacterias acéticas se encuentran en contacto directo con el oxígeno gaseoso, situadas bien en la interfase líquido / gas, también pueden estar fijadas a soportes de materiales tales como virutas de madera. En el caso de existir este tipo de soportes, el vino es rociado sobre las virutas, desarrollándose en la superficie bacterias acéticas. El vino cae por gravedad, retornado a la superficie mediante una bomba de recirculación, una vez que la concentración de alcohol llega a los 0°, se descargan aproximadamente 4/5 del volumen total del líquido. Lo anterior se realiza en un período de 7-10 días. La temperatura es controlada mediante un intercambiador de calor exterior refrigerado con agua, mediante la señal de un termostato y la entrada de aire es por arrastre del propio líquido. Sin embargo, este sistema presenta una serie de desventajas, como la pérdida de sustancias volátiles por evaporación del orden del 10%, el material de soporte, se contamina fácilmente, por lo que se debe limpiar periódicamente y reemplazado cada año por material nuevo y por ser definitivamente un proceso demasiado lento (LLAGUNO y POLO, 1991).

En el caso de encontrarse las bacterias acéticas en contacto directo con el oxígeno, el proceso se lleva a cabo de la siguiente manera: el vino es colocado en bandejas planas y las moscas del vinagre se encargan de inocularlo, formándose sobre la superficie una película continua, que se denomina “Madre del vinagre” o mycoderma aceti (SCHLEGEL, 1997).

Dentro de este sistema de fermentación se pueden mencionar algunos métodos específicos:

- **Método tradicional.** Este método se basa en la acetificación de mosto de cerveza y vino en barriles de madera semi-llenos dejados al aire libre con el fin de favorecer la oxidación del etanol a acético (LLAGUNO y POLO, 1991).

Las bacterias acéticas forman un fino film sobre la solución, obteniéndose una película gruesa y gelatinosa. Esta película puede contener gran cantidad de bacterias, conocida como "vinagre madre" (WEISER, 1962).

- **Método Orleáns.** Se trata del proceso más antiguo y el mejor para la producción de vinagre. Se utilizan barriles aproximadamente de 200 L de capacidad (WEISER, 1962).

Es el método conocido como superficial o estacionario, donde al estar la superficie del vino en contacto con el aire, se forma una capa turbia, procurando que no caiga al fondo del barril al renovar el contenido. Por lo tanto, se disponen de barriles medios llenos de vino que se dejan acetificar o se mezclan con vinagre turbio para acelerar el proceso (LLAGUNO y POLO, 1991).

Tras el desarrollo de la madre, todo el etanol ha sido transformado en ácido acético y de las 3/4 partes de vino acetificado, se renuevan 2/3 del medio, teniendo cuidado de conservar el velo superficial microbiano (BELTRÁN, 1994).

Según LLAGUNO y POLO (1991), para evitar la caída del velo de bacterias, el vino se añade a través de un tubo que llega al fondo del barril, conocido este proceso como método de "Orleáns modificado" .

**2.3.2 Fermentación en cultivo sumergido.** Los índices más rápidos de acetificación se alcanzan usando la acetificación sumergida en la cual las bacterias acéticas crecen suspendidas en un medio que sea oxigenado con aire. La fermentación en cultivo sumergido es muy eficiente y rápida, en proceso semicontinuo toman normalmente 24-48 h. Sin embargo requiere un control más cuidadoso que procesos más simples (ADAMS y MOSS, 2000).

Este sistema se basa en la presencia de un cultivo de bacterias sumergidas libremente en el seno del líquido a fermentar, en el que se introduce constantemente aire, desde la fase gaseosa a la fase líquida, en forma de burbujas y la temperatura es controlada por un refrigerante interno que actúa automáticamente (LLAGUNO y POLO, 1991).

Cuando el alcohol llega a 0, una parte de la fermentación líquida es descargada aproximadamente 40-45% del volumen del líquido y reemplazada por más materia prima con una concentración total baja de ácido acético, volviendo a las condiciones iniciales, multiplicándose rápidamente las bacterias (EBNER *et al.*, 1999).

Según LLAGUNO y POLO (1991), entre las ventajas de este sistema se puede mencionar:

- La pérdida de componentes volátiles se reduce a 3 - 5%.
- Se facilita la incorporación de sistemas automáticos para la carga y descarga del fermentador.
- Se consiguen temperaturas más uniformes eliminándose las zonas de calentamiento.
- La limpieza y mantenimiento es más ágil y eficaz.
- Es un sistema mucho más rápido.

Un método que utiliza la fermentación en cultivo sumergido es el siguiente.

- **Método Alemán o Método rápido.** En principios se utilizaba solamente un generador de madera previsto de un cilindro vertical. El tanque era llenado de dispositivos para permitir que la solución alcohólica escurra a través de las virutas. Es un proceso donde debía haber calor, por lo tanto se debía prevenir un aumento de la temperatura para no destruir las bacterias encargadas de la fermentación (WEISER, 1962).

Por los inconvenientes de temperatura difícilmente controlables, las pérdidas de alcohol por evaporación, rebaja notablemente los rendimientos. Es por esto que se comienza a renovar estos antiguos generadores de relleno por el acetificador Frings de madera con dispositivos de control de temperatura interna y suministrando aire continuamente. Luego se construyó el Acetator Frings de acero inoxidable. Mediante estudios, se observó que la obtención de vinagre en

acetificadores sin relleno, en cultivo sumergido, los rendimientos de la transformación del alcohol en ácido acético son más altos, de esta forma se va automatizando cada vez más este sistema con el fin de obtener el máximo rendimiento de vinagre en el menor tiempo posible, llegando a un sistema de acetificación en semicontinuo (LLAGUNO y POLO, 1991).

Otras investigaciones de 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 es totalmente automatizado y así garantiza una acetificación rápida y uniforme. La introducción de una nueva carga y descarga del vinagre terminado el 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.

## **2.4 Arándano**

Los arándanos corresponden a los llamados blueberries, pertenecen a la familia *Ericaceae* y al género *Vaccinium* (SUDZUKI, 2002).

El arándano es un frutal menor nativo de Norteamérica, considerado dentro del grupo de los berries, fue introducido en Chile a principios de la década de los ochenta (BUZETA, 1997).

**2.4.1 Características generales del arándano.** En cuanto a la morfología de los arándanos, es posible mencionar que se trata de arbustos rectos siempre verdes, con hojas alternas, enteras o cerradas, las flores axilares o terminales, en racimo y el fruto tiene forma de una baya esférica de color azul metálico (SUDZUKI, 2002). En la FIGURA 2, es posible observar el fruto del arándano en el arbusto.

El fruto del arándano requiere de 2 a 3 meses para madurar, dependiendo del tiempo, tipo de madera dejada en la poda y el cultivar. Si los frutos son



cosechados con coloración rosada, el proceso de maduración continuará pero la calidad de la fruta será inferior (BUZETA, 1997).

Los tipos de arándanos que existen son tres: el arándano “alto”, *Vaccinium corymbosum* L.; el arándano “ojo de conejo”, *V. ashei* R.; y el arándano “bajo”, *V. angustifolium*. El arándano alto fue la especie que primero se introdujo al cultivo a partir de selecciones provenientes de cruzamientos de *V. corymbosum* y *V. australe*. (1906 en EEUU) (BUZETA, 1997).

Comercialmente sólo se cultivan los arbustos altos (SUDZUKI, 2002).



**FIGURA 2** Arándano (*Vaccinium corymbosum* L.).

**2.4.2 Composición química del fruto.** A continuación en el CUADRO 1 es posible observar la composición química del arándano.

Los compuestos fenólicos abarcan un gran grupo de sustancias orgánicas, siendo los flavonoides un subgrupo importante, este subgrupo contiene a las antocianinas. Las antocianinas son las responsables de los colores de las plantas, que incluyen el azul, púrpura, violeta, rojo y naranja (POTTER y HOTCHKISS, 1999).

**CUADRO 1. Composición química del arándano.**

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
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 /100g)	
Carotenoides (ug/ 100g)	0,2 - 0,3
β Caroteno (ug/ 100g)	
Vitamina A (UI)	100
Acido ascórbico (ug /100g)	14
Componentes volátiles de significancia organoléptica	trans-2-hexanol

\*Sobre azúcar total.

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

**2.4.3 Situación del arándano en Chile.** El arándano conocido internacionalmente como blueberry, es un frutal que en los últimos años ha logrado posicionarse como un fruto de importancia. Ha contribuido a este desarrollo por lo menos, dos grandes fuerzas. Por una parte las características nutricionales del fruto, rico en vitaminas, minerales, bajas calorías y recientemente descubierta su alta proporción de antioxidantes. Esta imagen de

producto “sano” del arándano se potencia con la alta proporción de la producción mundial que es generado por frutales en estado silvestre. En resumen, las características propias del fruto son una fuerza importante que explicaría su expansión en el mercado mundial, siendo EEUU el principal productor de arándano <sup>2</sup>

La producción de arándanos se ha desarrollado básicamente durante la década de los 90, así la superficie de arándanos que era de aproximadamente 400 ha en la temporada 93/94 se ha quintuplicado a la temporada 2001/2002, llegando a las aproximadamente 2000 ha. Este crecimiento del arándano no ha sido igual en todas las regiones del país, ya que debido a los requerimientos agroclimáticos de este frutal, su desarrollo se ha focalizado en la zona centro sur del país. El CUADRO 2 muestra la distribución regional de las plantaciones de arándanos, al año 2001.

**CUADRO 2. Superficie regional de arándanos.**

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

FUENTE: ODEPA<sup>3</sup> (2001).

Es posible observar que el 77,1% de la superficie de arándanos se encuentra entre las regiones VIII y X siendo esta última la de mayor relevancia en cuanto superficie

**2.4.4 Usos e industrialización del arándano.** El principal consumo de este fruto se realiza en su estado fresco, en postres preparados, solo o en combinación con otros frutos. Variados son los productos elaborados a base de arándano, entre ellos es posible mencionar las bebidas de consumo masivo, productos tipo “snack” y productos deshidratados (BUZETA, 1997).

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

<sup>3</sup> <http://www.iris.cl/Articulos/Arandano/Default.htm>

Debido al jugo de su pulpa, se utiliza en la confección de salsas de cocina para carnes y pescados. El fruto puede transformarse en jaleas y confituras, como relleno de tartas y pasteles<sup>4</sup>

**2.4.5 Beneficios que aporta el arándano (*Vaccinium corymbosum* L).** El fruto del arándano tiene la capacidad de proteger y fortalecer las paredes de los pequeños vasos sanguíneos conocidos como capilares. Esto lo hace útil en el tratamiento y la prevención de venas varicosas, flebitis y hemorroides, al igual que en la prevención de problemas de la visión causados por la ruptura de pequeños vasos sanguíneos en los ojos. El arándano contiene además unas sustancias conocidas como antocianidinas que ayudan a fortalecer el colágeno. El colágeno es una proteína que es parte importante de los ligamentos, tendones y el cartílago. Las antocianidinas también combaten los estados inflamatorios y tienen importantes propiedades antioxidantes. Estas propiedades hacen al arándano útil en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de las articulaciones y de las encías<sup>5</sup>

El arándano es una fuente rica en antocianinas y antioxidantes para la dieta, existiendo muchos cultivares y especies nativas de estos berries con altos niveles, estos niveles de antocianinas varían según la estación y la localización de la planta (MOYER *et al.*, 2002).

Las antocianinas y polifenoles son componentes importantes en la calidad de los alimentos por su contribución en la apariencia, en el sabor y sobre todo porque son beneficiosos contra enfermedades (LEE *et al.*, 2002).

Por otra parte KONG *et al.* (2003) señalan que las antocianinas poseen conocidas propiedades farmacológicas que permiten su uso con fines terapéuticos. Con respecto a dichas propiedades existen muchas publicaciones sobre la actividad antioxidante *in vitro* de las antocianinas así como de otras de sus funciones, además de la correlación entre la actividad antioxidante y la

---

<sup>4</sup> [http://www.infoagro.com/frutas/frutas\\_tropicales/arandano.htm#5.VARIEDADES](http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/arandano.htm#5.VARIEDADES)

<sup>5</sup> [http://www.infoagro.com/frutas/frutas\\_tropicales/arandano.htm#5.VARIEDADES](http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/arandano.htm#5.VARIEDADES)

estructura química. Sin embargo, estos estudios aún son escasos comparados con los realizados a otros flavonoides.

Otros beneficios que aportan los arándanos, ya sean estos silvestres o cultivados, es que ayudan a reducir desórdenes en el tracto urinario y su actividad anticancerígena (SKREDE *et al.*, 2000).

