

FACULTAD DE INGENIERÍA

Carrera de Ingeniería Agroindustrial



“Vinagre de arándano: Mejora del perfil bioactivo mediante aplicación de estrategias tecnológicas previo a la etapa de fermentación alcohólica”

Tesis para optar el título profesional de:

Ingeniero Agroindustrial

Autores:

- Angie Pamela Gil Calderón
- Maickol Andy Cano Otañe

Asesor:

Dr. Ricardo David Vejarano Mantilla

Trujillo - Perú

2019

DEDICATORIA

A nuestros padres por su esfuerzo, sacrificio, confianza y apoyo incondicional brindado a lo largo de nuestra vida universitaria. A nuestras amistades por las experiencias y tiempo compartido.

AGRADECIMIENTO

A nuestro Creador.
A nuestro asesor por su apoyo brindado todo este tiempo.
A nuestros padres por sus muestras de amor desinteresado.
Y a todos lo que de manera indirecta nos brindaron soporte y confiaron en nosotros.

Tabla de contenidos

ACTA DE AUTORIZACIÓN PARA SUSTENTACIÓN DE TESIS; Error! Marcador no definido.	
ACTA DE APROBACIÓN DE LA TESIS	;Error! Marcador no definido.
DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTO.....	3
ÍNDICE DE TABLAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	5
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	11
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	32
CAPÍTULO III. RESULTADOS	46
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	59
REFERENCIAS	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Beneficios del consumo de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i>).....	12
Tabla 2: Valor FOB (en miles de dólares) de las exportaciones de arándano a los países principales destino en el periodo 2013 – 2018.....	14
Tabla 3: Composición química del arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i>).....	15
Tabla 4: Definiciones de vinagre según distintas entidades.....	18
Tabla 5: Variedades de vinagre.....	19
Tabla 6: Compuestos volátiles presentes en el vinagre.....	24
Tabla 7: Beneficios sobre la salud aportados por el vinagre.....	26
Tabla 8: Estrategias tecnológicas para mejorar la extracción y estabilidad de compuestos bioactivos durante la elaboración de los vinos y vinagres.....	27
Tabla 9: Diseño completamente al azar aplicado en la Fase 1.....	35
Tabla 10: Diseño bifactorial aplicado en la Fase 2.....	36
Tabla 11: Diseño aplicado en la Fase 3.....	36
Tabla 12: Operacionalización de las variables.....	39
Tabla 13: Caracterización de los mostos antes de la fermentación.....	48
Tabla 14: Grado alcohólico (% v/v), intensidad colorante (IC) y antocianos monómeros totales (AMT) en los vinos A y B (medias \pm desviaciones estándar).....	49
Tabla 15: Intensidad colorante (IC) y antocianos monómeros totales (AMT) en los vinagres A y B (medias \pm desviaciones estándar).....	50
Tabla 16: Caracterización de los mostos antes de la fermentación.....	51
Tabla 17: Grado alcohólico (GA), intensidad colorante (IC) y antocianos monómeros totales (AMT) en los vinos (medias \pm desviaciones estándar).....	52
Tabla 18: Intensidad colorante (IC) y antocianos monómeros totales (AMT) en los vinagres (medias \pm desviaciones estándar).....	53
Tabla 19: Caracterización de los mostos antes de la fermentación.....	53
Tabla 20: Intensidad colorante (IC) y antocianos monómeros totales (AMT) en los vinos obtenidos tras la fermentación (medias \pm desviaciones estándar).....	54
Tabla 21: Intensidad colorante (IC) y antocianos monómeros totales (AMT) en los vinagres obtenidos (medias \pm desviaciones estándar).....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1:</i> Valor FOB (en miles de dólares) de las exportaciones de arándano en el periodo 2013-2018.	14
<i>Figura 2:</i> Conversión de la glucosa/fructosa en etanol por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y posterior conversión a ácido acético por <i>Acetobacter aceti</i>	20
<i>Figura 3:</i> Proceso bioquímico implicado en la elaboración de vinagre.....	21
<i>Figura 4:</i> Ruta Embden-Meyerhof-Parnas utilizada por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para la producción de etanol (las enzimas responsables de cada conversión química se indican en letras de color rojo).	22
<i>Figura 5:</i> Diagrama de proceso de obtención de vinagre de arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i>) y los análisis realizados.	38
<i>Figura 6:</i> Diagrama de operaciones del proceso de elaboración de vino de arándano.	45
<i>Figura 7:</i> Evolución de la acidez total en los vinagres A y B. Barras en vertical representan desviación estándar.	49
<i>Figura 8:</i> Porcentaje de inhibición del radical DPPH en los vinagres A y B.	50
<i>Figura 9:</i> Capacidad antioxidante de los vinagres A y B expresada en mg/l de ácido ascórbico.	51
<i>Figura 10:</i> Evolución de la acidez total en los vinagres A, A-ch, B y B-ch hasta alcanzar una acidez total de 50 g/l. Los puntos señalados son datos experimentales. Barras en vertical representan desviación estándar.	52
<i>Figura 11:</i> Fenoles totales de los vinos A, A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s (mg ácido gálico/litro). Letras diferentes en las barras indican diferencia significativa (LSD de Fisher).....	54
<i>Figura 12:</i> Porcentaje de inhibición del radical DPPH en los vinos A, A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s. Letras diferentes en las barras indican diferencia significativa (LSD de Fisher).	55
<i>Figura 13:</i> Capacidad antioxidante en los vinos A, A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s expresado como miligramos ácido ascórbico/litro del DPPH. Letras diferentes en las barras indican diferencia significativa (LSD de Fisher).	55
<i>Figura 14:</i> Acidez (g/l de ácido acético) alcanzada en los vinagres A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s, tras 50 días de fermentación acética. Letras diferentes en las barras indican diferencia significativa (LSD de Fisher).	56
<i>Figura 15:</i> Fenoles totales de los vinagres A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s (miligramos ácido gálico/litro). Letras diferentes en las barras indican diferencia significativa (LSD de Fisher).57	57
<i>Figura 16:</i> Porcentaje de inhibición del radical DPPH en los vinagres A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s. Letras diferentes en las barras indican diferencia significativa (LSD de Fisher).	57
<i>Figura 17:</i> Capacidad antioxidante en los vinagres A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s expresado como miligramos ácido ascórbico/litro del DPPH. Letras diferentes en las barras indican diferencia significativa (LSD de Fisher).	58
<i>Figura 18:</i> Etapas en la maduración de la baya en intervalos de 10 días a partir de la floración.	62

RESUMEN

El consumo de alimentos ricos en antocianos como el arándano (*Vaccinium corymbosum*), puede ayudar a prevenir diversas enfermedades debido a su capacidad antioxidante y antiinflamatoria. Al ser un producto perecedero y con considerables excedentes no exportables (hasta el 10%), una alternativa de uso y consumo sería a través de la producción de vinagre. Esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de dos cepas de levadura, enriquecimiento azucarado (*chaptalización*) del jugo de arándano, y aplicación de radiación microondas en las bayas de arándano, como estrategias tecnológicas sobre el perfil bioactivo del vino base en la etapa de fermentación alcohólica, como etapa previa para la elaboración del vinagre, midiendo entre otros parámetros, los contenidos de compuestos fenólicos, principalmente antocianinas monoméricas totales (AMT) y la capacidad antioxidante. El trabajo de investigación se dividió en tres fases: en la primera fase, la fermentación alcohólica se realizó con dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*: 7VA (cepa de vino) y US-05 (cepa de cerveza), seguido de la fermentación acética respectiva con la bacteria *Acetobacter aceti*, obteniendo vinagres con un contenido de AMT de 71.30 y 110.55 mg/l. Para la segunda fase, se aplicó un enriquecimiento azucarado (*chaptalización*) al jugo de arándano (hasta alcanzar 22.6 °Brix) antes de la fermentación alcohólica, para mejorar la extracción de compuestos fenólicos. En la tercera fase, se aplicaron tratamientos de radiación de microondas a las bayas de arándano para mejorar la extracción de compuestos fenólicos durante la producción del vino base. No se encontraron mejoras significativas en el contenido de AMT ni en la intensidad colorante, sin embargo se demostró un efecto sobre la capacidad antioxidante. En todas las fases, en la conversión del vino base en vinagre se observó una reducción del contenido de AMT, variando estos porcentajes de pérdida en un rango de 60-90%. En conclusión, se

obtuvieron los mejores resultados en los parámetros evaluados, en los vinagres en cuya etapa de fermentación alcohólica, se realizó el enriquecimiento del jugo de arándano con azúcares exógenos (aplicación de *chaptalización*).

Palabras clave: arándano, vinagre de arándano, fermentación acética, *Acetobacter aceti*, chaptalización, radiación de microondas.

ABSTRACT

The consumption of foods with high contents of anthocyanins, such as blueberry (*Vaccinium corymbosum*), can help to prevent various diseases due to its antioxidant and anti-inflammatory capacity. Being a perishable product and with considerable non-exportable surpluses (up to 10%), an alternative of use and consumption would be through vinegar production. This research aimed to evaluate the effect of two strains of yeast, sweetened enrichment (*chaptalization*) of blueberry juice, and application of microwave radiation in berries, as technological strategies on the bioactive profile of the base wine in the fermentation stage alcoholic, as a previous stage for the production of vinegar, measuring among other parameters, the contents of phenolic compounds, mainly total monomeric anthocyanins (AMT) and antioxidant capacity. The research work was divided into three phases: in the first phase, the alcoholic fermentation was carried out with two strains of *Saccharomyces cerevisiae*: 7VA (wine strain) and US-05 (beer strain), followed by the respective acetic fermentation with *Acetobacter aceti* bacteria, obtaining vinegars with an AMT content of 71.30 and 110.55 mg / l. For the second phase, a sugary enrichment (*chaptalization*) was applied to blueberry juice (until reaching 22.6 ° Brix) before alcoholic fermentation, to improve the extraction of phenolic compounds. In the third phase, microwave radiation treatments were applied to cranberry berries to improve the extraction of phenolic compounds during the production of the base wine. No significant improvements were found in AMT content or coloring intensity, however an effect on antioxidant capacity was demonstrated. In all the phases, in the conversion of the base wine into vinegar a reduction of the AMT content is modified, these loss percentages varying in a range of 60-90%. In conclusion, we obtained the best results in the parameters evaluated,

in the vinegars in our alcoholic fermentation stage, we obtained the enrichment of the blueberry juice with exogenous sugars (application of *chaptalization*).

Keywords: blueberry, blueberry vinegar, acetic fermentation, *Acetobacter aceti*, chaptalization, microwave radiation.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Realidad problemática

En los últimos años viene creciendo la demanda de alimentos que además de nutrir aporten otros beneficios para la salud. De especial interés son los alimentos ricos en antocianos, que además de conferir el color característico a productos como el arándano, posee una alta capacidad antioxidante, antiinflamatoria, y de protección frente a enfermedades cardiovasculares, incidencia de cáncer y aportar efecto antimicrobiano (Jiang, Yang y Shi, 2017; Pervin et al., 2016; Skrovankova, Sumczynski, Mlcek, Jurikova y Sochor, 2015).

Entre las enfermedades con mayor prevalencia en Perú, de acuerdo con el Ministerio de Salud (2019), se encuentra el cáncer. Cada año se diagnostican más de 66 000 casos nuevos de cáncer, cuyo incremento se atribuye a factores de riesgo como el consumo de tabaco, consumo de alcohol, sedentarismo, sobrepeso y obesidad, así como a una baja ingesta de alimentos con poder antioxidante, principalmente frutas y hortalizas. Uno de esos alimentos es el arándano, por lo beneficios previamente mencionados (Jiang et al., 2017).