Los arándanos son notificados por su alto contenido de ácido ascórbico, sin embargo, la mayor fuente de propiedades antioxidantes de estos frutos no está ligado al contenido de ácido ascórbico (SMITH *et al.*, 2000).

La capacidad antioxidante que poseen los arándanos se correlaciona con el contenido total de compuestos fenólicos y antocianos, mientras que la vitamina C contribuye en forma pequeña dentro de la capacidad antioxidante total (KALT *et al.*, 2000).

Por otra parte, es posible mencionar, que durante el tratamiento y control de descongelamiento, molienda, despectinización y prensado, pasos que corresponden al proceso de jugo concentrado de arándano, la pérdida de antocianinas y polifenoles es considerable. Es por ello que la actividad antioxidante del jugo concentrado es bastante baja con respecto al fruto entero, sin embargo, se observa que en los pasos de clarificación y concentración las pérdidas de antocianinas y polifenoles son bajas (LEE *et al.*, 2002).

### 3. MATERIAL Y MÉTODO

#### 3.1 Lugar de ensayo

El proceso y los análisis del vinagre se realizaron en los laboratorios del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL), de la Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad Austral de Chile.

#### 3.2 Materiales y equipos

Los materiales y equipos necesarios se nombran con detalle en la metodología utilizada para el desarrollo del producto, no obstante, ellos comprenden materiales de vidrio y plástico como; pipetas, placas petri, tubos de ensayo, matraces aforados, vasos precipitados, botellas de néctar, buretas, probetas, portaobjetos, mangueras, cubetas, pinza metálica, pastillas magnéticas, bandeja plástica, etc.

**3.2.1 Materia prima.** Para la obtención del vinagre de arándano, se utilizó como materia prima el vino de arándano, elaborado a partir de jugo de arándano y jugo concentrado del mismo. Lo anterior se llevó a cabo en los laboratorios del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

**3.2.2 Microorganismo iniciador de la fermentación.** Se realizó un aislamiento previo del microorganismo iniciador de la fermentación acética, perteneciente a bacterias de la familia Acetobacteraceae.

**3.2.3 Disponibilidad de equipos y materiales.** Los equipos y materiales que se usaron, fueron proporcionados por el lugar de ensayo.

### 3.3 Método

La metodología utilizada, para la elaboración del vinagre, desde el aislamiento del microorganismo iniciador hasta el producto terminado se puede observar en los siguientes pasos.

**3.3.1 Aislamiento del microorganismo.** Se comienza con el procedimiento a partir de una serie de vinagres madres, obtenidos de diferentes lugares de la zona (X Región).

Se sembró 100 µL de cada uno de los diferentes vinagres madres en superficie sobre placas con medio de cultivo selectivo, denominado medio GYC citado por DE LEY *et al.* (1984), cuya composición se presenta en el CUADRO 3, y se incubó en estufa (Gallenkamp Trilab) a 32° C por 48 horas. Al finalizar la incubación, las cepas se someten a pruebas bioquímicas y fisiológicas para la identificación de las bacterias acéticas.

**3.3.1.1 Pruebas bioquímicas.** Entre las pruebas bioquímicas más comunes, se encuentran:

- Catalasa. En portaobjeto, se extiende una porción de la cepa con aza previamente esterilizada y se agrega H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxigenada.
- Oxidasa. En papel filtro, se deposita una porción de la cepa con rastrillo y sobre ésta se agrega reactivo oxidasa.
- Tinción de Gram. Para esta tinción, se utiliza portaobjeto, donde se extiende una pequeña porción de la cepa. Luego se tiñe con: violeta genciana o cristal violeta, lugol (yodo-yodurada), alcohol acetona y finalmente fucsina.
- Indol. La bacteria se cultiva durante 48 h, en un caldo triptona con NaCl 0,5% y se utiliza reactivo de Kovacs para observar si se cumple o no la prueba.

**3.3.1.2 Pruebas fisiológicas.** Confirmadas las colonias con las pruebas bioquímicas, éstas son aisladas y sembradas nuevamente para ser sometidas a

las pruebas fisiológicas que confirman la presencia de bacterias acéticas. Entre las pruebas fisiológicas figuran:

- Formación de compuestos cetónicos a partir de glicerina. Se utiliza el medio de Carr, citado por DE LEY *et al.* (1984), cuya composición se encuentra en el CUADRO 3, se incuba a 28° C /48 h, y finalmente se agrega reactivo de Fehling A y B para la posterior identificación.
- Crecimiento en etanol. Se utiliza el medio de Frateur, citado por DE LEY *et al.* (1984), cuya composición esta descrita en el CUADRO 3.
- Formación de los ácidos 2-5 cetoglucónico y dicetoglucónico a partir de glucosa. El medio que se utilizó para ésta prueba fue el Frateur, citado por DE LEY *et al.* (1984), cuya composición es exactamente igual a la del medio GYC, pero sin la presencia de agar, por lo tanto se obtiene un medio líquido, el cual se siembra y se incuba a 28° C por 10 a 15 días.
- Identificación a nivel de género. Se utiliza el medio Carr, citado por DE LEY *et al.* (1984) con la presencia de verde de bromo cresol, su composición se observa en el CUADRO 3. En tubos de ensayo se reparten 6,5 mL del medio preparado, se esterilizan y luego se le agrega 1mL de etanol al 15% en H<sub>2</sub>O estéril. Se siembra e incuba a 28° C por 12 a 15 días.

**3.3.2 Preparación del inóculo madre.** La preparación de éste inóculo tiene por objetivo obtener finalmente un vinagre madre, para la posterior elaboración del producto en cuestión.

A continuación se describe dicha preparación.

- En un matraz (Erlenmeyer) de 1 litro previamente esterilizado y bajo campana, se agregan 200 mL de medio líquido GYC y las cepas acéticas ya identificadas, en una relación 1:1. Se lleva a estufa a 32° C por 48 h.
- Finalizada la incubación, se obtiene el inóculo madre.



**CUADRO 3. Medios de cultivo para el aislamiento y conservación de las bacterias acéticas.**

<b>GYC (g/L)</b>	<b>Frateur (g/L)</b>	<b>Carr (%)</b>	<b>Carr (%)</b>
Extracto de levaduras 10 (Difco)	Extracto de levaduras 10 (Difco)	Extracto de levaduras 3 (Difco)	Extracto de levaduras 3 (Difco)
Glucosa 100 (Merck)	Etanol 20 (Merck)	Glicerina 3 % v/v (W & S)	Verde de bromo cresol (2%) 0,1
CaCO <sub>3</sub> 20 (W & S)	CaCO <sub>3</sub> 20 (W & S)	-----	-----
Agar 15 (Merck)	Agar (Merck) 20	Agar (Merck) 2	Agar (Merck) 2

FUENTE: DE LEY *et al.* (1984).

- En las mismas condiciones, se prepara ahora el “vinagre madre“, pero en este caso, se incorporan a un matraz vino de arándano 10 % v/v de alcohol y el inóculo madre en la misma relación.
- El matraz con el vinagre madre se deja con agitación orbital, sobre un agitador magnético (Corning PC 351) a 150 rpm, con suministro de aire 0,5 vvm, medido con la ayuda de un rotámetro y manteniendo la temperatura en 30° C. A partir de éstas condiciones y una vez alcanzada la acidez total (método descrito más adelante), se obtiene el vinagre madre.
- Para seguir conservando el vinagre madre, se descarga la mitad de éste y se repone con vino de arándano con la misma graduación de alcohol y así sucesivamente, siempre que alcance la acidez total correspondiente

**3.3.3 Metodología utilizada para la obtención de vinagre de arándano.** Para el proceso de elaboración de vinagre de arándano, se toma como referencia a grandes rasgos el diseño de un acetificador de cultivo sumergido a escala de planta piloto, simulando las condiciones de un fermentador de 1 L (DE ORY *et al.*, 1998).

**3.3.3.1 Sustrato.** Como materia prima, se utiliza un vino de arándano que acaba de finalizar la fermentación alcohólica, es decir, sin sufrir ningún otro proceso. La fermentación alcohólica se llevó a cabo con dos tipos de levaduras y con distinto contenido de azúcar, por lo tanto se obtiene vinos con distinta graduación alcohólica. Una parte del vino es sometido a clarificación, mediante el uso de una enzima pectolítica (0,4 g/L) y el vino restante se utiliza sin clarificar.

**3.3.3.2 Fermentación acética.** Se opero un fermentador con modalidad batch y el método de fermentación que se ocupa es en cultivo aireado sumergido, utilizando ciclos. En la FIGURA 3, se aprecia el sistema completo.

- En un matraz, se mezclan el vinagre madre con 5% de acidez total, con el vino de arándano en relación 1:1. Posteriormente la mezcla se mantiene a una temperatura entre 30-31° C, ésta es controlada por un termostato marca ECS 57.

- La mezcla está en constante agitación orbital, gracias a la ayuda de un agitador magnético (Corning PC 351) a 150 rpm. Por otro parte, la mezcla necesita de un suministro de aire, lo que se logra mediante una bomba de aire, a través de una manguera conectada a un filtro de aire (lana de vidrio, pipeta). La cantidad de aire que se utilizó fue de 0,5 vvm (volumen / volumen minuto), por ejemplo (50 mL/min para 100 mL de sustrato), regulada por un rotámetro.

- Se inicia la fermentación acética, bajo todas las condiciones antes mencionadas y una vez que el vinagre alcanza la acidez acética total, se descarga la mitad de éste y se repone con vino fresco de arándano, de ésta manera comienza un nuevo ciclo.

**3.3.3.3 Clarificación.** Al final de cada ciclo de producción, el vinagre que se descarga presenta un grado de turbidez, por lo que es necesario realizar la clarificación que va a contribuir a la estabilidad del producto.

Existen diversos métodos para clarificar, entre ellos, la autoclarificación y floculación mediante agentes químicos. En este caso se utilizó una enzima pectolítica (0,4 g/L), la que permaneció durante 24 h dentro del vinagre para permitir de esta manera la floculación que favorece la sedimentación por gravedad de las partículas a eliminar y así se obtiene el sobrenadante limpio, junto con el sedimento que es separado por filtración.



**FIGURA 3 Sistema implementado para la fermentación acética.**

**3.3.3.4 Filtración.** La finalidad de la filtración fue separar los restos de fibra de la pulpa del vinagre mediante un material filtrante, existiendo diferentes grados de filtración, lo cual depende del diámetro de la partícula que es retenida. El sistema de filtración que se utilizó en este caso en particular, fue el uso de tierra diatomea (0,5 g/L) (Celite Chile S.A), como materia filtrante y papel filtro (Whatman N° 2) como soporte, mediante un kitazato, embudo Buchner y succión por medio de una bomba de vacío.

**3.3.3.5 Envasado.** Esta etapa es de gran importancia, porque el envase será el encargado de la presentación del producto final hacia los consumidores. El tipo

de envase que existe para este producto es el de vidrio y plástico, sin embargo, a pesar que el envase de vidrio tiene una mejor presentación, se utiliza el de plástico, ya que estudios han demostrado que tanto en la luz, como en la oscuridad, las variaciones en la intensidad de color son semejantes en los vinagres conservados en vidrio y en un tipo de material plástico (LLAGUNO y POLO, 1991).

El envase que se utilizó en este vinagre fue de vidrio, por una mejor presentación y porque se pasteurizó con posterioridad al envasado.

**3.3.3.6 Pasteurización.** La pasteurización es el tratamiento térmico, a través del cual se destruyen las bacterias y se inactivan las enzimas responsables de posteriores alteraciones del vinagre. Este tratamiento puede ser largo a baja temperatura o corto a alta temperatura. Este tratamiento para el caso de la presente investigación, se lleva a cabo a 65° C/5 min.

**3.3.3.7 Almacenamiento.** Como es costumbre, los vinagres se encuentran a temperatura ambiente y expuestos a la luz en el comercio, es por ello que en el caso de este vinagre se almacena a temperatura ambiente y en lugar seco.

Para una mejor comprensión del proceso, se presenta un diagrama de flujo de la elaboración del vinagre de vino de arándano, que se observa en la FIGURA 4.

**3.3.4 Diseño experimental.** El diseño experimental que se utilizó en esta investigación corresponde a un diseño factorial  $3^1 \times 2^1$ , lo que resulta un diseño con dos factores a tres y dos niveles respectivamente, obteniendo 6 tratamientos. El primer factor utilizado fue el grado alcohólico del vino de arándano, cuyos niveles son 8%, 10%, 12% v/v aproximadamente. El segundo factor considerado correspondió al vino clarificado y sin clarificar. Cada tratamiento se realizó en dos ciclos, siendo este el sistema tradicional de obtener vinagre, cada tratamiento se abrevia de la siguiente manera:

T1 = 8 % (v/v) ; vino clarificado

T4 = 8 % (v/v) ; vino sin clarificar

T2 = 10% (v/v) ; vino clarificado

T5 = 10% (v/v) ; vino sin clarificar

T3 = 12% (v/v) ; vino clarificado

T6 = 12% (v/v) ; vino sin clarificar

**3.3.5 Mediciones a realizar.** Las mediciones se realizarán una vez obtenido el vinagre.

**3.3.5.1 Determinación de la acidez total.** Por medio del método propuesto según (ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC), 1995).

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

**3.3.5.3 Determinación del alcohol residual.** Para esta determinación se utilizó cromatografía de gases (DE ORY *et al.*, 2004a).

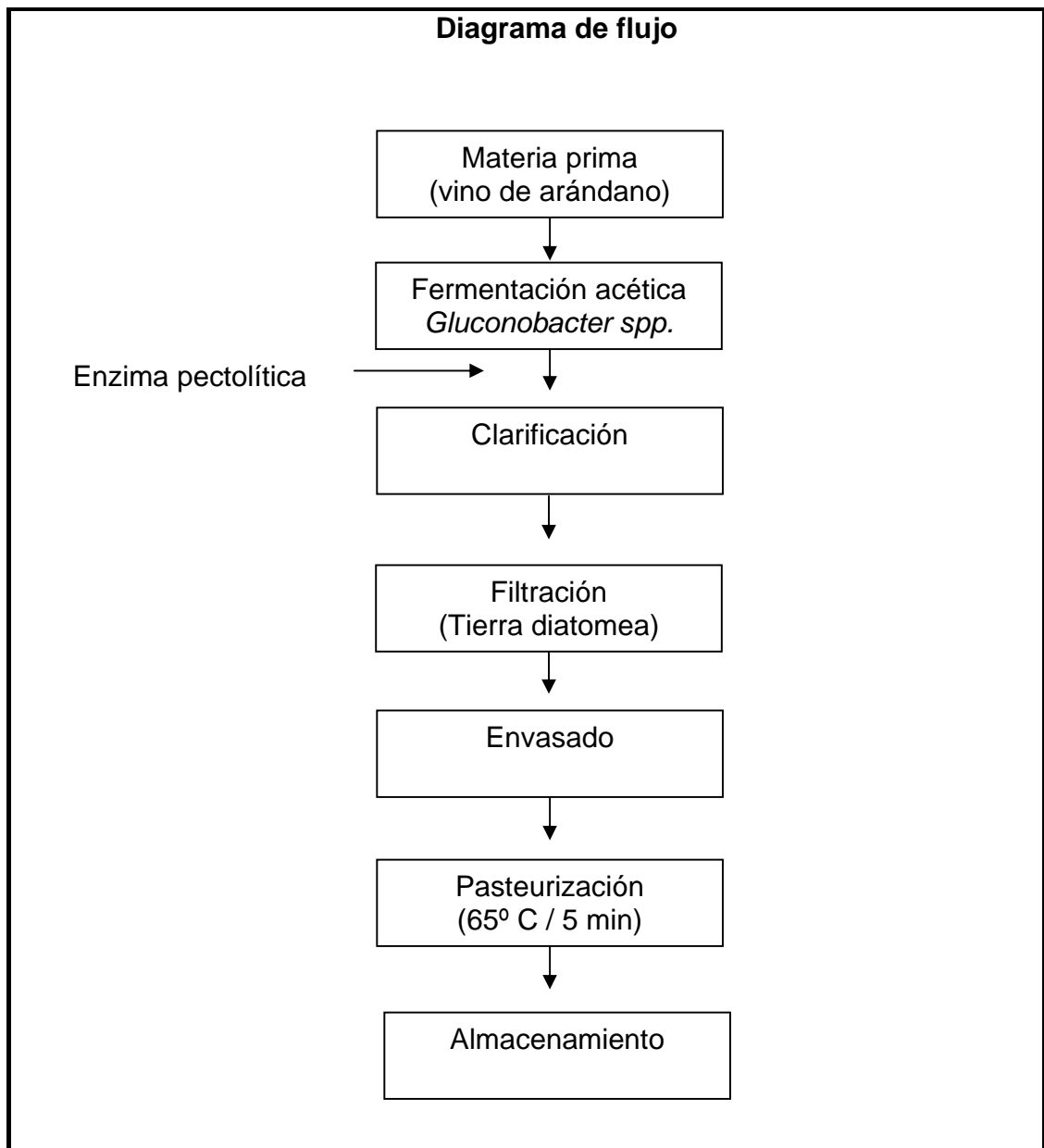
Se utiliza un cromatógrafo de gases Perkin - Elmer con un detector de ionización (FID), cuyas especificaciones se presentan en el CUADRO 4.

**3.3.5.4 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 (LLAGUNO y POLO, 1991).

**3.3.5.5 Determinación del contenido de antocianinas.** El contenido de antocianinas se determina mediante un método diferencial de pH (GIUSTI y WROLSTAD, 2002).

**3.3.5.6 Evaluación sensorial de las características organolépticas del vinagre.** Para la evaluación sensorial del producto, se utilizó un panel sensorial con 8 jueces, los cuales evaluaron los vinagres (T1, T2, T3, T4, T5, T6), según

una planilla de perfil sensorial para el vinagre donde se evalúa la intensidad del aroma, color, sabor ácido, nivel de agrado del sabor ácido e impresión sensorial, con distintas escalas respectivamente, pero finalmente ajustadas a una escala de 1 a 5, en términos de análisis. La planilla se observa en ANEXO 1.



**FIGURA 4** Diagrama de elaboración del vinagre de arándano.

**CUADRO 4. Especificaciones del Cromatógrafo de gases.**

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>VARIABLES</b>
<b>COLUMNA</b>	Empacada 0,9144 m x 4 mm
<b>FASE ESTACIONARIA</b>	SP – 1200
<b>TEMPERATURAS</b>	
Horno inicial	60° C
Tiempo inicial	2 min
Tasa de incremento	6° C/min
Temperatura final	200° C
Inyector	250° C
<b>GAS DE ARRASTRE</b>	Nitrógeno
<b>FLUJO GE GAS</b>	20 mL/min
<b>VOLÚMEN DE INYECCIÓN</b>	1µL
<b>MODO DE INYECCIÓN</b>	Manual
<b>DETECTOR</b>	FID

**3.3.6 Análisis de datos.** Los análisis esta investigación, se realizaron utilizando el programa Statgraphics plus 5.1, para los siguientes métodos estadísticos.

- Análisis de varianza con un nivel de significancia del 95%, en el caso de existir diferencias significativas, se utilizo el Test de Comparación Múltiple de Tukey al 95% de confianza.
- Presentación de resultados mediante métodos gráficos.

## 4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para la elaboración de vinagre a partir de vino de arándano, se aisló un microorganismo de la familia Acetobacteriaceae y se determinó, para cada uno de los tratamientos, la acidez total y el etanol residual.

### 4.1 Microorganismo iniciador de la fermentación acética

A partir de las pruebas bioquímicas y fisiológicas, fue posible identificar el microorganismo responsable de la oxidación del alcohol a ácido acético. En el CUADRO 5, se presentan las diferentes pruebas, con sus respectivos resultados.

Las pruebas que muestra el CUADRO 5, afirman que el microorganismo que se aisló, pertenece a la familia Acetobacteriaceae. La prueba para la identificación a nivel de género, es suficiente para diferenciar entre *Acetobacter* y *Gluconobacter*. La reacción que se obtuvo fue positiva al realizar dicha prueba, la cual tuvo lugar cuando el indicador (verde de bromo cresol) cambió 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, por lo tanto el microorganismo aislado pertenece al género *Gluconobacter ssp* (DE LEY *et al.*, 1984).

En la FIGURA 5, se presenta el crecimiento del *Gluconobacter ssp*, sobre el medio con 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”.

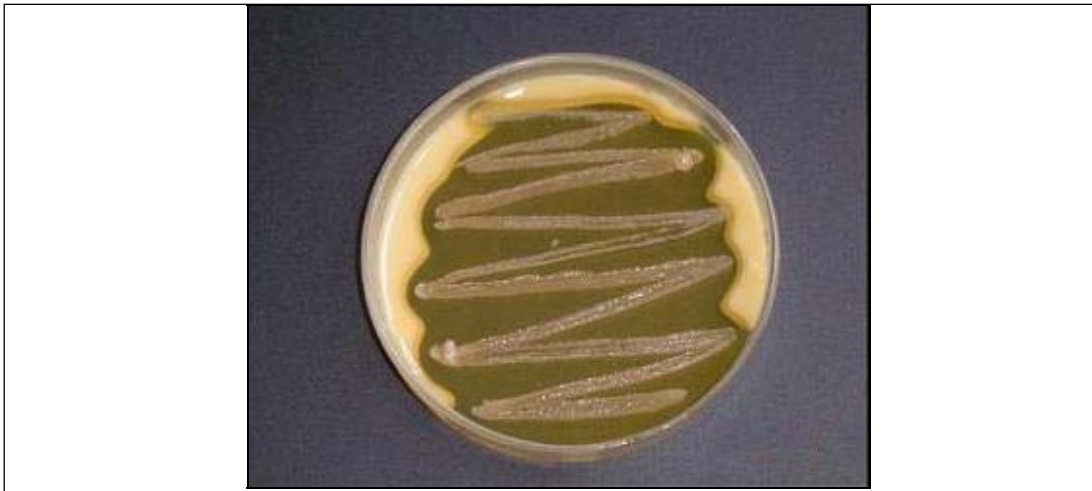
Al confirmar la presencia de la bacteria *Gluconobacter ssp*, se preparó el inóculo madre (descrito en la metodología), para la posterior obtención del “vinagre madre”, cuyas características fueron las siguientes: la concentración inicial de etanol y de acidez total fue de 40 g/L y 25 g/L, respectivamente. Una vez lograda la concentración de 50 g/L de ácido acético, con 13,53 g/L de etanol residual en un tiempo de 6 días, el vinagre madre esta listo para ser incorporado a los respectivos tratamientos, agregando una misma cantidad de vinagre madre y vino fresco de arándano.

**CUADRO 5. Resultados de las pruebas bioquímicas y fisiológicas, efectuadas al microorganismo iniciador del proceso de fermentación acética del vino de arándano.**

Pruebas Bioquímicas	Resultado	Pruebas Fisiológicas	Resultado
Catalasa	Positiva	Formación de compuestos cetónicos a partir de glicerina	Positiva, formación de halo rojo
Oxidasa	Negativa	Crecimiento en etanol	Positiva, formación de velo
Tinción de Gram	Gram ( - )	Formación de los ácidos 2-5 cetoglucónico y dicetoglucónico a partir de glucosa.	Positiva, presencia de velo
Indol	Negativa	Identificación a nivel de género	Positiva

Según investigaciones DE ORY *et al.* (2004b), las características de un inóculo madre en óptimas condiciones para comenzar con la acetificación en el reactor,

concuerdan con las características del “vinagre madre” del presente trabajo, en relación a la concentración de etanol y ácido acético.



**FIGURA 5** Crecimiento de *Gluconobacter ssp.*

#### **4.2 Acetificación**

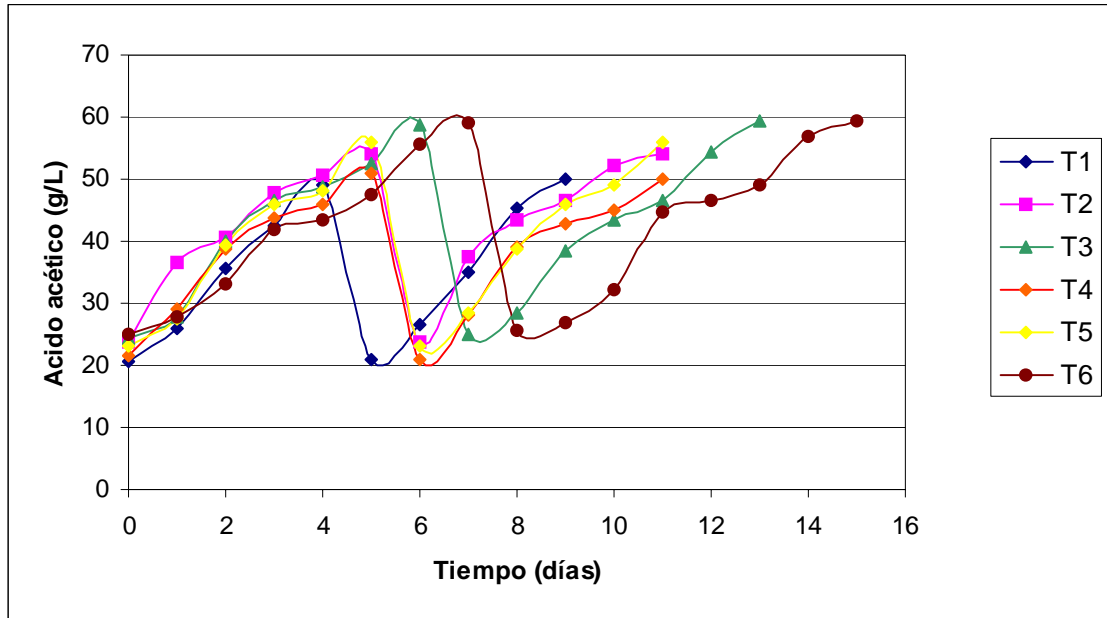
La fermentación acética, como su nombre lo indica, se detiene cuando se ha alcanzado la acidez total, deseada de acuerdo al grado alcohólico inicial que contenga el sustrato. En este caso, según el diseño experimental empleado, se obtienen seis tratamientos de acuerdo al grado de alcohol y de clarificación del sustrato.