Otras enfermedades con mayor incidencia en el Perú, según el Ministerio de Salud (2019) son las enfermedades cardiovasculares (ECV) (arritmia, insuficiencia cardíaca, hipertensión arterial e infarto al miocardio). De acuerdo con el estudio realizado por Deloitte Perú, las enfermedades al corazón son una de las principales causas de muerte en la población adulta. En la actualidad el 16% de la población peruana mayor de 20 años padece de males al corazón y cerca de 2 000 personas por año fallecen por alguna clase de insuficiencia cardíaca (Huerta, 2019). Una estrategia para reducir la incidencia de las ECV es el consumo de alimentos con alto contenido

de compuestos antioxidantes y antiinflamatorios, como por ejemplo el arándano (Skrovankova et al., 2015).

Los antioxidantes presentes en el arándano son sustancias que ayudan a neutralizar la acción de los inestables radicales libres, los cuales se asocian a numerosas enfermedades tales como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas, entre otras. Dentro de las sustancias con capacidad antioxidante que se puede encontrar en el arándano se encuentran el β -caroteno, vitamina C, antocianinas, compuesto fenólicos, ácido elágico y ácido fólico (Shellapan, Akoh y Krewer, 2002; Sapers et al., 1984), siendo mayoritarios los antocianos, que además confieren el color característico a esta fruta.

En la *Tabla 1*, se muestran los efectos atribuidos al consumo de esta fruta sobre la salud de las personas gracias a su capacidad antioxidante (Zheng y Wang, 2003; Moyer, Hummer, Finn, Frei y Wrolstad, 2002).

Tabla 1:

Beneficios del consumo de arándano (Vaccinium corymbosum).

	BENEFICIO	FUENTE
Beneficio oftalmológico	Mejora del suministro de sangre y oxígeno al ojo, y eliminación de radicales libres que contribuyen a la catarata y a la degeneración macular	Caló y Marabini (2014)
Beneficio contra la osteoporosis	Proantocianidinas, antocianinas y otros flavonoides: beneficiosos para la protección ósea	Shen et al. (2012)
Beneficio contra la diabetes	Protección de las células β pancreáticas frente al estrés oxidativo inducido por la glucosa. Mejora en la sensibilidad a la insulina en personas resistentes a la insulina que consumen bebidas de arándanos	Al-Awwadi et al. (2005); Martineau et al. (2006) y Stull, Cash, Johnson, Champagne y Cefalu (2010)

Beneficio contra el colesterol	Disminución de la presión arterial y de los niveles de colesterol en sangre	Basu et al. (2010); Prior et al. (2009) y Wu et al. (2010)
Beneficio anticancerígeno	El efecto sinérgico de los compuestos fenólicos y del ácido ascórbico se correlaciona con la inhibición de la proliferación de células cancerosas y retrasa el crecimiento de células tumorales	Schantz, Mohn, Baum, Richling (2010); Liu, Zhang, Jing y Popovich (2010); Srivastava, Akoh, Fischer y Krewer (2007) y MINAGRI (2016)
Beneficio cardiovascular	Protección frente al daño al ADN	
	Protección contra el daño oxidativo en las lipoproteínas de baja densidad, proceso esencial en la aparición de problemas cardiovasculares	
Beneficios contra el envejecimiento	Mejora de la función cerebral y retraso del declive relacionado con el envejecimiento	MINAGRI (2016)
Beneficios contra las infecciones urinarias	Protección frente a bacterias causantes de infecciones del tracto urinario	

El arándano (*Vaccinium corymbosum*) se ha convertido en uno de los frutos más apetecibles en el mercado internacional, siendo catalogado como *superalimento*, con excelentes propiedades nutritivas y capacidad antioxidante (Gutiérrez et al., 2017; MINAGRI, 2016).

El arándano ha llegado a ocupar un posicionamiento importante en las exportaciones del Perú, que en el 2018 representaron más de 547 937 millones de dólares, de acuerdo con la Superintendencia Nacional de Aduana y Administración Tributaria (SUNAT, 2018), debido a que, en los últimos años, su demanda en países extranjeros ha aumentado notablemente, tal y como se muestra en la *Figura 1*.

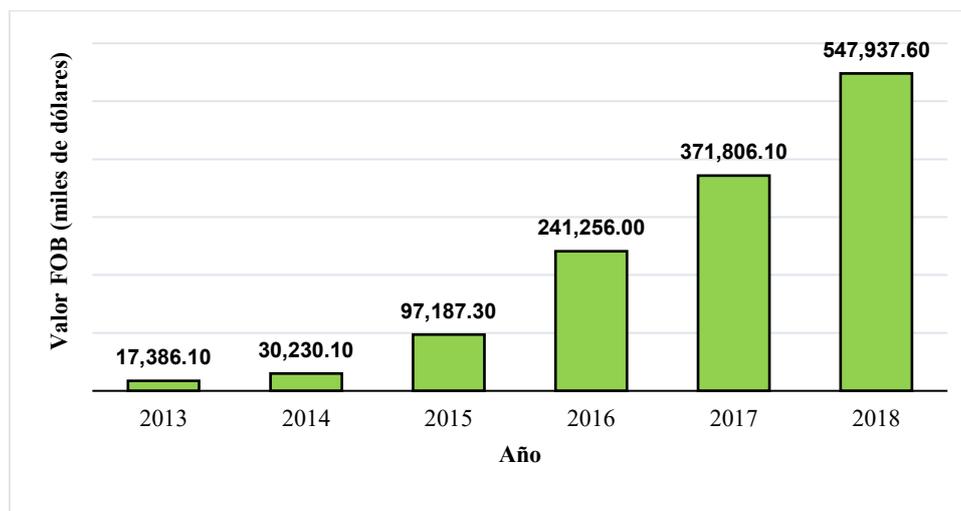


Figura 1: Valor FOB (en miles de dólares) de las exportaciones de arándano en el periodo 2013-2018 (SUNAT, 2019).

Entre los países con mayor demanda de este fruto están Estados Unidos, Holanda y Reino Unido (Tabla 2).

Tabla 2:

Valor FOB (en miles de dólares) de las exportaciones de arándano a los países principales destino en el periodo 2013 – 2018.

País	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Estados Unidos	-	-	-	129,009.90	166,119.80	282,283.30
Países Bajos	-	-	27,171.40	56,472.60	100,689.90	122,365.60
Reino Unido	-	3,151.40	12,177.60	35,401.80	39,698.50	56,710.20
China	-	-	-	-	33,248.80	33,289.70
España	-	-	-	-	-	21,193.60
Canadá	-	-	-	5,086.00	7,587.80	13,990.10
Hong Kong	3,701.60	5,916.50	1,419.90	4,417.10	13,957.90	11,312.70
Tailandia	-	-	-	546.70	903.60	1,158.90
Singapur	-	113.60	485.90	1,651.10	1,234.90	706.00

Fuente: SUNAT (2019).

Una de las principales razones para la alta aceptabilidad de esta baya en el extranjero la determina su composición nutricional y nutraceutica (Pino, 2007). Su consumo es

recomendable a todo tipo de personas, resaltando su bajo contenido calórico y alto contenido de fibra, su elevado aporte de potasio y vitaminas A y C. Respecto a su contenido de azúcares totales (glucosa y fructuosa principalmente), este oscila en un rango de 10-14%, de los cuales cerca de un 95% corresponde a azúcares reductores como se observa en la *Tabla 3*. El principal ácido presente es el ácido cítrico, seguido del málico. Además, posee un alto contenido de antocianinas en torno a 235 mg/100 g peso fresco (Prior et al., 1998), responsables de brindar color al fruto, siendo el contenido fenólico total cercano al 0.4% (Dinamarca, Poblete y Sánchez, 1986; USDA, 2019).

Tabla 3:

Composición química del arándano (Vaccinium corymbosum).

Componente (por cada 100 g)	Dinamarca <i>et al.</i> (1986)	USDA (2019)
Agua	83.2 g	84.21 g
Carbohidratos	15.3 g	14.49 g
Fibras	1.5 g	2.4 g
Proteínas	0.7 g	0.74 g
Grasas	0.5 g	0.33 g
Pectinas	0.5 g	NR
Azúcares totales	10.0-14.0 g	9.96 g
Sacarosa	0.24 g	NR
Fructuosa	4.04 g	NR
Glucosa	3.92 g	NR
Contenido de sólidos solubles	10.1-14.2 g	NR
Acidez titulable	0.3-0.38 g	NR
Vitamina A	100 IU**	54 IU**
Ácido ascórbico	14 mg	9.7 mg
Calcio	NR	6 mg
Hierro	NR	0.28 mg
Magnesio	NR	6 mg
Fósforo	NR	12 mg
Potasio	NR	77 mg
Sodio	NR	1 mg

Zinc	NR	0.16 mg
Tiamina	NR	0.037 mg
Riboflavina	NR	0.041 mg
Niacina	NR	0.418 mg
Vitamina E	NR	0.57 mg

*NR: No reportado

**IU: Unidad Internacional. 1UI = 0.3 μg retinol = 1.8 μg β -caroteno (Food and Agriculture Organization of the United Nations).

Respecto a la disponibilidad de esta fruta, en el Perú, una de las regiones con mayor producción de arándano es La Libertad, donde se localizan un considerable número de empresas dedicadas a su producción y exportación. La Libertad representa el 90% de la producción total nacional, estimándose una producción exportable aproximada de 42 mil toneladas en el año 2017 (SUNAT, 2018). Otras regiones que producen esta baya son Lambayeque, Ica, Lima, Áncash y Cajamarca.

Del total de la producción nacional de arándano, cerca del 80 al 85% es exportado como arándano fresco, mientras que entre el 10 y 12% se comercializa como arándano congelado y un remanente que representa en muchos casos hasta un 10%, denominado “descarte”, que es comercializado en los mercados locales a bajos precios (entre 4 a 12 soles el kilogramo) (MINAGRI, 2016).

Este descarte se convierte en una cantidad significativa, puesto que, si se toma como referencia el total de kilogramos exportados en el año 2017 (54 943 210 kg) (SUNAT, 2018), la cifra de descarte de arándano equivaldría a 5 494 321 kg. Esta considerable cantidad, no se exporta debido a que no cumple con las especificaciones necesarias y requeridas para ser exportado, ya sea por defectos debido a prácticas inadecuadas durante el cultivo y/o durante la cosecha del fruto, malas condiciones climatológicas, e incluso a la presencia de agentes biológicos que

pueden atacar los cultivos como aves, roedores, plagas o enfermedades, etc. (Gutiérrez y Sánchez, 2014; Munitz, 2013).

Para las empresas exportadoras es más sencillo vender este descarte a precios bajos en el mercado local, donde son utilizados en el desarrollo de postres y bebidas. La desventaja de estos productos procesados radica en una disminución de su perfil bioactivo dado que su procesamiento implica la utilización de altas temperaturas, las cuales degradan los antocianos y la vitamina C, principales compuestos bioactivos presentes en el arándano.

Por otro lado, una porción de este descarte de arándano se vende en los mercados locales al menudeo, y en la mayoría de los casos llegan al consumidor final en avanzado estado de madurez, debido a la falta de óptimas condiciones de conservación (cadena de frío) durante la comercialización, acortando así su tiempo de vida útil.