La acetificación, que es el fin de esta investigación, para cada uno de los tratamientos se determinó por la evolución de la acidez total y del alcohol residual. En el ANEXO 2, es posible visualizar los datos de cada tratamiento con su respectivo ciclo, cada tratamiento se realizó en dos ciclos, siendo el sistema tradicional de obtener vinagre (DE ORY *et al.*, 2002).

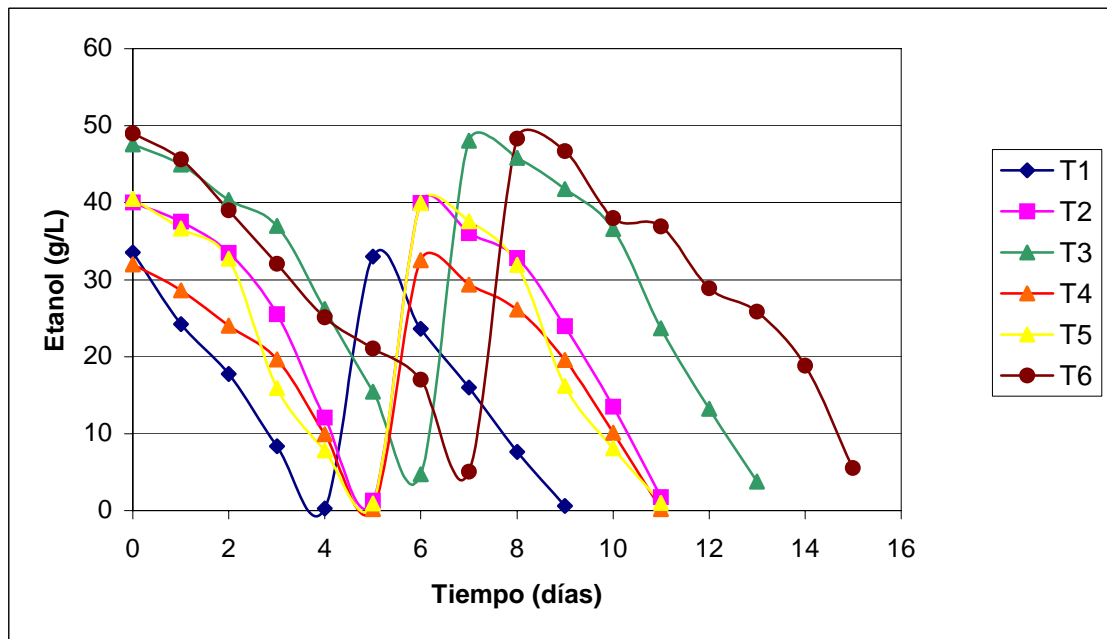
En la FIGURA 6 y 7, se observa la evolución de la concentración de acidez acética y la de la concentración de etanol en el tiempo, respectivamente.

En la FIGURA 6, se observa el crecimiento que experimenta cada tratamiento a medida que ocurre la acetificación, percibiendo una clara similitud entre ellos, en cuanto a la evolución del grado de acidez al transcurrir los días. Al mismo

tiempo en la FIGURA 7, se aprecia como disminuye el etanol a medida que ocurre la fermentación acética.



**FIGURA 6** Evolución de la concentración de acidez acética en el tiempo.



**FIGURA 7** Evolución de la concentración de etanol en el tiempo.

Como se aprecia en la FIGURAS 6 y 7, los tratamientos comienzan el proceso de acetificación con diferente contenido inicial de ácido acético y etanol respectivamente. En ambas figuras se observa que cada tratamiento experimenta dos ciclos de fermentación. Por ejemplo, para T1, el primer ciclo comenzó con una acidez total de 20,55 g/L y 33,51 g/L de etanol, finalizando el día cuatro con 48,95 g/L de acidez, donde se descargó la mitad del vinagre y se repuso con vino fresco de la misma graduación alcohólica para iniciar el nuevo ciclo el día cinco con 21,02 g/L de acidez acética y 32,97 g/L de etanol respectivamente. De esta manera se procedió para todos los tratamientos, sin embargo unos tardaron más tiempo que otros en acetificar, esto según el grado alcohólico y el grado de clarificación del vino de arándano, es el caso de los tratamientos T3 y T6, los cuales tardaron más tiempo en acetificar, por poseer ambos 12% g/L, es decir, mayor contenido de alcohol inicial que los demás tratamientos, sin embargo ambos tratamientos se diferencian por finalizar un día antes en cada ciclo respectivamente, esto de acuerdo al grado de clarificación de cada uno de ellos, pero llegando a una acidez acética similar alrededor de 59 g/L.

Según DE ORY *et al.* (2004a), lo anterior se explica en términos de adaptación celular de la cepa, es decir, que los grados de acetificación aumentan progresivamente mientras mayor sea la concentración de ácido acético y por consiguiente menor el contenido inicial de etanol, ya que altas concentraciones de alcohol pueden ser tóxico para la bacteria y en este caso se demoraría más el tiempo de fermentación acética.

Las altas concentraciones de etanol pueden inducir a un fenómeno de retraso o inhibición por sustrato al inicio de la fermentación acética, lo que provoca una fase de crecimiento más tardía por parte de las bacterias acéticas (PARK *et al.*, 1989).

El otro factor que afecta el tiempo de acetificación es el grado de clarificación, como se advierte en la FIGURA 6, ya que los tratamientos con sustrato no

clarificado, demoran más en acetificar, debido a que en el sustrato pudiesen existir levaduras que no decantan, al no existir centrifugación posterior a la clarificación, como es el caso del sustrato clarificado. Estas levaduras lidian con las bacterias acéticas, hasta que se inhibe su crecimiento por las altas temperaturas. Según TORIJA *et al.* (2003), las levaduras cesan su actividad entre 30 y 32 ° C.

La posible existencia de levaduras al finalizar la fermentación alcohólica, se debe a la presencia de azúcar residual en el sustrato, es decir, el vino que se obtiene no es completamente seco. Las fermentaciones alcohólicas deben terminar con un azúcar residual menos de 2 g/L (TORIJA *et al.*, 2003).

En la FIGURA 7, se puede observar que la acetificación llega a su fin una vez que el etanol residual es consumido por las bacterias acéticas casi en su totalidad. Cada tratamiento con su respectivo ciclo independiente el grado de alcohol inicial y el grado de clarificación, adquieren diferentes grados de etanol residual, pero similares entre ellos. Según TESFAYE *et al.* (2004) el contenido de etanol residual que debe poseer el vinagre es menor a 1% (v/v).

### 4.3 Rendimiento

El rendimiento es calculado como el porcentaje de etanol desaparecido en el medio líquido que es convertido en ácido acético (DE ORY *et al.*, 2004a).

Según LLAGUNO y POLO (1991), el cálculo de rendimiento real, en la industria se realiza comparando la concentración total del vinagre descargado con la concentración total de la materia prima, cuya fórmula es la siguiente:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Concentración total del vinagre}}{\text{Concentración total del vino}} \times 100$$

Donde:

Concentración total = (% de alcohol x 1,043) + acidez total

Siendo 1,043 un factor de corrección.

Los valores promedios de los rendimientos de cada ciclo, obtenidos durante la acetificación, se encuentran en el CUADRO 6. Los valores puntuales de cada tratamiento con sus ciclos se presentan en el ANEXO 3.

DE ORY *et al.* (1999), mencionan que los fermentadores que producen ácido acético bajo la modalidad de cultivo sumergido son habitualmente usados en la industria del vinagre, sin embargo, estos presentan desventajas de ser abiertos a la atmósfera con la subsiguiente evaporación de los componente volátiles, tales como, etanol, ácido acético, como consecuencia ocurre una reducción de rendimiento entre 5-10%, y un aumento de costo operacional.

**CUADRO 6. Rendimientos (%) para cada tratamiento en la fermentación acética \*.**

Tratamiento	Rendimiento (%)
T1 ( 8% (v/v), vino clarificado)	83,59 ± 1,75 a
T2 (10% (v/v), vino clarificado)	76,07 ± 0,64 b
T3 (12% (v/v), vino clarificado)	73,28 ± 0,58 c
T4 ( 8% (v/v), vino sin clarificar)	84,82 ± 1,09 a
T5 (10% (v/v), vino sin clarificar)	77,64 ± 0,25 b
T6 (12% (v/v), vino sin clarificar)	74,91 ± 0,81 c

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

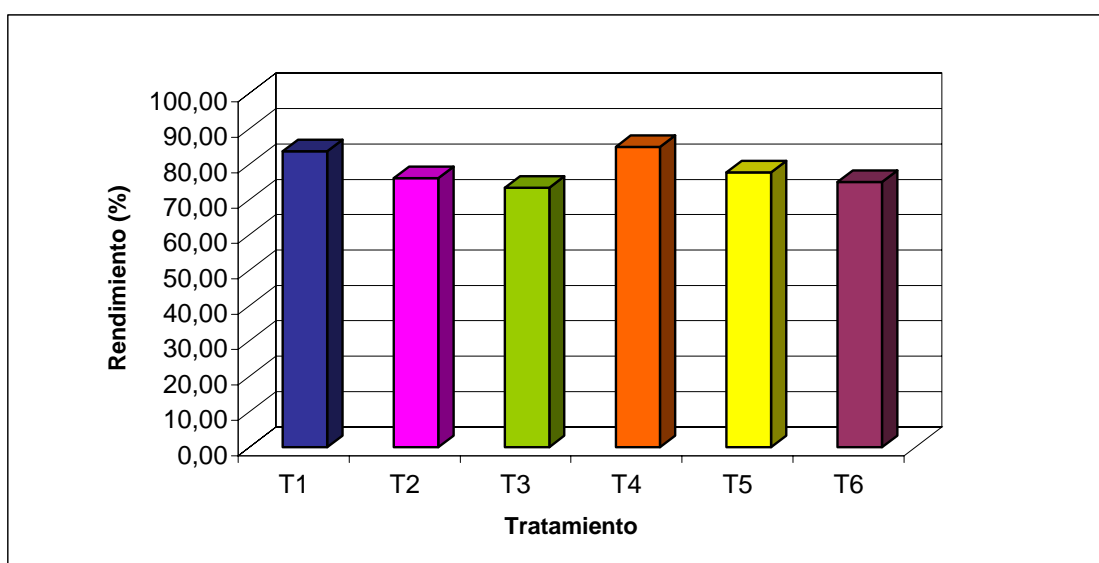
De la misma forma FREGAPANE *et al.* (2003), señalan que los rendimientos son más altos en una fermentación en continuo (93,3%), que en una en semi-continua (83,3%). Según HORIUCHI *et al.* (2003), los rendimientos que se obtienen en procesos continuos de fermentación acética, se encuentran entre 88-92%.

Lo anterior puede ser el resultado de los rendimientos que se obtienen, esto por tratarse de un sistema abierto, es decir, de tipo batch, donde existe la

posibilidad de evaporación de alcohol y de ácido acético, siendo estos últimos los principales componentes volátiles de esta investigación.

En la FIGURA 8, se puede observar gráficamente los rendimientos para cada tratamiento de vinagre.

Al realizar el análisis estadístico se encontró diferencias significativas entre los tratamientos según el grado de alcohol, esto se puede observar en la FIGURA 8.



**FIGURA 8 Rendimientos para cada tratamiento de vinagre.**

El rendimiento mayor fue alcanzado por los tratamientos que poseían una concentración de etanol inicial de 8% v/v, los cuales correspondían a T1 y T4. Resultados similares reportaron LU *et al.* (1999), ya que a través de un estudio en donde utilizaron concentraciones de 0 a 10% v/v, se obtiene un máximo de acidez total, en 5% v/v, es decir, que entre 1 y 5% v/v, la concentración de ácido acético aumenta proporcionalmente a la concentración de etanol, no así en concentraciones superiores a 5%. Así la concentración de etanol óptima, en este estudio, para la alimentación correspondió a 37,5 g/L que equivale a 4,6 % v/v.

En el caso de los tratamientos con mayor concentración de etanol, sienten estos T3 y T6 (12% v/v), el rendimiento es menor, lo que coincide con resultados de MACIAS *et al.* (1997), que indican un fuerte efecto de inhibición de ácido acético inicial, al utilizar mayores concentraciones de etanol.

El tipo de bacterias acéticas, cumple un rol importante dentro de la fermentación acética, lo que se puede constatar en esta investigación, ya que al ser éstas del género *Gluconobacter ssp* podrían afectar el rendimiento. Según CIANI (1998), resultados con *Gluconobacter oxydans*, originan rendimientos de 70 a 82%, con valores de acidez total entre 3,4 a 6%. Mientras que, RICHARDSON *et al.* (1967), indican rendimientos entre 90% a 92% para tipos de *Acetobacter*.

#### 4.4 Contenido de antocianinas

Una forma de poder comparar el contenido de antocianinas que se obtienen al término de cada tratamiento, es a través de la materia prima utilizada para la elaboración de dichos tratamientos. En el CUADRO 7 se encuentran los valores del contenido de antocianinas de la materia prima clarificada y sin clarificar de acuerdo al tratamiento correspondiente.

**CUADRO 7. Resultados del contenido de antocianinas de la materia prima clarificada y sin clarificar, utilizada al inicio de cada tratamiento.**

Tratamiento	Cyanidin 3 glucoside (mg/L)
T1 ( 8% (v/v), vino clarificado)	221,62
T2 (10% (v/v), vino clarificado)	279,94
T3 (12% (v/v), vino clarificado)	309,98
T4 ( 8% (v/v), vino sin clarificar)	252,59
T5 (10% (v/v), vino sin clarificar)	305,96
T6 (12% (v/v), vino sin clarificar)	353,91

En la FIGURA 9, se visualiza con mayor claridad la diferencia del contenido de antocianinas existentes entre el sustrato inicial y los tratamientos al finalizar la



fermentación acética. En T1, T2 y T3, la concentración es más baja, respecto al sustrato clarificado que se utilizó para dichos tratamientos, del mismo modo, T4, T5, y T6, también resultan con una concentración de antocianina menor, en relación al sustrato sin clarificar, pero a la vez mayor en relación a los tratamientos con sustrato clarificado.

Los valores promedios del contenido de antocianinas para cada tratamiento al término de la fermentación acética se presentan en el CUADRO 8. Los valores puntuales de cada tratamiento con sus respectivos ciclos se presentan en el ANEXO 4.

El análisis estadístico de los valores de antocianinas entregó diferencias significativas entre los tratamientos según el grado de clarificación, dando como resultado concentraciones de antocianinas más altas en los tratamientos con materia prima sin clarificar, como se puede apreciar en la FIGURA 9, entre T1, T2, T3 y T4, T5, T6 respectivamente

**CUADRO 8. Resultados del contenido de antocianinas para cada tratamiento, al finalizar la fermentación acética \*.**

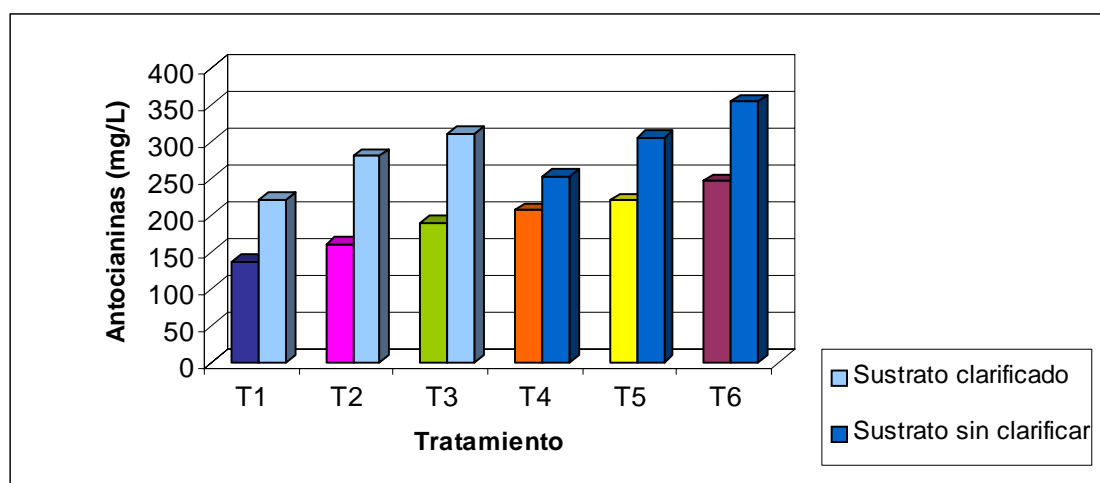
Tratamiento	Cyanidin 3 glucoside (mg/L)
T1 ( 8% (v/v), vino clarificado)	136,10 ± 0,93 a
T2 (10% (v/v), vino clarificado)	160,17 ± 1,22 a
T3 (12% (v/v), vino clarificado)	189,18 ± 0,52 a
T4 ( 8% (v/v), vino sin clarificar)	206,64 ± 1,07 b
T5 (10% (v/v), vino sin clarificar)	219,39 ± 1,36 b
T6 (12% (v/v), vino sin clarificar)	245,66 ± 1,67 b

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

Los resultados del presente estudio, es posible compararlos con investigaciones de LEE y WROLSTAD (2004), PRIOR *et al.* (1998) que se refieren al contenido

de antocianinas del arándano, siendo éste la materia prima para la elaboración del vino.

LEE y WROLSTAD (2004), en su investigación se refieren a la extracción de antocianinas del fruto del arándano, el cual según estos autores, posee gran cantidad de antocianinas. El fruto completo contiene alrededor de 2300 mg/L (expresados como equivalentes de Cyanidin 3 glucoside). PRIOR *et al.* (1998), indican que el arándano alto contiene una concentración de antocianinas entre 250 - 4950 mg/L, comparado con otros autores que reportan concentraciones entre 730 - 4300 mg/L (MOYER *et al.*, 2002).



**FIGURA 9** Contenido de antocianinas entre materia prima y los tratamientos.

Para obtener el jugo concentrado de arándano, es necesario que el fruto sea sometido a una serie de procesos, donde ocurren pérdidas considerables de antocianinas. Una de las etapas donde se pierde aproximadamente un 8% de antocianinas corresponde a la clarificación y en la concentración existen pérdidas menores a un 10% (LEE *et al.*, 2002).

Lo mencionado, puede explicar, la pérdida del contenido de antocianinas, que existe entre el vino clarificado y el vino sin clarificar, ya que durante la etapa de clarificación ocurre la floculación de toda la masa que enturbia al sustrato, pero

al mismo tiempo se pierde entre 16-30 % de antocianinas. Por consiguiente, en los tratamientos se ve reflejada esta pérdida, resultando una diferencia significativa, sin dejar de lado, que estos tratamientos vuelven a sufrir un proceso de clarificación, por eso la menor cantidad de antocianinas con respecto al sustrato.

Pero la pérdida de antocianinas durante el proceso de acetificación no sólo es atribuible al grado de clarificación de la materia prima que se utiliza. Según investigaciones de ANDALAUER *et al.*, (2000), afirman que el proceso de acetificación, se asocia con un descenso en el contenido total fenólico de un 13%, sorprendentemente, de este porcentaje el 50%, corresponde al contenido de antocianinas.

El tiempo de fermentación y las altas temperaturas, son factores que influyen en la degradación de los antocianos, esto se ha reportado por CACAE y MAZA (2003). Lo que se comprueba al prolongarse hasta 7 días el proceso de fermentación y a 30° C.

#### **4.5 Evaluación sensorial**

En el CUADRO 9, se presentan los resultados promedio de los atributos e impresión general, de la evaluación realizada a los tratamientos de vinagre.

**4.5.1 Intensidad del aroma.** En el CUADRO 9, se encuentran los resultados de la evaluación de este atributo para cada tratamiento y en el ANEXO 5, los valores promedios de las tres repeticiones de cada tratamiento y juez.

La escala que se utilizó para evaluar fue de 1 a 5. 1: muy débil; 2: débil; 3: moderado; 4: intenso; 5: muy intenso. Agregando el nivel de agrado o desagrado (A ó D), desde la calificación 3 en adelante.

Cada atributo fue evaluado con escalas diferentes de 5 puntos, detalladas más adelante.

**CUADRO 9. Valores de los resultados promedio de los atributos intensidad del aroma, color, sabor ácido, nivel de agrado del sabor ácido e impresión general de los tratamientos \*.**

Trat	Int.arom	Color	S.ácido	N.a.s.ácido	Impresión general
T1	3,17 ± 0,70	3,92 ± 0,93	9,61 ± 2,14	8,45 ± 2,61	3,46 ± 0,59
T2	3,33 ± 0,82	3,88 ± 0,90	10,64 ± 1,91	8,99 ± 2,53	3,50 ± 0,72
T3	3,21 ± 0,88	3,92 ± 0,88	9,63 ± 2,13	8,17 ± 2,59	3,21 ± 0,78
T4	3,25 ± 0,68	3,92 ± 0,83	10,12 ± 1,77	9,20 ± 2,47	3,50 ± 0,66
T5	3,38 ± 0,77	3,83 ± 0,96	10,26 ± 2,10	9,34 ± 2,93	3,54 ± 0,66
T6	3,46 ± 0,72	3,88 ± 0,80	10,37 ± 2,29	9,02 ± 2,01	3,42 ± 0,65

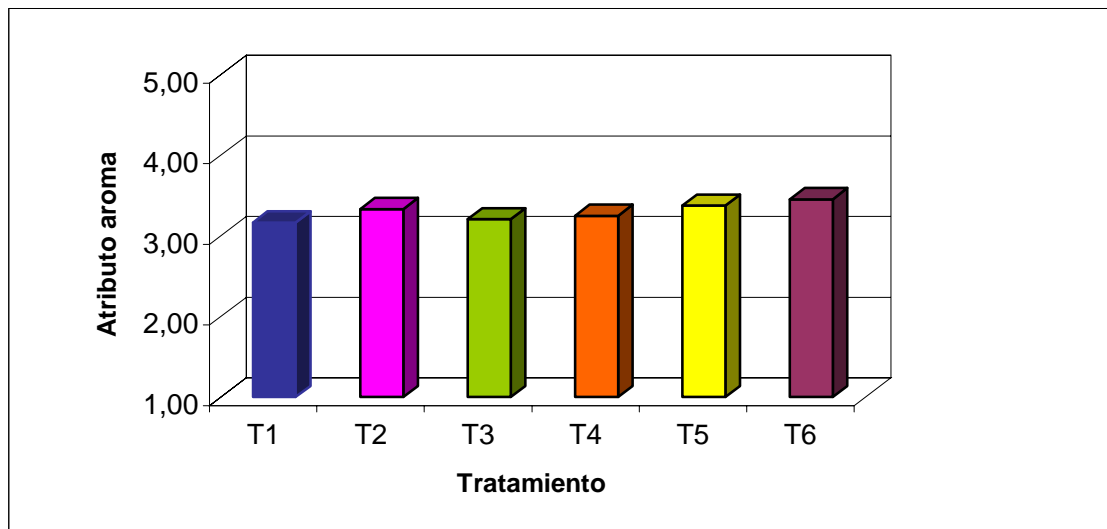
\* Promedio ± D.E de las evaluaciones de 8 jueces en triplicado.

Según el análisis estadístico, no hubo diferencia significativa entre los tratamientos para cada juez, en cuanto a la intensidad de aroma.

Sin embargo, en la FIGURA 10, se puede observar en que nivel de intensidad de aroma se encuentran los tratamientos y la mínima diferencia entre ellos, sin que ésta sea significativa.

En la FIGURA 10, el mínimo grado de diferencia entre los tratamientos, con respecto a la intensidad de aroma del vinagre fue entre “moderado a intenso”, cuya intensidad fue agradable casi en todos los tratamientos, por la mayoría de los jueces.

El aroma de los vinagres depende, de tres clases de componentes importantes que se originan en la fermentación acética, entre ellos están: los ácidos, alcoholes y ésteres. Los ésteres resultan de la fermentación de los alcoholes, éstos son los responsables del aroma frutal y floral. El etil acetato es el éster más importante del vinagre, resultante de la fermentación acética (CHARLES *et al.*, 2000).



**FIGURA 10 Resultados del atributo intensidad del aroma de cada tratamiento.**

**4.5.2 Color.** En el CUADRO 9, se encuentran los resultados de la evaluación de este atributo para cada tratamiento y en el ANEXO 5, los valores promedios de las tres repeticiones de cada tratamiento y juez.