Por otro lado, a pesar del menor precio al que se puede encontrar en el mercado local, gran parte no es transformado en productos que garanticen un beneficio económico para las empresas transformadoras, dado que en la mayoría de los casos a partir de este descarte se elaboran productos cuyo margen de utilidad no siempre es alto. Se estima que este porcentaje de descarte incrementará en los próximos años debido a las mayores exigencias del mercado, lo que conlleva al desarrollo de productos alternativos que confieran un valor agregado a estos excedentes, aprovechando su contenido de antocianos y vitamina C.

Para mantener las propiedades antioxidantes de estos productos, una opción apropiada sería la transformación en pasas de arándano, elaboración de jugos, mermeladas, bebidas alcohólicas (Almenar, Auras, Rubino y Harte, 2007; Oliveira, Becker, Villar y Salas, 2007; Barba, Esteve y Frigola, 2013; Chiabrando y Giacalone, 2011). Siendo una de las opciones más apropiadas la elaboración de bebidas fermentadas. Por ejemplo, el desarrollo de vinos y vinagres.

1.2. Marco teórico

1.2.1. El vinagre

Este producto tiene varias definiciones de acuerdo con diferentes entidades, sin embargo, todas coinciden en que es producto de la fermentación acética de una bebida alcohólica, es decir que se elabora a partir de un vino base.

Tabla 4:

Definiciones de vinagre según distintas entidades.

Definición	Fuente
Producto líquido preparado a partir de la fermentación alcohólica y posterior fermentación acética de cualquier alimento adecuado. Puede contener conservantes permitidos, el caramelo como sustancia colorante y especias como sustancias aromatizantes permitidas.	Food Regulation (1985)
Producto líquido apto para el consumo humano y producido exclusivamente a partir de productos aptos que contienen almidón o azúcares o almidón y azúcares por procesos de fermentación doble (alcohólica y acética). No debe contener más de 0.5% de alcohol y no debe contener menos de 50 g/L (p/v) de ácido acético.	Comisión del Codex Alimentarius (1987)
Producto obtenido por fermentación alcohólica y de ácido acético de cualquier medio adecuado tal como fruta, malta o melaza, con o sin la adición de caramelo y especias. La acidez no debe ser menor de 3.75% (m/v).	Autoridad de Seguridad Alimentaria y Normas de la India (2012)
Es el líquido apto para el consumo humano resultante de la doble fermentación alcohólica y acética de productos de origen agrario.	Real Decreto Español 661(2012)

En general, en el mundo existen diversas variedades de vinagre, en función de la materia prima de la que provienen, como se muestra en la *Tabla 5*.

Tabla 5:

Variedades de vinagre.

VARIEDAD DE VINAGRE	FUENTE
Vinagre de arroz	Yano, Aimi, Nakano & Tamai (1997)
Vinagre balsámico	Wai Ho, Mat Lazim, Fazry, Hussain Zaki & Joe Lim (2016)
Vinagre de Jerez Vinagre balsámico de Modena	Pizarro, Esteban, Sáenz y González (2008)
Vinagre negro	Nishidai et al. (2000)
Vinagre de Sichuan Vinagre Shanxi	Zou, Li, Shi, Huang & Zhao (2012)
Vinagre de extracto de cebolla	Horiuchi, Kanno & Kobayashi (1999)
Vinagre de tomate	Lee et al. (2013)
Vinagre de bambú	Mu, Yu, Wu & Wu (2006)
Vinagre de avena Vinagre de Zhenjiang	Qui, Ren, Fan & Li (2010); Verzelloni, Tagliazucchi & Conte (2007)
Vinagre de arándano	Su & Chien (2007)
Vinagre de manzana	Sakanaka & Ishihara (2008)
Vinagre de fresa	Úbeda, Callejón, Hidalgo, Torija, Troncoso y Morales (2013)

El proceso de elaboración del vinagre incluye dos tipos de fermentación: alcohólica y acética, ambas de manera secuencial (*Figura 2*).

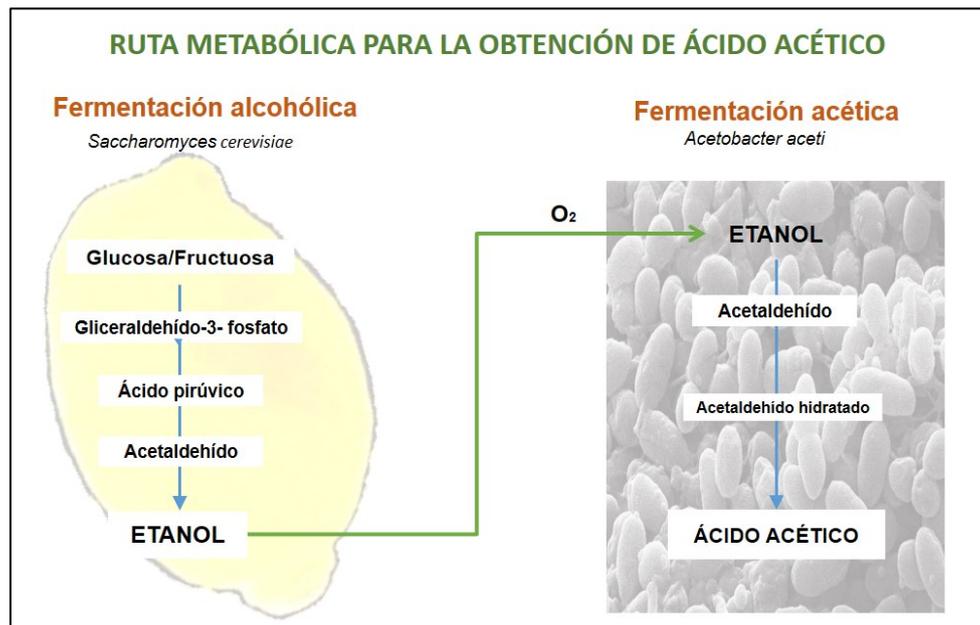


Figura 2: Conversión de la glucosa/fructosa en etanol por *Saccharomyces cerevisiae* (Adaptado de Vejarano, 2013) y posterior conversión a ácido acético por *Acetobacter aceti*.

En la fermentación alcohólica los azúcares se convierten en etanol en condiciones anaeróbicas, mientras que en la fermentación acética el etanol se oxida a ácido acético en aerobiosis (Budak et al. 2014). La Figura 3 muestra el proceso general implicado.

1.2.1.1 Primera etapa: elaboración del vino base

Para la obtención del vino, el jugo de la fruta (mosto) debe pasar por un proceso de transformación, donde la glucosa y otros azúcares presentes son degradados hasta CO₂ y etanol. Este proceso es conocido como fermentación alcohólica, proceso biológico que se lleva a cabo en ausencia de O₂. La ruta de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) (Figura 4), explica la serie de secuencias metabólicas implicadas.

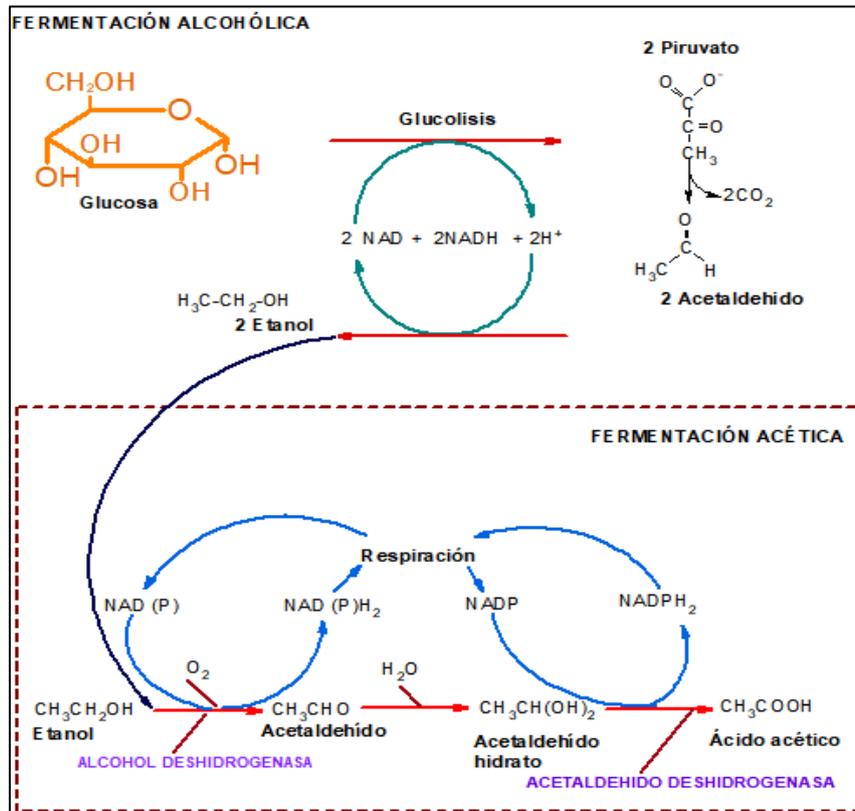


Figura 3: Proceso bioquímico implicado en la elaboración de vinagre.

Los responsables de este proceso son las levaduras, siendo *Saccharomyces cerevisiae* la especie más usada. En este proceso se obtienen, además del etanol y CO_2 , otros compuestos que contribuyen al sabor y aroma del vino (Corrales, Antolínez, Bohórquez y Corredor, 2015; Contreras y Del Campo, 2014; Vázquez y Dacosta, 2007).

EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

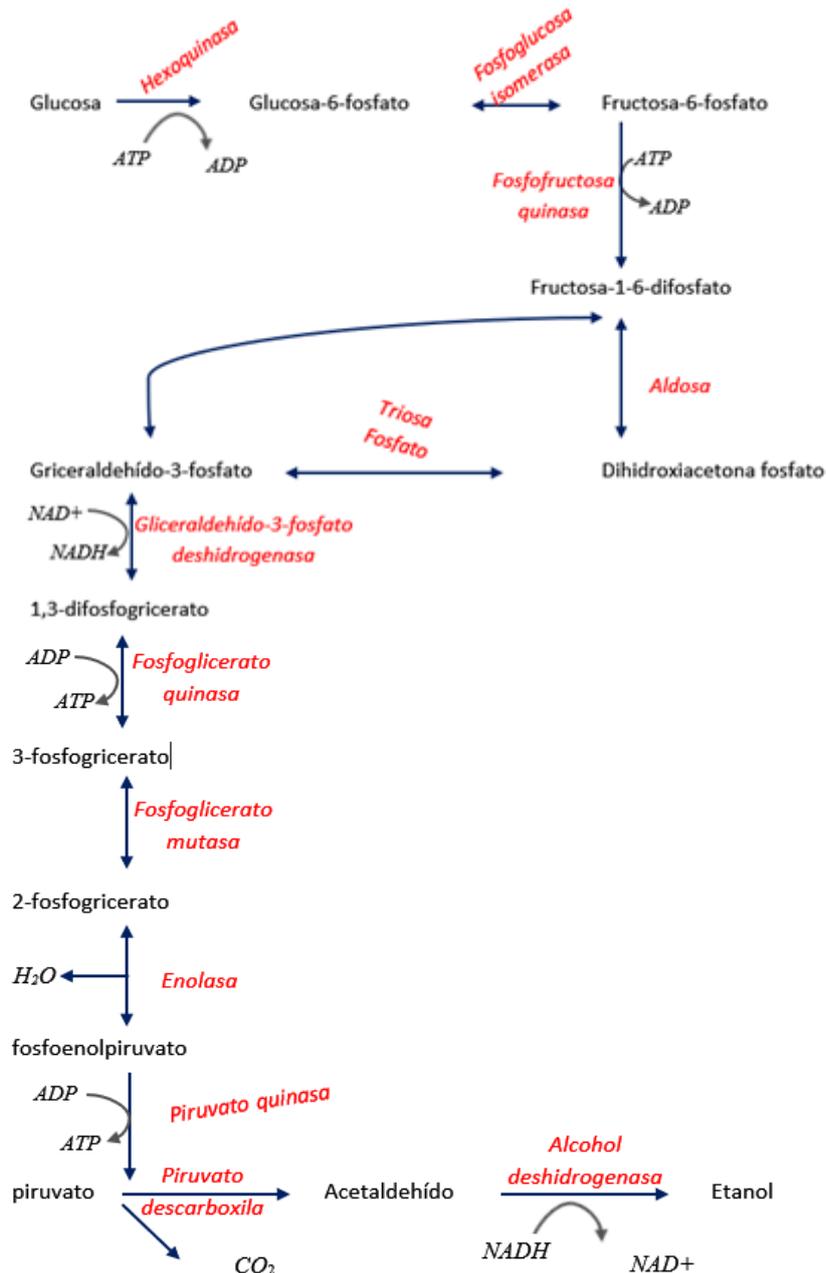
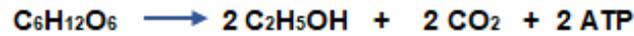


Figura 4: Ruta Embden-Meyerhof-Parnas utilizada por *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de etanol (las enzimas responsables de cada conversión química se indican en letras de color rojo).