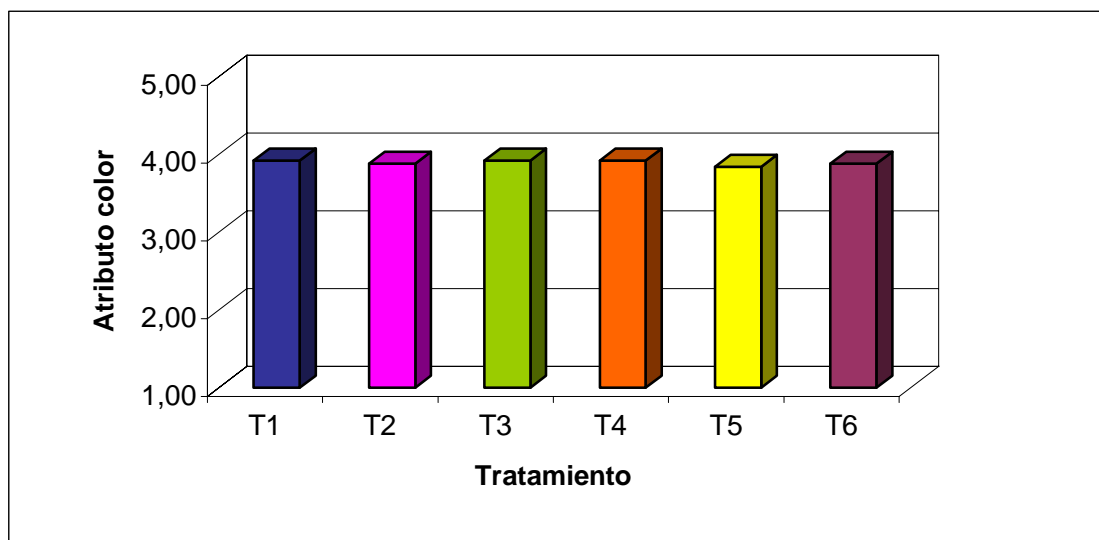
La escala que se utilizó fue de 5 puntos, donde los extremos corresponden respectivamente a “menos atractivo y más atractivo”.

Para este atributo, según el análisis estadístico no existe diferencia significativa entre los tratamientos, no obstante para una mejor visión, en la FIGURA 11 se pueden apreciar todos los tratamientos y la similitud que hubo entre ellos según el color.

Como se observa en la FIGURA 11, la diferencia entre los tratamientos es muy pequeña, ya que para todos, el atributo estuvo cerca de la calificación 4, lo que significa que el color del vinagre fue del agrado de los jueces, es decir, resultó atractivo.

Al hablar del color del vinagre, en este caso, es imposible no referirse al vino, siendo ésta la materia prima que se utilizó para este trabajo, es por ello que dicho color está ligado a este sustrato. Según GONZÁLEZ (2002), el color o la

cromaticidad del vino dependen claramente de su composición fenólica, se asocia más a la presencia de antocianos y de los pigmentos derivados de ellos. En general, cuanto mayor es el contenido fenólico global del vino, mayor es su intensidad cromática, lo que suele coincidir con las mayores cargas antocianicas.



**FIGURA 11 Resultados del atributo color de cada tratamiento.**

**4.5.3 Sabor ácido.** En el CUADRO 9, se encuentran los resultados de la evaluación de este atributo para cada tratamiento y en el ANEXO 5, los valores promedios de las tres repeticiones de cada tratamiento y juez.

Para evaluar este atributo, se utilizó una escala no estructurada de 15 cm, la cual se divide en cinco puntos, para una mejor ubicación de los valores obtenidos, entre demasiado débil (falta de acidez) y demasiado intenso (exceso de acidez). Por otra parte cada juez marcó su acidez ideal.

En la FIGURA 12, es posible observar a los seis tratamientos según el grado de acidez encontrado por cada juez.

Para el atributo de sabor ácido, no hubo diferencia significativa entre los tratamientos, pero lo que se puede rescatar de la FIGURA 12, que a pesar de no existir diferencias, todos los tratamientos se encuentran muy cerca de la

calificación 3 de la escala, fue moderada a intensa. La acidez ideal estimada, de cada juez, casi en un 100%, fue moderada, a excepción de un juez, cuya acidez ideal fue intensa.

CHARLES *et al.*, (2000), indican que el sabor del vinagre de vino depende de los constituyentes formados durante la fermentación del vino. Sin embargo, el mismo autor señala, que durante la fermentación acética, se forman una serie de ácidos, siendo el ácido acético el componente aromático más importante, el cual da el sabor ácido al vinagre, predominando sobre los demás ácidos.

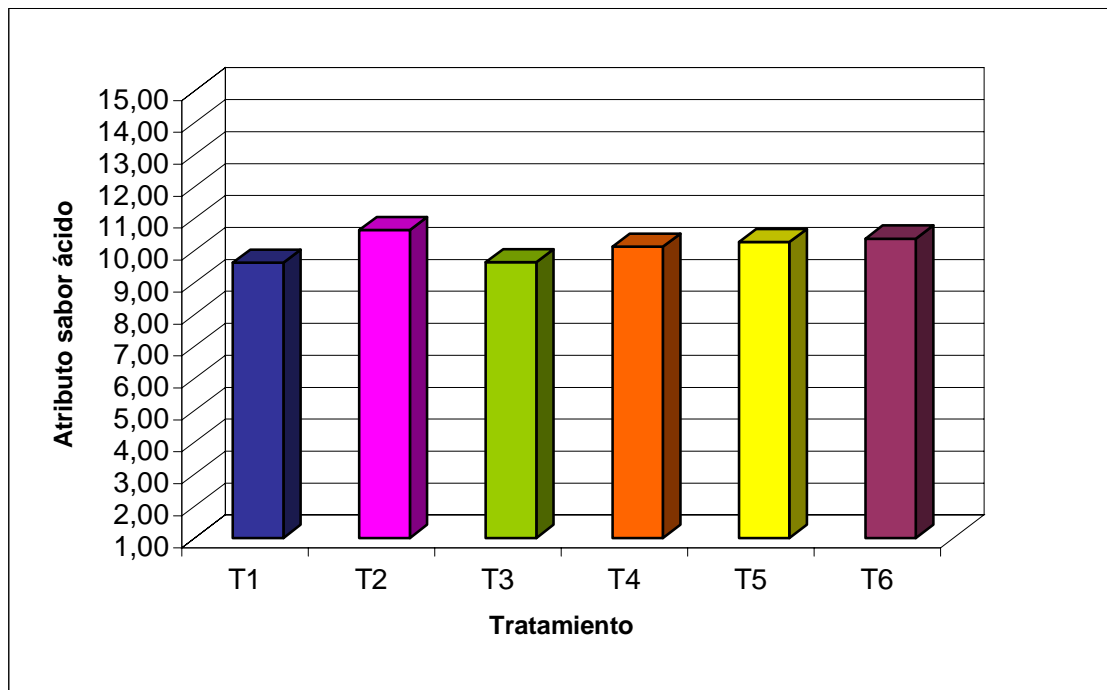
**4.5.4 Nivel de agrado del sabor ácido.** En el CUADRO 9, se encuentran los resultados de la evaluación de este atributo para cada tratamiento y en el ANEXO 5, los valores promedios de las tres repeticiones de cada tratamiento y juez.

La escala de evaluación utilizada en este caso fue la misma que la del sabor ácido, solamente cambia el nivel de estimación, siendo desde muy desagradable a muy agradable. Por realizarse dicha evaluación, bajo las condiciones normales de consumo del vinagre, es decir, en ensalada de lechuga.

Al igual que en los atributos anteriores, el análisis estadístico dio como resultado que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. En la FIGURA 13, se aprecia el nivel de agrado del sabor ácido.

En la FIGURA 13, todos los tratamientos se ubican cerca de la calificación 3, lo que quiere decir, que el nivel de sabor ácido fue agradable, no obstante, T3 experimenta un leve descenso de agrado, en comparación a los demás tratamientos, sin ser estadísticamente significativo.

**4.5.5 Impresión general.** En el CUADRO 9, se encuentran los resultados de la evaluación de la impresión general para cada tratamiento y en el ANEXO 5, los valores promedios de las tres repeticiones de cada tratamiento y juez.



**FIGURA 12 Resultados del atributo sabor ácido de cada tratamiento.**

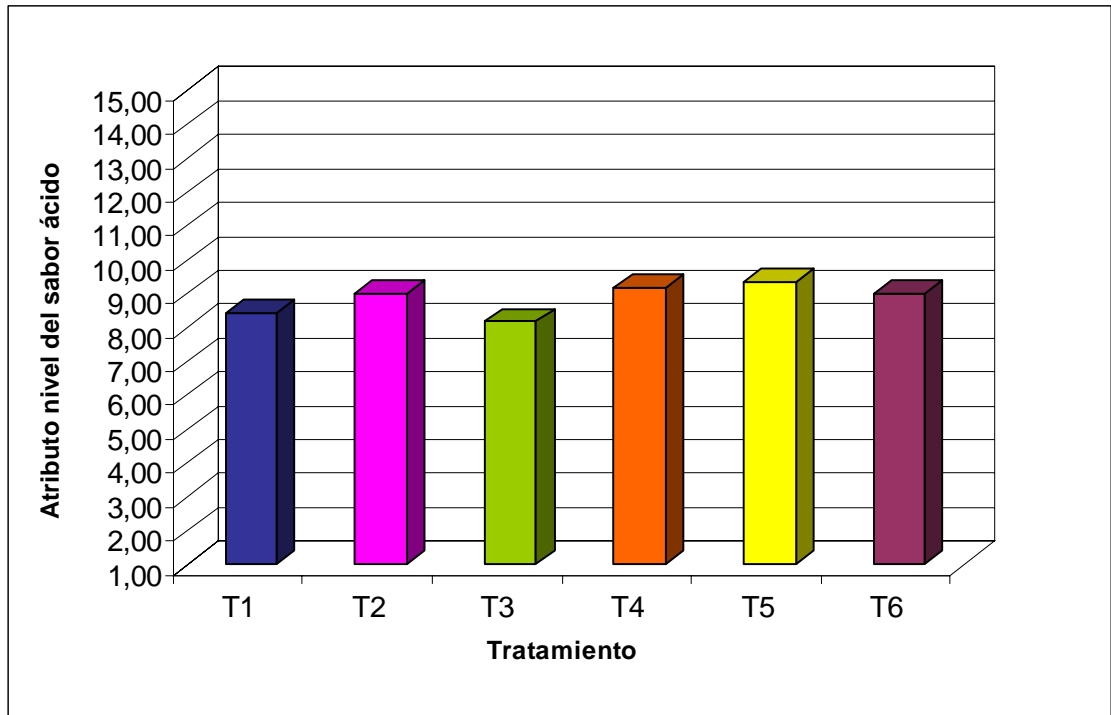
La escala que se utilizó para evaluar fue de 1 a 5. 1: muy malo; 2: malo; 3: regular; 4: bueno; 5: excelente.

En la FIGURA 14, se aprecian los tratamientos según impresión general.

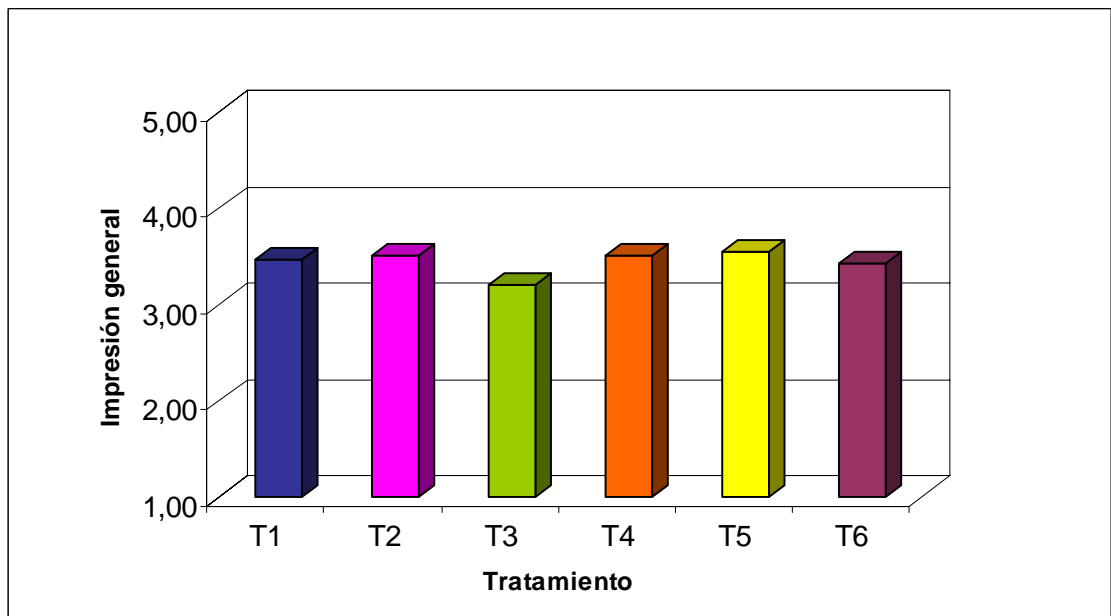
Como se puede observar en la FIGURA 14 y al realizar el análisis estadístico correspondiente no hay diferencia significativa entre los tratamientos, sin embargo, al ver la figura, la impresión general para todos los tratamientos fue entre “regular y bueno”, coincidiendo con las evaluaciones de los atributos anteriores.

Al observar el resultado de la evaluación sensorial en su totalidad y al no existir diferencias significativas entre los tratamientos para cada atributo, el factor de grado de clarificación del sustrato no afectaría directamente al producto final, es por esto que en miras a escala industrial, convendría utilizar la materia prima sin clarificar y de esta forma se reducirían costos.





**FIGURA 13** Resultados del nivel de agrado del sabor ácido de cada tratamiento.



**FIGURA 14** Resultados de la impresión general de cada tratamiento.

## 5. CONCLUSIONES

- Al finalizar el proceso de fermentación acética, se observó que el grado de alcohol inicial de la materia prima afectó el grado de acidez acética final de los tratamientos, obteniéndose mayores grados de acidez acética en los tratamientos con mayor grado alcohólico.
- El grado de clarificación de la materia prima afectó el proceso de fermentación de los distintos tratamientos de acuerdo al tiempo de finalización de cada uno de estos, tardándose un día más los tratamientos con materia prima sin clarificar.
- En esta investigación en particular, los grados de acetificación, se encuentran dentro del porcentaje de acidez total reglamentario por tratarse de un sistema abierto, sin embargo, si se tratara de un sistema cerrado, las pérdidas por evaporación, hubieran sido menores y por lo tanto los grados de acidez habrían aumentado.
- El proceso de clarificación de la materia prima, no influyó en el rendimiento final de los tratamientos. En relación al grado alcohólico inicial, si se encontraron diferencias significativas para rendimiento.
- La clarificación disminuye los niveles de antocianinas.
- La evaluación sensorial demostró que levemente era más apreciado el vinagre proveniente de vino sin clarificar, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas que apoyaran esta apreciación.
- Como el uso de materia prima (vino) sin clarificar no influye en el proceso excepto en aumentarlo en 24 horas aproximadamente, y teniendo en cuenta

que el vinagre se clarificará posteriormente; por aspectos relativos al costo del proceso se estima mejor usar vino no clarificado.

## 6. RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue elaborar vinagre a partir de vino de arándano, para obtener un producto saludable, de buena calidad y que sea atractivo al consumidor. Los factores implicados en este estudio fueron los distintos niveles de alcohol (8%, 10% y 12% v/v) y dos niveles de clarificación (vino clarificado y sin clarificar) del vino de arándano. Para la elaboración del vinagre se diseñó un fermentador tipo batch, usando el método de fermentación en cultivo sumergido, en ciclos. Además, fue necesario el aislamiento del microorganismo iniciador de la fermentación acética, obteniendo al *Gluconobacter ssp.*

Se determinó la acidez total y el alcohol residual, a cada tratamiento durante su elaboración hasta obtener el vinagre, además al producto terminado se le determinó el contenido de antocianinas, el rendimiento y finalmente se realizó una evaluación sensorial. Al analizar los rendimientos que presentaron cada uno de los tratamientos, existen diferencias significativas de acuerdo al grado de alcohol, esto debido a las fluctuaciones de los factores involucrados en el proceso y sobre todo al menor y mayor contenido de alcohol inicial. El contenido de antocianinas del vinagre, se relaciona esencialmente a la capacidad antioxidante. El mayor contenido de antocianinas se presentó en los tratamientos con vino sin clarificar, ya que al sufrir este tipo de proceso se elimina gran cantidad de las mismas.

El vinagre de arándano es un producto con aroma y sabor característico, donde su componente principal es el ácido acético, lo cual dificulta diferenciar entre uno y otro tratamiento, de ahí que no hubo diferencias estadísticamente significativas.

## SUMMARY

The objective of the research was to elaborate vinegar from blueberry wine, in order to obtain a healthful, good quality and attractive to the consumer product. The factors implied in this study were three different alcohol levels (8%, 10% and 12% v/v) and two clarification levels (clarified and no clarified wine) of the blueberry wine. For the elaboration of the vinegar a batch type fermentator was designed, under submerged culture method of fermentation, in cycles. In addition, the isolation of the initiator microorganism of the acetic fermentation was necessary, obtaining *Gluconobacter ssp.*

Total acidity and residual alcohol was determined to each treatment during the elaboration until obtaining the vinegar, in addition to the finished product, the anthocyanin content was determined, the yield and a sensorial evaluation was made. Analyzing the yield presented by each of the treatments, exists significant differences according to the alcohol content, this due to the fluctuations of the factors involved in the process and mainly to the content of initial alcohol. The anthocyanin content of vinegar, is related essentially to the antioxidant capacity. The greater anthocyanin content was in the treatments with no clarified wine, since the process eliminates some amount of anthocyanins.

Blueberry vinegar is a product with a characteristic aroma and flavor, where its main component is the acetic acid, which makes difficult to differentiate between both treatment, because of this, there were no statistical significant differences.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ANDALAUER W., STUMPF C., FÛRST P. 2000. Influence of the acetification process on phenolic compounds. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 48: 3533-3536.
- ADAMS M. y MOSS M. 2000. *Food microbiology second edition*. Publisher by the Royal Society of Chemistry. Cambridge. 479 p.
- ALADREN F. y CRESPO I. 1999. Estudio de la relación entre el color de la uva tinta y el color del vino. *Viticultura / Enología profesional*. (63): 23 – 34.
- ASSOCIATION OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. AOAC. 1995. *Official Methods of Análisis of AOAC Internacional*. Food composition; Additives; Natural contaminants. Vol II. 16<sup>th</sup> Ed. Cap. 43.
- ARTHEY D. y ASHURT P. 1996. *Procesos de conservación de alimentos*. Editorial Acribia.S.A., Zaragoza, España. 273p.
- BELTRAN J. 1994. *Microbiología alimentaria*. Editorial Acribia Zaragoza. España. 366 p.
- BERNAL DE RAMIREZ I. 1993. *Análisis de alimentos*. Academia colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales, Bogotá, Colombia. 335p.
- 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.

- CHARLES M., MARTIN B., GINIES C., ETIEVANT P., COSTE G., GUICHARD E. 2000. Potent aroma compounds of two red wine vinegars. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 48: 70-74.
- CHRISTAKI T. y TZIA C. 2002. Quality and safety assurance in winemaking. *Food Control*. 13: 503-517.
- CIANI M. 1998. Wine vinegar production using base wines made with different yeast species. *Journal Science Food Agricultural*. 78: 290-294.
- DE LEY J., GILLIS M., 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. 2004a. Operation in semi-continuous with a closed pilot plant scale acetifier for Vinegar production. *Journal of Food Engineering*. 63: 39-45.
- DE ORY I., ROMERO L., CANTERO D. 2004b. Optimizacion of immobilization conditions for vinegar production. Siran, wood chips and polyurethane foams as carries for *Acetobacter aceti*. *Process Biochemistry*. 39: 547-555.
- DE ORY I., ROMERO L., CANTERO D. 2002. Optimum starting-up protocol of a pilot plant scale acetifier for vinegar production. *Journal of Food Engineering*. 52:31-37.
- DE ORY I., ROMERO L., CANTERO D. 1999. Maximum yield acetic acid fermenter. *Bioprocess Engineering*. 21: 187-190.
- DE ORY I., ROMERO L., CANTERO D. 1998. Operación y puesta a punto de un acetificador semi-industrial de máximo rendimiento. *Alimentación Equipos y Tecnología*. 175-178.

- 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.
- DONATH E. 1992. Elaboración artesanal de frutas y hortalizas. Zaragoza. Barcelona. España. 135p.
- DRUAUX D., MANGEOT G., ENDRIZZI A., BELIN J. 1997. Bacterial bioconversion of primary aliphatic and aromatic alcohols into acids: effects of molecular structure and physico-chemical conditions. *Journal Chemistry Technology Biotechnology*. 68: 214-218.
- DU TOIT W. y LAMBRECHTS M. 2002. The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 74: 57-64.
- EBNER H., SELLMER S. y FOLLMANN H. 1999. Vinegar, acetic acid production. *Bioprocess Technology : Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. 2637-2645.
- 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.
- FREGAPANE G., RUBIO H., SALVADOR M. 2003. Continuous production of wine vinegar in bubble column reactors of up to 60-litre capacity. *European Food Research and Technology*. 216: 63-67.
- GIUSTI M. y WROLSTAD R. 2002. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. *Food Analytical Chemistry*. F1.2. 11p.
- GONZÁLEZ M. 2002. Los compuestos fenólicos y las características sensoriales de los vinos. Área de Tecnología de los Alimentos. Universidad de Burgos. 16-21.



- HORIUCHI J., TADA K., KOBAYASHI M., KANNO T., EBIE K. 2003. Biological approach for effective utilization of worthless onions-vinegar production and compositing. *Resources, Conservation and Recycling*. 1-14.
- KALT W., MCDONALD J., DONNER H. 2000. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity of processed lowbush blueberry products. *Journal of Food Science*. 65: 390-393.
- KONG, J., CHIA, L., GOH,N., CHIA,T y BROUILLARD, R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. (64): 923 – 933.
- LEE J., DURST R., WROLSTAD R. 2002. Impact of juice processing on blueberry anthocyanins and polyphenolics: Comparison of two pretreatments. *Journal of Food Science*. 67:1660-1667.
- LEE J. y WROLSTAD R. 2004. Extraction of anthocyanins and polyphenolics from blueberry processing waste. *Food Chemistry and Toxicology*. 69(7): 564-573.
- LEVONEN E. y LLAGUNO C. 1978. Tecnología de la fabricación del vinagre. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment*. 18: 289-296.
- LLAGUNO C. y POLO M. 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.
- MACIAS 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.
- MALLOUCHOS A., KOMAITIS M., KOUTINAS A., KANELLAKI M. 2003. Wine fermentations by immobilized and free cells at different temperatures. Effect of immobilization and temperature on volatile by-products. *Food Chemistry*. 80: 109-113.

- MESAS J. y ALEGRE M. 1999. El papel de los microorganismos en la elaboración del vino. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 2 (4): 174-183.
- MOYER A., HUMMER K., FINN C., FREI B., WROLSTAD R. 2002. Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *Journal Agricultural Food Chemtry*. 50: 519-525.
- PARK Y., OHTAKE H., TODA K. 1989. Acetic acid production using a fermentor equipped with a hollow fiber filter module. *Biotechnology and bioengineering*. 33: 918-923.
- POTTER N. y HOTCHKISS J. 1999. *Ciencia de los alimentos*. Editorial Acribia. Zaragoza. España. 667p.
- PRIOR R., CAO G., MARTÍN A., SOFIE E., MCEWEN J., O'BRIEN C., LISCHNER N., EHLENFELDT M., KALT W., KREWER G., MAINLAND C. 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *vaccinium* species. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 46: 2686-2693.
- QUEROL A., FERNÁNDEZ M., OLMO M., BARRIO E. 2003. Adaptative evolution of wine yeast. *International Journal of Food Microbiology*. (86): 3–10.
- RICHARDSON K. 1967. Submerged acetification of a vinegar base produced from waste pineapple juice. *Biotechnology and Bioengineering*. 9: 171-186.
- SCHLEGEL H. 1997. *Microbiología general*. Editorial Omega, S A. Barcelona. 654 p.
- SKREDE G., WROLSTAD R., DURST R. 2000. Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of Food Science*. 65:357-364.

- SMITH M., MARLEY K., SEIGLER D., SINGLETARY K., MELINE B. 2000. Bioactive properties of wild blueberry fruits. *Journal of food science*. 65: 352-356.
- STEINKRAUS K. 1997. Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control*. 8: 311-317.
- SUDZUKI F. 2002. *Cultivo de frutales menores*. Ed. Universitaria. Santiago. Chile. 194 p.
- TESFAYE W., MORALES M., BENÍTEZ B., GARCIA-PARRILLA A., TRONCOSO A. 2004. Evolution of wine vinegar composition during accelerated aging with oak chips. *Analytica Chimica Acta*. 513: 239-245.
- TESFAYE W., MORALES M., GARCIA-PARRILLA A., TRONCOSO A. 2002. Wine Vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science and Technology*. 13: 12-21.
- TORIJA M J., ROZES N., POBLET M., GUILLAMON JM., MAS A. 2003. Effects of fermentation on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*. 80: 47-53
- WEISER H. 1962. *Practical food microbiology*. The Avi Publishing Company, Inc. USA. 354p.
- WOOD B. 1985. *Microbiology of fermented foods*. Elsevier Applied Science Publishers. London y New York. 371p.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1.