Para la producción de vino se pueden usar como materia prima frutas como manzanas, uvas, peras, *berries* en general, ciruelas, así como miel y toda fuente con alto contenido de azúcares fermentables.

Esta es la etapa en la cual se puede lograr la mayor extracción de los compuestos de naturaleza primaria desde la materia prima, es decir aquellos compuestos de interés para elaborar un vino con determinado perfil. En el caso del arándano, para lograr la mayor extracción de compuestos fenólicos, principalmente antocianos, dado que es la etapa donde el hollejo está en contacto con el medio fermentativo, que a su vez actúa como lixivante, debido a que el componente principal es el etanol (Peña, 2006).

1.2.1.2 Segunda etapa: elaboración de vinagre

La conversión del etanol, obtenido en la etapa anterior, hasta ácido acético inicia con la oxidación del etanol en acetaldehído en presencia de la enzima *alcohol deshidrogenasa* (Raspor y Goranovic, 2008). Esta oxidación es llevada a cabo por bacterias acéticas, principalmente *Acetobacter*, gracias a la presencia de la enzima *acetaldehído deshidrogenasa* (Figura 3), que cataliza la conversión del alcohol etílico en ácido acético.

El ácido acético es el ácido orgánico con mayor importancia en la industria. No obstante, es necesario diferenciar entre la forma concentrada comercial o ácido acético glacial, y la forma de uso alimentario, base del vinagre.

El vinagre, de acuerdo con el Real Decreto Español 661/2012 debe tener como mínimo 5.0 % m/v de acidez total. En su elaboración no está permitida la adición de ácido acético exógeno. Además, el vinagre debe provenir de materias primas de origen agrario, que previamente han sido sometidas a fermentaciones alcohólica y acética, es decir que primero debe obtenerse un vino base u otra bebida alcohólica, a la cual tampoco se le debe adicionar etanol exógeno.

Además de ácido acético, durante la fermentación acética, se generan otros compuestos que son responsables del sabor y aroma del vinagre, tales como ácidos orgánicos, ésteres, cetonas, aldehídos, entre otros, mostrados en la *Tabla 6* (Ozturk et al., 2015), los cuales se suman a los ya sintetizados previamente durante la etapa de fermentación alcohólica.

Tabla 6:

Compuestos volátiles presentes en el vinagre.

FAMILIA	COMPUESTO	AROMA
Ácidos	Ácido hexanoico	Hierba, queso
	Ácido octanoico	Jabón, detergente, vela
	Ácido propiónico	Acre
	Ácido 3-hexenoico	Piñuela
	Ácido propanoico	Acre
	Ácido decanoico	Aceitoso, cítricos
	Ácido acético	Vinagre
	Ácido sórbico	Cosméticos
Alcoholes	Ácido isovalérico	Queso
	Alcohol fenético	Rosas
	1-pentanol	Desagradable
	Alcohol amílico	Alcohol
	Nonanol	Avellana, chocolate
	Alcohol isoamílico	Alcohol
	1-hexanol	Césped
	2-etil-1-hexanol	Floral
	1-penten-4-en-3-ol	Jamón curado
Alcohol fenol	Albahaca	
Alcanos	<i>Cis</i> -geraniol	Rosáceo
	n-hexadecano	Inodoro
	2-nonanone	Afrutado
Aldehídos	Vitispirano	Floral frutado
	<i>Trans</i> -2-heptenal	Verde intenso
	Benzaldehído	Almendra
	<i>Trans</i> -2-octanal	Pulpa de naranja
	n-decanol	Floral
Ésteres	2-furancarboxaldehído	-
	Acetato de etilo	Pegamento
	Acetato de isoamilo	Banana

	Heptanoato de etilo	-
	Acetato de feniletilo	Miel
	Octanoato de etilo	Frutal, piña, manzana, brandy
	Acetato de feniletilo	Floral, rosas, miel
	Dietil succinato	Pegamento
	Laurato de etilo	Floral, afrutado, ron
	Palmitato de etilo	Cera
	Benzoato de etilo	Frutal, cereza, uva
	Nonanoato de etilo	Cognac, rosado, afrutado
	Etil-3-hexanoato	-
	Etil trans-4-hexanoato	Manzana
Cetonas	2-furil-metilcetona	-
	γ – nonalactona	Whisky
Fenoles	4-etilfenol	Cuero, sudor de caballo
	Isómero nonilfenol	Fenólico
Terpenos	g-terpineno	Limón
	p-cimeno	Perejil
	Mirceno	Clavo de olor
	Limoneno	Cítricos
	Linalol	Floral mentolado
	Eugenol	Clavo de olor
	Estireno	Dulce
	α-terpineol	Lila
	Terpinen-4-ol	Hojas frescas de lima, kéfir
	4-etil-1,2-dimetoxibenceno	Té, café

Fuente: Adaptado de Ozturk et al. (2015).

1.2.2. Beneficios del vinagre sobre la salud: perfil bioactivo

El vinagre tiene actividades antioxidante y antimicrobiana, así como efectos antidiabéticos y otras propiedades terapéuticas (Budak et al., 2014). Su alta actividad antioxidante se debe a la presencia de compuestos bioactivos, que comprenden a los carotenoides y fitoesteroles, así como compuestos fenólicos y vitaminas C y E (Charoenkiatkul, Thiyajai, y Judprasong, 2016). Estos compuestos bioactivos pueden actuar como antioxidantes, inhibidores de enzimas e inhibidores de la expresión génica (Etherton et al., 2004). Entre otros beneficios de los

antioxidantes es la disminución del aumento postprandial en los lípidos hidroperóxidos, que se generan durante la digestión de los alimentos, además de ayudar a prevenir la formación de peróxidos y su asimilación en el tracto digestivo (Verzelloni et al., 2007).

En base a lo mencionado, el consumo del vinagre de arándano puede aportar una serie de beneficios al organismo, los cuales se muestran en la *Tabla 7*.

Tabla 7:

Beneficios sobre la salud aportados por el vinagre.

BENEFICIO	FUENTE
Mejora la función del sistema digestivo Estimulación del apetito Antioxidante Recuperación del agotamiento Regulación de la presión arterial	Fushimi, Tayama, Fukaya, Kotakoshi, Nakai y Tsukamoto (2001); Qui, Ren, Fan y Li (2010).
Prevención de la peroxidación de lípidos, hipertensión, hiperlipidemia, inflamación, daños del ADN y cáncer	Osada et al. (2006); Chou, Liu, Yang, Wu y Chen (2015).
Mejora de la sensibilidad a la insulina	Salbe, Jognston, Buyukbese, Tsitouras y Harman (2009)
Reducción de digestión completa de carbohidratos complejos, aumento de absorción de glucosa por los tejidos, y reducción de glucosa en sangre	Fushimi, Tayama, Kotakoshi, Nakai y Tsukamoto (2001)
Prevención de enfermedades cardiovasculares	Laranjinha, Almeida y Madeira (1994)
Mejora de la homeostasis de lípidos y reducción del nivel de colesterol <i>in vivo</i>	Fukami, Tachimoto, Kishi, Kaga y Tanaka (2010)

1.2.3 Estrategias tecnológicas para mejorar el perfil bioactivo en vinagres

Diversos estudios señalan que los compuestos fenólicos ayudan a prevenir diversas enfermedades gracias a sus actividades antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, etc. (Zhang et al., 2006), motivo por el cual, la composición fenólica representa un buen marcador de calidad y origen de un vinagre (Granato, Katayama y Alvez, 2011).

Con el fin de mejorar el contenido de compuestos bioactivos, se pueden implementar diferentes estrategias tecnológicas, si bien en su mayoría han sido estudiadas en el contexto de elaboración de vinos (*Tabla 8*), también pueden ser aplicadas en la elaboración de vinagres, teniendo en cuenta que la capacidad antioxidante depende de la presencia de fenoles en el vino y, por ende, en el vinagre (Verzelloni et al., 2007).

Tabla 8:

Estrategias tecnológicas para mejorar la extracción y estabilidad de compuestos bioactivos durante la elaboración de los vinos y vinagres.

Bebida fermentada	Tratamientos	Tecnologías	Fuente
Vino	Físico	Radiación microondas (MW)	Brahim et al. (2014) Liazid et al. (2011)
		Ultrasonido (US)	Vejarano et al. (2019)
		Alta presiones hidrostáticas (HHP)	
		Pulsos de luz (PL)	
		Irradiación con haz de electrones (e-beam)	
	Campos eléctricos pulsados (PEF)		
	Químico	Chaptalización	Gil et al. (2016)
		Ozonización	Vejarano et al. (2019)
	Biotecnología fermentativa	Levaduras con baja capacidad de adsorción de antocianos	Loira et al. (2013)
		Levaduras con baja actividad antocianina- β -glucosidasa (antocianasa)	Vejarano et al. (2019)
Levaduras hiper-productoras de piranoantocianinas vinilfenólicas y vitisinas		Morata et al. (2013)	
Vinagre	Biotecnología fermentativa	Bacterias con baja capacidad de adsorción de antocianos	Vejarano et al. (2019)
		Bacterias con baja actividad antocianina- β -glucosidasa (antocianasa)	Barbagallo et al. (2007)

Entre las ventajas de las diferentes estrategias tecnológicas reportadas en la bibliografía, se incluyen un menor tiempo de elaboración y una mayor extracción de antocianos y otros

compuestos fenólicos, así como la mejora de la estabilidad de estos compuestos en el tiempo, mejorando de ese modo el perfil bioactivo.

De las estrategias aplicables, destacan la utilización de levaduras con ciertas características que permitan una adecuada elaboración del vino base, la aplicación de correcciones químicas a nivel de mostos (jugo), o la aplicación de tratamientos físicos que permitan una mayor extracción de determinados compuestos durante la elaboración del vino base.

1.2.3.1. Cepas de levadura

En el mercado existen diferentes cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, con características tecnológicas diferenciadas. Siendo una de estas características su poder fermentativo, es decir que tienen la capacidad de finalizar adecuadamente el proceso fermentativo (Morata, 2004).

Otra característica diferenciada es la baja producción de compuestos aromáticos de origen fermentativo, contribuyendo a mantener el perfil aromático varietal en el vino obtenido. Se puede optar por la utilización de cepas comerciales catalogadas como “neutras”, debido a su baja síntesis de compuestos aromáticos fermentativos, por ejemplo, ésteres (Fermentis, 2019).

1.2.3.2. Enriquecimiento azucarado del mosto: *chaptalización*

Técnica que consiste en suplementar el medio fermentativo con azúcares exógenos, previo a la fermentación alcohólica (Martin, 1990), con lo cual además de incrementar el grado alcohólico, se puede mejorar la extracción de antocianos debido a su alta solubilidad en el etanol (Peña, 2006).

1.2.3.3. Radiación microondas

Según Tomaz et al. (2019), las microondas (MW) son parte del espectro electromagnético con un rango de frecuencias entre 0.3-300 GHz. Los sistemas comerciales de microondas utilizan frecuencias de 2.45 GHz. Esta radiación puede ser utilizada para la extracción de compuestos de diferentes matrices, proceso conocido como extracción asistida por microondas, el cual se basa en el paso de las microondas a través de un medio, el cual absorbe la radiación, convirtiendo la energía absorbida de las microondas en energía térmica. Las microondas calientan el líquido contenido dentro de las células de muestras sólidas, aumentando la presión dentro de estas células, y, por consiguiente, produciendo la degradación de la pared celular, lo que a su vez aumenta la porosidad de la muestra, aumentando la eficiencia de la extracción. Esta estrategia tecnológica ha demostrado ventajas en la reducción del tiempo de extracción de compuestos fenólicos de diferentes matrices (Brahim et al., 2014; Jaime y Sosa, 2017; Liazid et al., 2011; Li et al., 2013).

Considerando los antecedentes descritos, una alternativa de aprovechamiento en la elaboración de vinagre a partir del descarte de arándano producido en La Libertad, sería la aplicación de estrategias tecnológicas que mejoren la extracción de compuestos bioactivos, principalmente antocianos y otros compuestos fenólicos de mayor presencia en el hollejo, durante la etapa de fermentación alcohólica, es decir durante la elaboración del vino base, aprovechando con ello la riqueza en compuestos bioactivos de este fruto, los cuales podrían contribuir a mantener un buen estado de salud en el consumidor, además de generar nuevas alternativas de transformación e ingresos económicos para las empresas productoras y/o transformadoras.

1.3. Formulación del problema

¿Es posible mejorar el perfil bioactivo en vinagre de arándano mediante la aplicación de estrategias tecnológicas a nivel de materia prima (radiación microondas) y en el mosto (*chaptalización*) previo a la etapa de fermentación alcohólica?

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Mejorar el perfil bioactivo en vinagre de arándano mediante la aplicación de estrategias tecnológicas a nivel de materia prima (radiación microondas) y en el mosto (*chaptalización*) previo a la etapa de fermentación alcohólica.

1.4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* durante la etapa de fermentación alcohólica, sobre el contenido de AMT, capacidad antioxidante e intensidad colorante en vinagre de arándano.
- Evaluar el efecto del enriquecimiento azucarado (*chaptalización*) del mosto previo a la fermentación alcohólica, sobre el contenido de AMT, capacidad antioxidante e intensidad colorante en vinagre de arándano.
- Evaluar el efecto de la aplicación de radiación microondas a las bayas de arándano, sobre el contenido de AMT, capacidad antioxidante e intensidad colorante en vinagre de arándano.

1.5. Hipótesis

Sí es posible mejorar el perfil bioactivo en vinagre de arándano mediante la aplicación de estrategias tecnológicas a nivel de materia prima (radiación microondas) y en el mosto (*chaptalización*) previo a la etapa de fermentación alcohólica.

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

2.1. Tipo de investigación

2.1.1. De acuerdo con el fin que se persigue: Aplicada.

2.1.2. De acuerdo con la naturaleza de los datos: Cuantitativa.

2.1.3. De acuerdo con el nivel: Explicativa.

2.1.4. De acuerdo con el diseño de investigación: Experimental pura.

2.2. Materiales, instrumentos y métodos

2.2.1. Materiales e instrumentos

Materiales consumibles

- Muestras de arándano (*Vaccinium corymbosum*, variedad Biloxi), adquiridas del mercado La Hermelinda de la ciudad de Trujillo, en tres momentos diferentes: meses de septiembre (primera fase), noviembre (segunda fase), y diciembre (tercera fase).
- Azúcar blanca comercial. Para el proceso de enriquecimiento azucarado del jugo de arándano (*chaptalización*).

Cepas microbianas

- Levaduras *Saccharomyces cerevisiae*:
 - Cepa 7VA: Cepa vinífera procedente de la Denominación de Origen Ribera del Duero, aislada y proveída por el Grupo de Investigación EnotecUPM de la Universidad Politécnica de Madrid, España.
 - Cepa US-05: Cepa comercial (Fermentis Division of S.I. Lesaffre).

- Bacteria *Acetobacter aceti*: cepa proveída por el Grupo de Investigación EnotecUPM de la Universidad Politécnica de Madrid, España.

Reactivos:

- Buffer acetato sódico de pH 4.5 (0.4 M).
- Buffer cloruro de potasio de pH 1.0 (0.025 M).
- Ácido clorhídrico puro.
- Hidróxido de calcio puro.
- Hidróxido de sodio 0.1N.
- Solución alcohólica de fenolftaleína de 1 g por 100 ml.
- Etanol de 96 % v/v.
- Ácido gálico.
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3).
- Reactivo Folin-Ciocalteu.
- Reactivo DPPH (ácido 1,1-difenil-2-picrilhidracilo).
- Reactivo ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etil benzotiazolin)-6-sulfonato de amonio).
- Persulfato de potasio.
- Ácido ascórbico.
- Agua destilada.

Equipos:

- Destilador con refrigerante en serpentín y balón de 500 ml Isolab, Alemania.
- Alcoholímetro según Gay-Lussac Boeco, Alemania.
- Balanza analítica OHAUS PA224C, China.
- Bureta Isolab, Alemania.

- Centrífuga FUNKE GERBER Nova-Safety, Alemania.
- Espectrofotómetro UV-Vis Vernier SVIS-PLUS Vernier Software & Technology, Estados Unidos.
- pH metro HANNA HI 98128, Estados Unidos.
- Micropipetas de 200, 1000, 5000 y 10000 μ l, marca Isolab, Alemania.
- Refractómetro ATAGO Pocket PAL- α , Estados Unidos.
- Termómetro Boeco, Alemania.
- Utensilios varios.
- Software estadístico Statgraphics v.5 (Graphics Software Systems, Rockville, Estados Unidos).
- Microsoft Office.

2.2.2. Métodos:

Para el desarrollo experimental del trabajo de investigación se siguió el proceso mostrado en la *Figura 5*, aplicando tratamientos a nivel de materia prima (radiación microondas), y en el mosto (*chaptalización*) previo a la etapa de fermentación alcohólica. Además de evaluar dos cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* durante la fermentación alcohólica. Se tuvieron como variables, las mostradas en la *Tabla 8*.

2.2.2.1 Elaboración del vino base

Todos estos tratamientos fueron aplicados para mejorar el perfil bioactivo del vino base:

- **Fase 1.** Durante la fermentación alcohólica, se evaluó el efecto de dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae*: 7VA y US-05. Manteniendo las demás condiciones constantes.

El diseño estadístico utilizado fue un diseño completamente al azar (DCA) señalado en la *Tabla 9*, teniendo como variables de respuesta (dependientes): AMT, intensidad colorante y capacidad antioxidante.

Tabla 9:

Diseño completamente al azar aplicado en la Fase 1.

Repetición	Cepa de levadura <i>S. cerevisiae</i>	
	Cepa 7VA	Cepa US-05
1	A ₁	B ₁
2	A ₂	B ₂

- **Fase 2.** Se evaluó el efecto del enriquecimiento azucarado (*chaptalización*) del jugo de arándano mediante la adición de azúcar blanca comercial, con el fin de aumentar el contenido de azúcares fermentables hasta obtener 22.6 °Brix, y por tanto incrementar la producción de etanol durante la fermentación alcohólica, mejorando la extracción de antocianos (Gil, González, Díaz y Pereda, 2016), manteniendo como controles, jugo de arándano sin *chaptalizar* (12 °Brix). Los medios (mosto control y mosto *chaptalizado*) fueron fermentados con ambas cepas (7VA y US-05) de *S. cerevisiae*.

El diseño estadístico utilizado fue un diseño bifactorial (*Tabla 10*), el cual se ajustó a la cantidad de variables de estudio, teniendo como variables de respuesta (dependientes): AMT e intensidad colorante.

Tabla 100:

Diseño bifactorial aplicado en la Fase 2.

Cepa de levadura	Contenido de azúcares	
	12.0 °Brix	22.6 °Brix
7VA	A ₁	A-ch ₁
	A ₂	A-ch ₂
US-05	B ₁	B-ch ₁
	B ₂	B-ch ₂

- **Fase 3.** Se evaluó el efecto de la radiación microondas sobre las bayas de arándano, a fin de mejorar la extracción de antocianos durante la fermentación alcohólica (Jaime y Sosa, 2017; Liazid, Guerrero, Cantos, Palma y Barroso, 2011; Tomaz et al., 2019), trabajando a una potencia de 70 Watts, previamente establecida como la dosis sin efectos perjudiciales sobre la baya (pérdida de color y ruptura). Tratamiento aplicado a tiempos de 30 y 60 segundos en base a la metodología descrita por Jaime y Sosa (2017) y por Liazid et al. (2011). Los jugos obtenidos del arándano control (sin irradiar) y del arándano irradiado, fueron fermentados con la levadura 7VA.

El diseño estadístico utilizado fue un diseño completamente al azar (DCA), señalado en la *Tabla 11*, teniendo como variables de respuesta (dependientes): AMT, fenoles totales, intensidad colorante y capacidad antioxidante.

Tabla 1112:

Diseño aplicado en la Fase 3.

Repetición	Tiempo de irradiación sobre las bayas de arándano		
	0 segundos	30 segundos	60 segundos
1	A-ch ₁	A-ch+30s ₁	A-ch+60s ₁
2	A-ch ₂	A-ch+30s ₂	A-ch+60s ₂

2.2.2.2 Elaboración de vinagre

Una vez obtenidos los vinos base, se procedió a realizar la fermentación acética, manteniendo sin variación las condiciones en dicha etapa, la cual se desarrolló con la bacteria *Acetobacter aceti*, a temperaturas entre 24 - 26 °C, controlando el contenido de acidez en el tiempo.