### Planilla de evaluación sensorial para los vinagres.

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							
<b>1. Muy débil</b>													
<b>2. Débil</b>													
<b>3. Moderado</b>													
<b>4. Intenso</b>													
<b>5. Muy intenso</b>													

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. (Agrado ó Desagrado, 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. (Agrado ó Desagrado, A ó D).

(Continuación ANEXO1)

### **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.

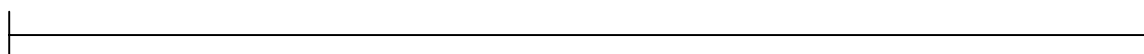
<b>Muestra</b>	<b>1</b> <b>Menos</b> <b>atractivo</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b> <b>Más</b> <b>atractivo</b>

### **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

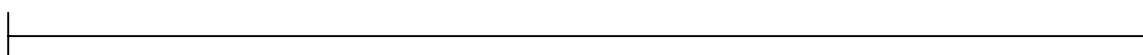
(Continuación ANEXO1)

### **NIVEL DE AGRADO DEL SABOR ÁCIDO**

Proceda a evaluar el nivel de agrado o desagradado 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.

**A**

**B**



Muy desagradable

Muy agradable

### **IMPRESIÓN GENERAL**

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

Calificación	Muestras					
<b>1. Muy malo</b>						
<b>2. Malo</b>						
<b>3. Regular</b>						
<b>4. Bueno</b>						
<b>5. Excelente</b>						

**COMENTARIOS:**

## ANEXO 2.

**Resultados de las concentraciones de ácido acético y de alcohol residual (g/L) de los tratamientos correspondientes al diseño.**

Trat.	días	Acidez total (g/L)	Etanol (g/L)	Trat.	días	Acidez total (g/L)	Etanol (g/L)
T1	0	20,55	33,51	T4	2	38,64	24,04
T1	1	25,88	24,25	T4	3	43,71	19,66
T1	2	35,55	17,76	T4	4	45,84	9,92
T1	3	42,36	8,35	T4	5	50,96	0,18
T1	4	48,95	0,24	T4	6	20,89	32,55
T1	5	21,02	32,97	T4	7	28,16	29,38
T1	6	26,56	23,62	T4	8	38,96	26,09
T1	7	34,92	15,98	T4	9	42,72	19,54
T1	8	45,41	7,63	T4	10	44,97	10,15
T1	9	49,98	0,58	T4	11	50	0,21
T2	0	23,62	40,03	T5	0	22,97	40,49
T2	1	36,51	37,51	T5	1	27,65	36,62
T2	2	40,74	33,46	T5	2	39,44	32,75
T2	3	47,87	25,53	T5	3	46,03	15,92
T2	4	50,71	12,11	T5	4	48,01	7,81
T2	5	53,98	1,31	T5	5	55,81	0,95
T2	6	23,78	39,97	T5	6	23,05	39,97
T2	7	37,54	36,04	T5	7	28,57	37,62
T2	8	43,54	32,78	T5	8	38,71	31,92
T2	9	46,58	23,97	T5	9	45,96	16,23
T2	10	52,2	13,52	T5	10	49,05	8,12
T2	11	54,06	1,76	T5	11	56	1,01
T3	0	24,31	47,55	T6	0	25,08	49,02
T3	1	27,96	44,94	T6	1	27,73	45,65
T3	2	39,96	40,35	T6	2	33,2	39,03
T3	3	46,44	36,98	T6	3	41,76	32,08
T3	4	48,76	26,22	T6	4	43,32	25,12
T3	5	52,55	15,48	T6	5	47,52	21,06
T3	6	58,83	4,72	T6	6	55,64	17,03
T3	7	25,01	48,05	T6	7	58,98	5,03
T3	8	28,32	45,81	T6	8	25,56	48,31
T3	9	38,54	41,76	T6	9	26,94	46,71
T3	10	43,44	36,55	T6	10	32,28	38,03
T3	11	46,66	23,66	T6	11	44,67	36,95
T3	12	54,24	13,22	T6	12	46,55	28,87
T3	13	59,32	3,78	T6	13	49,21	25,84
T4	0	21,43	31,98	T6	14	56,92	18,81
T4	1	29,03	28,63	T6	15	59,31	5,56



### ANEXO 3.

**Rendimientos (%), obtenidos en los dos ciclos de cada tratamiento al finalizar la fermentación acética.**

Tratamientos	Ciclos	Rendimiento %
1	1	82,35
	2	84,82
	$\sigma$	1,75
2	1	75,62
	2	76,31
	$\sigma$	0,64
3	1	73,69
	2	72,87
	$\sigma$	0,58
4	1	85,59
	2	84,04
	$\sigma$	1,09
5	1	77,46
	2	77,82
	$\sigma$	0,25
6	1	74,33
	2	75,48
	$\sigma$	0,81

#### ANEXO 4.

Contenido de antocianinas (mg/L) de cada tratamiento al término de la fermentación acética.

Tratamientos	Ciclos	Rendimiento %
1	1	136,76
	2	135,44
	$\sigma$	0,93
2	1	159,31
	2	161,03
	$\sigma$	1,22
3	1	188,81
	2	189,55
	$\sigma$	0,52
4	1	207,40
	2	205,88
	$\sigma$	1,07
5	1	218,42
	2	220,35
	$\sigma$	1,36
6	1	246,48
	2	244,83
	$\sigma$	1,67

## ANEXO 5.

### Resultados de la evaluación sensorial.

Trat	Juez	Int.arom	Color	S.ácido	N.a.s.ácido	I.gen
T1	1	3	5	9	11,1	4
T1	1	2	5	6,7	7,8	3
T1	1	3	5	8,8	13,8	4
T2	1	2	5	10,5	8,7	4
T2	1	4	5	12,3	12,3	4
T2	1	4	5	10,6	11,4	4
T3	1	4	5	6	8,1	3
T3	1	3	5	11,5	11	4
T3	1	2	5	9,5	9,2	3
T4	1	3	5	8,8	10,2	4
T4	1	2	5	8,8	9,4	4
T4	1	3	5	11,8	13	4
T5	1	2	5	12	12	4
T5	1	3	5	8,6	13,1	4
T5	1	2	5	8,3	10,1	3
T6	1	4	5	8	9,2	3
T6	1	4	5	13,3	7,1	3
T6	1	4	5	12,6	12,2	4
T1	2	4	4	7,6	8,1	3
T1	2	4	4	12,8	12,4	4
T1	2	3	4	8,7	9,7	3
T2	2	3	4	12,3	11,8	4
T2	2	4	4	12,8	12,4	4
T2	2	3	4	11,2	12,5	3
T3	2	3	4	7,6	8,1	3
T3	2	3	4	12,3	9,3	3
T3	2	5	4	11,2	12,5	4
T4	2	4	4	7,6	8,1	3
T4	2	3	4	12,3	9,3	3
T4	2	4	4	11,2	12,5	4
T5	2	5	4	12,9	11,8	4
T5	2	4	4	12,8	12,4	4
T5	2	3	4	8,7	9,7	3
T6	2	3	4	7,6	8,1	3
T6	2	4	4	12,8	12,4	4
T6	2	4	4	11,2	12,5	4
T1	3	3	5	11,3	5,1	3
T1	3	4	5	11,3	9,7	4
T1	3	4	4	9,7	2,8	2
T2	3	4	3	12,6	3,7	3
T2	3	4	5	12,6	11,8	5
T2	3	4	4	11,8	6,1	3
T3	3	4	4	7,5	2,3	2
T3	3	4	4	10,4	8,5	3
T3	3	4	5	8,9	2,2	2
T4	3	4	4	8,6	7,3	4
T4	3	4	4	10,8	6,8	2

## (Continuación ANEXO 5)

T4	3	4	5	11,5	5,7	3
T5	3	4	4	12	10,2	4
T5	3	4	5	11,7	7,7	3
T5	3	4	4	11,1	1,8	2
T6	3	4	3	9,8	6,1	4
T6	3	4	5	13,3	8,9	4
T6	3	4	4	12,3	9	4
T1	4	2	3	11,4	11,5	3
T1	4	3	4	11,2	8,8	3
T1	4	4	4	12	7,2	4
T2	4	3	4	11,9	8	3
T2	4	3	4	10,5	8,2	3
T2	4	4	2	11,3	7,9	2
T3	4	3	3	9,6	8,9	2
T3	4	4	4	13,5	9,6	4
T3	4	3	2	11,6	7,6	3
T4	4	3	4	13,8	10,7	4
T4	4	3	4	8,2	6,5	3
T4	4	3	2	12,6	9,7	3
T5	4	3	4	12,7	10,1	3
T5	4	3	4	9,2	9,2	4
T5	4	3	2	10,5	6,8	3
T6	4	4	4	13,2	9,4	2
T6	4	3	4	7,1	10,9	3
T6	4	3	4	12,9	8,9	4
T1	5	3	2	12	10,4	4
T1	5	3	5	7,4	7,5	3
T1	5	2	4	11,4	9,1	4
T2	5	3	5	11,1	11	4
T2	5	4	4	11,9	11,4	5
T2	5	2	4	9	7,6	3
T3	5	1	3	6,4	6,2	2
T3	5	2	5	9,8	9,5	3
T3	5	3	5	11,9	10,3	5
T4	5	3	4	10,5	9,4	4
T4	5	3	3	8,2	8,5	3
T4	5	4	5	13,3	11,8	5
T5	5	4	5	12,9	12,3	5
T5	5	4	4	12,8	12,3	4
T5	5	3	3	9,6	8,3	3
T6	5	2	3	9,4	8,1	3
T6	5	2	4	10,7	10,3	4
T6	5	4	4	12,5	11	5
T1	6	3	4	8,7	12	4
T1	6	4	4	14,4	6,5	3
T1	6	2	4	7,8	4,5	4
T2	6	4	4	10,7	11,5	3
T2	6	3	4	13,9	8,5	3
T2	6	1	4	7,2	7,2	4

(Continuación ANEXO 5)

T3	6	3	4	9,3	8,5	3
T3	6	4	4	13,3	11,1	4
T3	6	3	4	9,7	4	3
T4	6	3	4	9,3	14	4
T4	6	3	4	10,3	13,3	4
T4	6	2	4	9,1	6,7	3
T5	6	4	4	12,9	12,9	4
T5	6	4	4	10,8	12,2	4
T5	6	2	4	6,6	5,2	4
T6	6	4	4	10,1	10,3	3
T6	6	4	4	11,2	5,5	3
T6	6	3	4	11,6	5,9	3
T1	7	3	4	10,1	9,2	4
T1	7	3	4	7,1	7,7	3
T1	7	3	4	6,5	7,7	3
T2	7	3	4	10,5	9,5	3
T2	7	3	4	7,7	7,1	3
T2	7	3	4	7,5	8	3
T3	7	2	4	8,4	8,1	3
T3	7	4	4	11,7	11,3	4
T3	7	3	4	8	8,7	3
T4	7	2	4	9,4	7,2	3
T4	7	3	4	10,7	10,8	4
T4	7	3	4	10,4	10,1	4
T5	7	3	4	9,7	9,8	4
T5	7	3	4	9,2	9,9	3
T5	7	3	4	6,9	8,4	3
T6	7	3	4	8,7	8,5	3
T6	7	2	4	6,4	8,1	3
T6	7	4	4	11,2	10,9	4
T1	8	4	2	9,1	6,6	3
T1	8	3	2	7,5	6,8	4
T1	8	4	3	8,1	6,7	4
T2	8	4	2	9,2	5,9	4
T2	8	4	2	9	5,1	3
T2	8	4	3	7,2	8,2	4
T3	8	3	3	7,4	7,9	4
T3	8	4	3	8,3	6,2	4
T3	8	3	2	7,4	7	3
T4	8	4	2	9,4	6,3	3
T4	8	4	3	7,8	6,3	3
T4	8	4	3	8,4	7,2	3
T5	8	4	2	8,7	5,4	4
T5	8	4	2	8,5	5,7	3
T5	8	3	2	7,1	6,9	3
T6	8	3	3	7,5	8,8	3
T6	8	3	2	7,6	6,6	3
T6	8	4	2	7,8	7,8	3