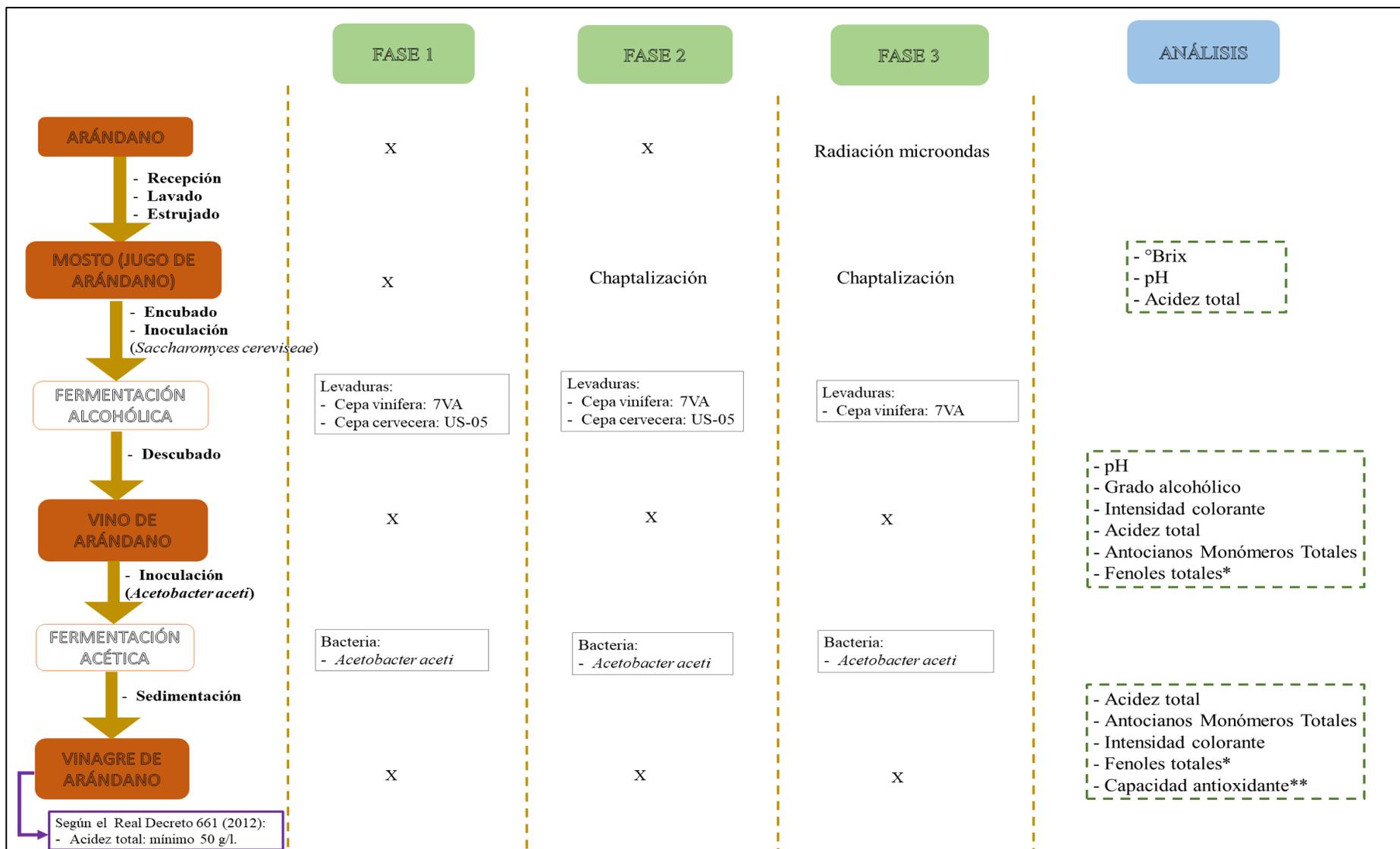


Figura 5: Diagrama de proceso de obtención de vinagre de arándano (*Vaccinium corymbosum*) y los análisis realizados.

X: No se aplicó tratamiento. *: Solo aplicado en la Fase 3. **: Solo aplicado en Fase 1 y Fase 3.

Tabla 132:

Operacionalización de las variables.

	Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Unidad
Variable independiente	Cepa de levadura	Individuos de una misma especie de levadura con características y propiedades similares.	Cada cepa de levadura tiene determinadas prestaciones, en base a las cuales se pueden obtener productos fermentados con determinadas características.	Cepa de levadura	Código
	Contenido de azúcares	Es la cantidad de carbohidratos fermentables capaces de convertirse en etanol.	Aumentar el grado alcohólico de una bebida fermentada a partir del incremento del contenido de azúcares en el medio fermentativo (<i>chaptalización</i>).	Porcentaje de azúcar	° Brix
	Tiempo de irradiación microondas	Radiación electromagnética que genera excitación molecular y por tanto incremento de energía térmica.	La irradiación de una materia prima irrumpe su estructura sólida, facilitando la salida de compuestos activos a través del incremento de la temperatura, por tanto, de la ruptura celular.	Tiempo de irradiación	Segundos
Variable dependiente	Intensidad colorante	Es la suma de las absorbancias en muestras de vino medidas a longitudes de onda de 420 nm, 520 nm y 620 nm (OIV, 2018).	Permite determinar la intensidad del color de una bebida fermentada como vino de uva, vino de arándano, entre otros; mediante espectrofotometría UV-Vis.	IC (Abs ₄₂₀ + Abs ₅₂₀ + Abs ₆₂₀)	Adimensional
	Antocianos	Compuestos orgánicos que se encuentran en uva, arándano, maíz morado, frambuesa, etc.	Su presencia permite dar color y capacidad antioxidante en alimentos fermentados como vinos.	AMT (antocianos monómeros totales)	mg/l expresados como cianidina-3-glucósido
	Capacidad antioxidante	Capacidad de determinadas moléculas para neutralizar radicales libres.	Capacidad antioxidante en bebidas fermentadas como vino y vinagre.	Porcentaje de inhibición de radical DPPH Cantidad de compuestos antioxidantes	Q (%) mg/l equivalentes de ácido ascórbico

2.2.2.1. Caracterización de la materia prima

2.2.2.1.1. pH

Se midió el pH del jugo de arándano mediante el método AOAC 981.12, usando un pH metro (HANNA HI 98128, Estados Unidos).

2.2.2.1.2. Sólidos solubles

Se midió el contenido total de sólidos solubles (°Brix) del jugo de arándano mediante un refractómetro (ATAGO Pocket PAL- α , Estados Unidos), corrigiendo las lecturas en base a la temperatura de calibración del equipo (20 °C).

2.2.2.1.3. Acidez total

Según el Método OIV-MA-AS313-01 (OIV, 2018). Consistió en una previa homogeneización de la muestra por agitación. Posteriormente, en un vaso de precipitado de 100 ml se introdujo un volumen de 2 ml de muestra, para a continuación enrasarlo hasta 20 ml con agua destilada. Se agregó 20 μ l de indicador azul de bromotimol, para luego iniciar la titulación con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N. El NaOH se añadió lentamente y en constante agitación hasta alcanzar una coloración azul verdosa.

Sea, G' el volumen, en ml, de la solución de NaOH utilizado en la valoración, N la normalidad del NaOH, m_{eq} el miliequivalente gramo por litro expresado en ácido acético (60 g/equiv.) y V el volumen de la solución. El contenido en acidez total (A_t), expresado en gramos de ácido acético por litro de muestra:

$$A_t = \left(\frac{G' * N * meq}{V} \right) * 100$$

Se expresa en ácido acético porque es el predominante en el producto final (vinagre).

2.2.2.2 Caracterización del vino

2.2.2.2.1. pH

Se siguió el procedimiento señalado en el apartado 2.2.2.1.1.

2.2.2.2.2. Acidez total

Se siguió el procedimiento señalado en el apartado 2.2.2.1.3.

2.2.2.2.3. Grado alcohólico

Se determinó el grado alcohólico (GA) de los vinos mediante destilación y densimetría de acuerdo con el Método Oficial OIV MA-AS312-01A (OIV, 2018), el cual consistió en medir 200 ml del vino con un matraz volumétrico. Se registró la temperatura del vino. Se transfirió el vino al matraz de destilación. Se enjuagó el matraz volumétrico cuatro veces con lavados sucesivos de 5 ml de agua desionizada añadidos al matraz.

Se recogió el destilado en el matraz graduado de 200 ml utilizado para medir el vino, hasta un volumen de aproximadamente de tres cuartas partes del volumen inicial.

Se enrasó hasta 200 ml con agua destilada, llevando el destilado hasta el mismo valor de la temperatura inicial. Se mezcló cuidadosamente, usando un movimiento circular.

Finalmente, se midió mediante densimetría el grado alcohólico usando un alcoholímetro según Gay-Lussac (BOECO, Alemania).

2.2.2.2.4. Antocianos monómeros totales

Los antocianos monómeros totales (AMT) fueron cuantificados mediante el Método del pH-diferencial (Giusti y Wrolstad, 2001) mediante un espectrofotómetro de absorción molecular ultravioleta visible (espectrofotómetro UV-Vis, Vernier SVIS-PLUS, Vernier Software & Technology, Alemania). Se diluyó cada muestra con dos soluciones tampón de pH 1.0 y de pH

4.5. La absorbancia de cada dilución fue medida en el espectro visible a $\lambda = 520$ nm y $\lambda = 700$ nm. La absorbancia (A) de las muestras fueron calculadas mediante la siguiente fórmula:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH\ 4.5}$$

Donde: A es la absorbancia de las muestras diluidas. A_{520} es la absorbancia medida a $\lambda = 520$ nm, y A_{700} es la absorbancia medida a $\lambda = 700$ nm. El contenido de AMT fue expresado como cianidina-3-glucósido (Cy-3-G)/100g de muestra y calculado mediante:

$$AMT = (A \times PM \times FD \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

Donde: PM es el peso molecular de la Cy-3-G (449.2 g/mol), FD es el factor de dilución, ϵ es la absorptividad molar (26 900) para la Cy-3-G y l es la longitud de paso de la cubeta (1 cm).

2.2.2.2.5. Fenoles totales

Los fenoles totales se determinaron de acuerdo con el método descrito por Espinoza et al. (2016). Los análisis se realizaron utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Vernier SVIS-PLUS, Vernier Software & Technology, Alemania), tras la reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con las muestras.

Cada muestra (30 μ l) fue agregada a una cubeta con 1170 μ l de agua destilada, 75 μ l de reactivo de Folin-Ciocalteu y 225 μ l de Na_2CO_3 al 20%. La mezcla se mantuvo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 120 minutos.

Tras el tiempo indicado, la absorbancia de las muestras se midió a 760 nm. Los contenidos de fenoles totales se calcularon utilizando una curva de calibración obtenida de un estándar de ácido gálico, expresando los resultados como mg de ácido gálico/100 ml de muestra.

2.2.2.2.6. Intensidad colorante

Según el método OIV MA-AS2-07B (OIV, 2018), se determinó las variables colorimétricas mediante espectrofotometría UV-Vis, midiendo las absorbancias de las muestras a 420, 520 y 620 nm con cubetas de 1 cm de paso de luz. Se calculó la intensidad colorante (IC), mediante la siguiente ecuación:

$$IC = Abs_{420} + Abs_{520} + Abs_{620}$$

2.2.2.2.7. Capacidad antioxidante

A) Método DPPH

El método DPPH (ácido 1,1-difenil-2-picrilhidracilo) fue desarrollado por Brand-Williams, Cuvelier y Berset (1994), cuyo fundamento es que el radical DPPH al tener un electrón desapareado y presentar un color azul-violeta, se decolora hacia amarillo pálido al reaccionar en presencia de un antioxidante.

Se preparó una solución de 50 mg/l de ácido 1,1-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) en etanol al 80% (v/v) (se utilizó etanol en lugar de metanol). Se agitó la solución durante 40 minutos, tras lo cual se ajustó la absorbancia a 0.65 ± 0.02 a 517 nm con etanol al 80% (v/v) utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Vernier SVIS-PLUS, Vernier Software & Technology, Alemania). Luego, se mezclaron 50 μ l de muestra con 500 μ l de solución de DPPH y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad. Tras lo cual se midió la absorbancia a 517 nm, en cubeta de 1 cm de paso. Un control consistió en 50 μ l de agua destilada en 500 μ l de solución de DPPH.

Para cuantificar el contenido de compuestos antioxidantes, se obtuvo una recta de calibración con soluciones de ácido ascórbico: 0, 10, 30, 60, 100 y 300 mg/l en agua destilada, mezclando 50 µl de cada patrón de ácido ascórbico con 500 µl de solución de DPPH, dejando reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad. Tras lo cual se midió la absorbancia a 517 nm, en cubeta de 1 cm de paso. Con la recta obtenida se cuantificó la cantidad de compuestos antioxidantes, los cuales se expresaron como ácido ascórbico (mg/l).

Adicionalmente, se aplicó la fórmula de Molyneux (2004) para determinar el porcentaje de inhibición del radical DPPH (capacidad antioxidante) por los compuestos antioxidantes:

$$\% \text{ Inhibición del radical DPPH} = 1 - \left(\frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{DPPH}}} \right) \times 100$$

Donde:

- A_{muestra} : Absorbancia de la muestra.
- A_{DPPH} : Absorbancia de la solución de DPPH (0.65).

2.2.2.3. Caracterización del vinagre

2.2.2.3.1. pH

Se siguió el procedimiento señalado en el apartado 2.2.2.1.1.

2.2.2.3.2. Acidez total

Se siguió el procedimiento señalado en el apartado 2.2.2.1.3.

2.2.2.3.3. Antocianos monómeros totales

Se siguió el procedimiento señalado en el apartado 2.2.2.2.4.

2.2.2.3.4. Fenoles totales

Se siguió el procedimiento señalado en el apartado 2.2.2.2.5.

2.2.2.3.5. Intensidad colorante

Se siguió el procedimiento señalado en el apartado 2.2.2.1.6.

2.2.2.3.6. Capacidad antioxidante

Se aplicaron los procedimientos indicados en el apartado 2.2.2.2.7.

2.3. Procedimiento para la elaboración de vino de arándano

En la *Figura 6* se observa el diagrama para la elaboración del vino de arándano.

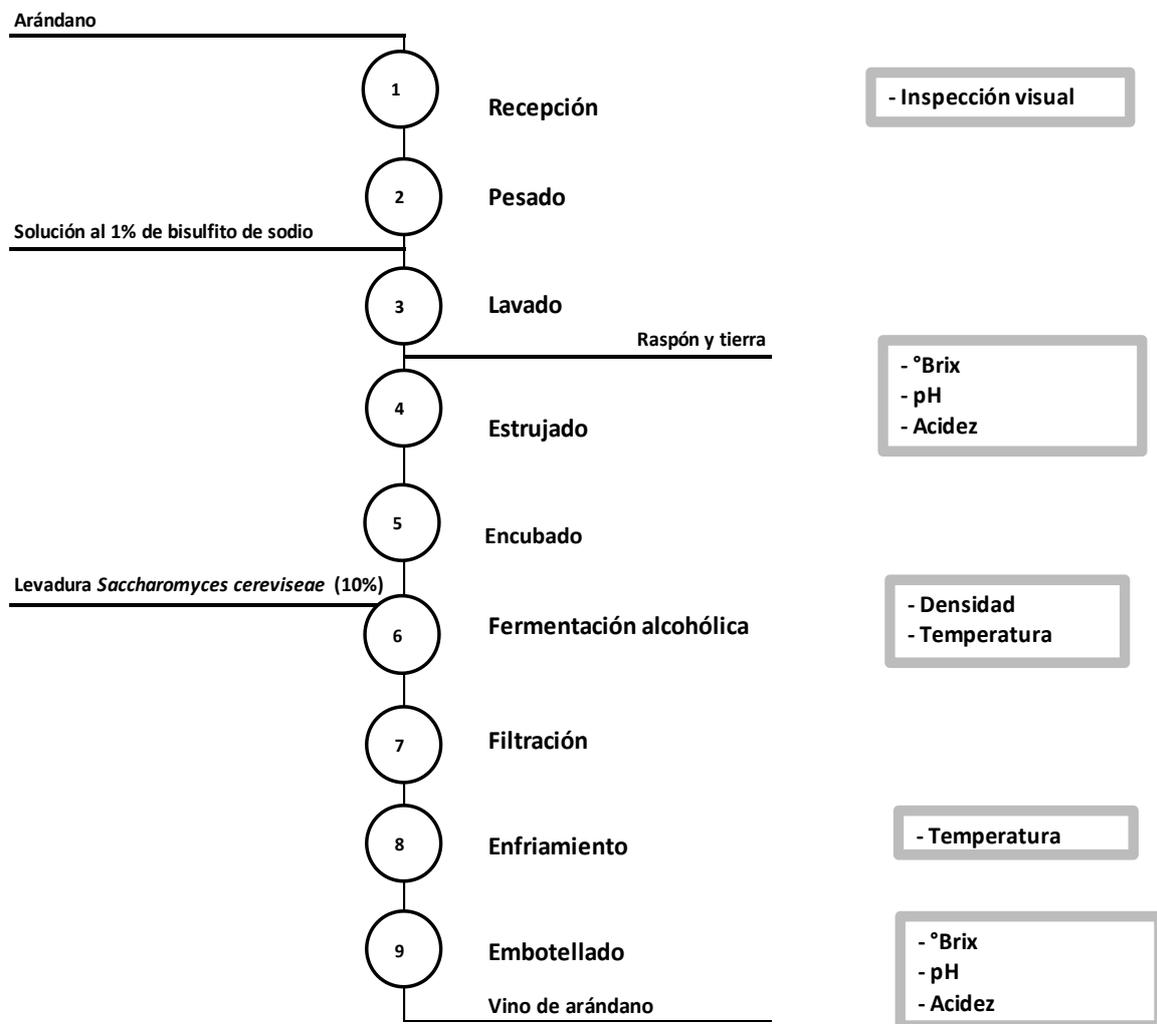


Figura 6: Diagrama de operaciones del proceso de elaboración de vino de arándano.

Obtención y caracterización del mosto

El arándano fue lavado y estrujado para obtener el jugo (mosto). Se midió el contenido de azúcares mediante refractometría, la acidez total mediante titulación ácido-base y el pH.

Fermentación del mosto

Se utilizaron dos cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae*: una cepa cervecera (US-05) y una cepa vinífera (7VA), ambas inoculadas a razón del 10 % respecto al volumen de mosto a fermentar, con una densidad celular en torno a 10^8 UFC/ml. Las fermentaciones se llevaron a cabo en recipientes de 3 litros, con volumen de operación del 80 % de su capacidad y controlando la temperatura en torno a 20 °C.

Tratamientos post fermentativos y análisis del vino obtenido

Se siguió el progreso de las fermentaciones mediante densimetría hasta densidad constante (cuatro a cinco días), tras lo cual se procedió a eliminar las cáscaras del arándano y a refrigerar los vinos a 4 °C por 48 horas para facilitar la sedimentación de los sólidos e inhibir a la levadura. Finalmente, al vino obtenido se le midió: acidez, pH, grado alcohólico, contenido de AMT, parámetros colorimétricos y contenido de fenoles totales.

2.3. Procedimiento para la elaboración de vinagre de arándano

Para iniciar con la fermentación acética se procedió con la inoculación con 2 mL de inóculo de bacteria *Acetobacter aceti* con una densidad celular en torno a 10^6 UFC/ml. El método empleado en esta investigación fue el Orleans (método lento), manteniendo la temperatura de fermentación entre 24 y 26 °C. Al vinagre obtenido se le midió: acidez, AMT, parámetros colorimétricos, contenido de fenoles totales, y capacidad antioxidante.

2.4. Análisis estadístico

Con los resultados obtenidos se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) para identificar diferencias significativas en los diferentes valores de los parámetros evaluados (intensidad colorante, AMT, capacidad antioxidante), mediante la prueba LSD de Fisher (5% de significancia) para identificar los tratamientos con un mayor efecto sobre dichos parámetros. Ello utilizando el software Statgraphic v.5 (Graphics Software Systems, Rockville, Estados Unidos).

CAPÍTULO III. RESULTADOS

3.1. Fase 1: Selección de la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae*

Se trabajó con dos cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*: una cepa vinífera (7VA, Ribera del Duero, España - *Anexo 01*) y una cepa cervecera (Safale US-05, Fermentis, Francia - *Anexo 02*).

Se utilizó la siguiente nomenclatura para denominar los tratamientos:

- Levadura 7VA: mosto/vino/vinagre A.
- Levadura US-05: mosto/vino/vinagre B.

3.1.1. Caracterización de los mostos de arándano

En la *Tabla 13* se muestran los contenidos de sólidos solubles, acidez total (expresado en ácido cítrico) y pH de los mostos.

Tabla 143:

Caracterización de los mostos antes de la fermentación.

	Mosto A	Mosto B
Acidez total	12.42 g/l	13.03 g/l
°Brix	13.85	13.85
pH	3.00	2.95

3.1.2. Características fisicoquímicas de los vinos obtenidos

En la *Tabla 14* se presenta el grado alcohólico, intensidad colorante y antocianos monómeros totales obtenidos para los vinos A y B tras la fermentación alcohólica.

Tabla 154:

Grado alcohólico (% v/v), intensidad colorante (IC) y antocianos monómeros totales (AMT) en los vinos A y B (medias \pm desviaciones estándar).

Vino	GA (% v/v)	IC	AMT (mg/l)
A (levadura 7VA)	5.52 \pm 0.38 ^a	1.08 \pm 0.09 ^a	228.77 \pm 13.70 ^a
B (levadura US-05)	5.34 \pm 0.23 ^a	1.51 \pm 0.02 ^b	347.84 \pm 20.07 ^b

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (LSD de Fisher).

3.1.3. Características fisicoquímicas del vinagre obtenido

En la *Figura 7* se muestra la evolución de la acidez total obtenida para los vinagres A y B.

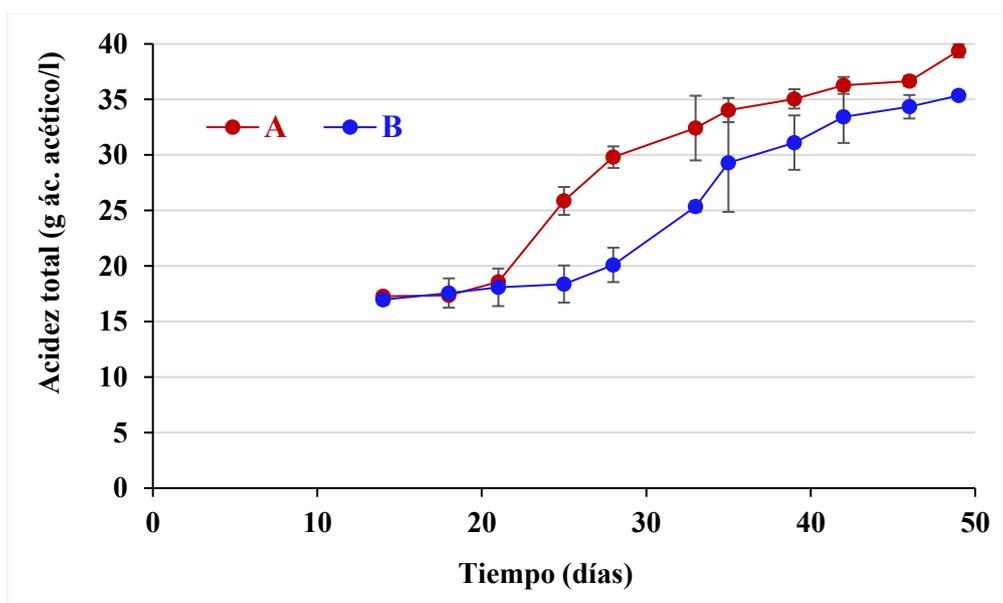


Figura 7: Evolución de la acidez total en los vinagres A y B. Barras en vertical representan desviación estándar.

En la *Tabla 15* se presenta la intensidad colorante y los antocianos monómeros totales de los vinagres A y B.

Tabla 165:

Intensidad colorante (IC) y antocianos monómeros totales (AMT) en los vinagres A y B (medias \pm desviaciones estándar).

Vinagre	IC	AMT (mg/l)
A (levadura 7VA)	0.67 ± 0.09^a	71.3 ± 11.41^a
B (levadura US-05)	0.83 ± 0.06^b	110.55 ± 4.73^b

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (LSD de Fisher).

En la *Figura 8*, se presenta el porcentaje de inhibición del radical DPPH (capacidad antioxidante) obtenido en los vinagres A y B.

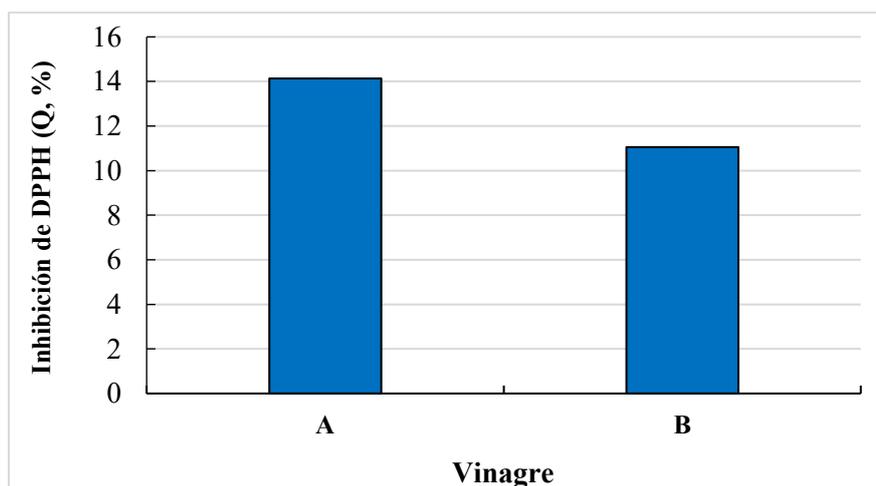


Figura 8: Porcentaje de inhibición del radical DPPH en los vinagres A y B.

En la *Figura 9*, se presenta la capacidad antioxidante, expresada en miligramos de ácido ascórbico por litro, obtenida en los vinagres A y B mediante el método DPPH.

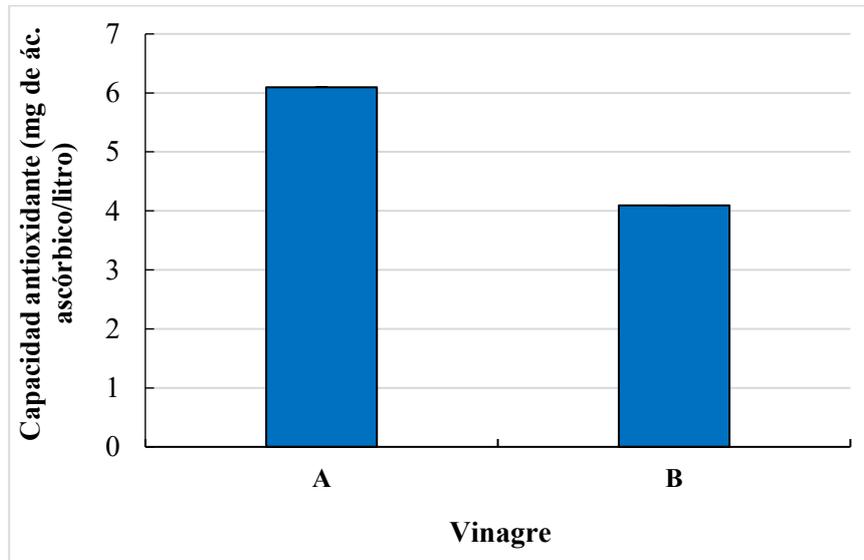


Figura 9: Capacidad antioxidante de los vinagres A y B expresada en mg/l de ácido ascórbico.

3.2. Fase 2: Efecto de la chaptalización sobre la extracción de antocianos

Se utilizó la siguiente nomenclatura para denominar los tratamientos:

- Mosto fermentado con la levadura 7VA *chaptalizada*: mosto/vino/vinagre A-ch.
- Mosto fermentado con la levadura US-05 *chaptalizada*: mosto/vino/vinagre B-ch.

3.2.1. Caracterización de los mostos

En la *Tabla 16* se muestra los contenidos de azúcares, acidez total y pH de los mostos.

Tabla 176:

Caracterización de los mostos antes de la fermentación.

	Mosto A	Mosto B	Mosto A-ch	Mosto B-ch
Acidez total	13.03 g/l	13.03 g/l	13.03 g/l	13.03 g/l
° Brix	12.0	12.0	22.6	22.6
pH	3.46	3.46	3.46	3.46

3.2.2. Características fisicoquímicas de los vinos obtenidos

En la *Tabla 17* se presenta el grado alcohólico, intensidad colorante y antocianos monómeros totales obtenido para los vinos A, B, A-ch y B-ch.

Tabla 187:

Grado alcohólico (GA), intensidad colorante (IC) y antocianos monómeros totales (AMT) en los vinos (medias \pm desviaciones estándar).

VINO	GA (% v/v)	IC	AMT (mg/l)
A	4.4	3.12 \pm 0.22 ^{Ab}	61.23 \pm 4.25 ^{Ab}
A-ch	10.2	5.12 \pm 0.19 ^{Aa}	123.85 \pm 2.44 ^{Ba}
B	3.8	2.28 \pm 0.11 ^{Bb}	63.79 \pm 2.20 ^{Ab}
B-ch	10.7	3.62 \pm 0.05 ^{Ba}	136.71 \pm 2.68 ^{Aa}

Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia significativa respecto a la cepa de levadura. Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia significativa respecto al contenido de azúcares (Análisis de Varianza ANOVA).

3.2.3. Características fisicoquímicas de los vinagres obtenidos

En la *Figura 10* se muestra la evolución de la acidez total obtenida para los vinagres A, A-ch, B y B-ch.

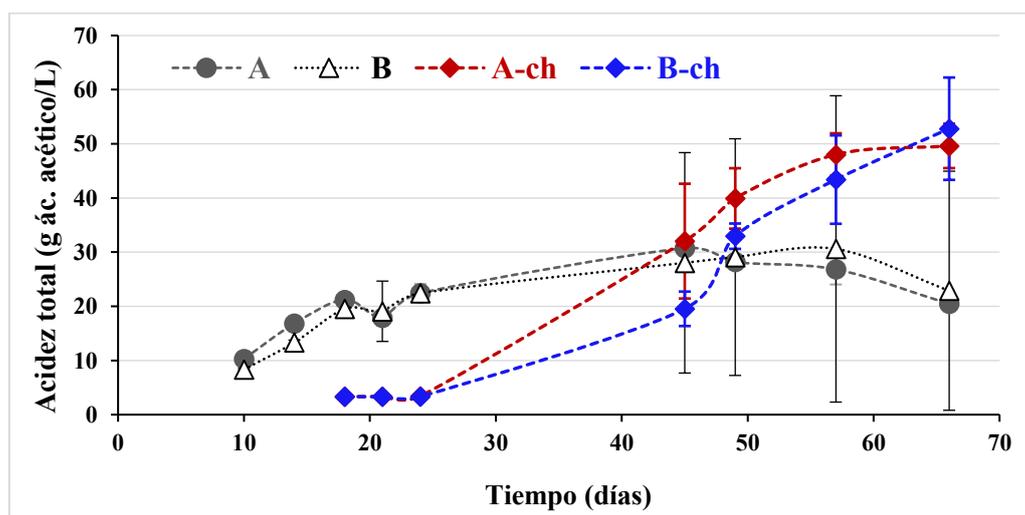


Figura 10: Evolución de la acidez total en los vinagres A, A-ch, B y B-ch hasta alcanzar una acidez total de 50 g/l. Los puntos señalados son datos experimentales. Barras en vertical representan desviación estándar.

En la *Tabla 18* se presenta la intensidad colorante y antocianos monómeros totales obtenido para los vinagres A, A-ch, B y B-ch.

Tabla 198:

Intensidad colorante (IC) y antocianos monómeros totales (AMT) en los vinagres (medias \pm desviaciones estándar).

Vinagre	IC	AMT (mg/l)
A	1.56 \pm 0.95 ^{Aa}	7.68 \pm 4.25 ^{Aa}
A-ch	1.35 \pm 0.17 ^{Aa}	6.89 \pm 2.77 ^{Ba}
B	1.27 \pm 0.73 ^{Aa}	5.47 \pm 4.31 ^{Bb}
B-ch	1.66 \pm 0.16 ^{Aa}	11.13 \pm 3.18 ^{Aa}

Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia significativa respecto a la cepa de levadura. Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencia significativa respecto al contenido de azúcares (Análisis de Varianza ANOVA).

3.3. Fase 3: Efecto de la radiación microondas sobre la extracción de antocianos

Todos los mostos fueron sometidos a fermentación alcohólica con la levadura 7VA, para lo cual se utilizó la siguiente nomenclatura:

- Mosto control sin ningún tratamiento: mosto/vino/vinagre A.
- Mosto chaptalizado de arándano sin irradiar: mosto/vino/vinagre A-ch.
- Arándano irradiado durante 30 segundos: mosto/vino/vinagre A-ch + 30s.
- Arándano irradiado durante 60 segundos: mosto/vino/vinagre A-ch + 60s.

3.3.1. Caracterización de los mostos

En la *Tabla 19* se muestra los contenidos de azúcares de los mostos. Previo a iniciar el proceso de fermentación se llevó a todos los mostos hasta 22.6 °Brix.

Tabla 209:

Caracterización de los mostos antes de la fermentación.

	Mosto A	Mosto A-ch	Mosto A-ch+30s	Mosto A-ch+60s
°Brix	12.5	12.4	12.5	12.1

3.3.2. Características fisicoquímicas de los vinos obtenidos

En la *Tabla 20* se presenta la intensidad colorante y antocianos monómeros totales obtenidos para los vinos A, A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s.

Tabla 210:

Intensidad colorante (IC) y antocianos monómeros totales (AMT) en los vinos obtenidos tras la fermentación (medias \pm desviaciones estándar).

Vino	IC	AMT (mg/l)
A-ch	1.23 \pm 0.10 ^b	88.07 \pm 17.71 ^a
A-ch+30s	1.12 \pm 0.01 ^b	83.96 \pm 11.81 ^a
A-ch+60s	1.08 \pm 0.09 ^b	93.51 \pm 4.06 ^a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (LSD de Fisher).

En la *Figura 11*, se presenta el contenido total de fenoles obtenidos en los vinos con los diferentes tratamientos A, A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s.

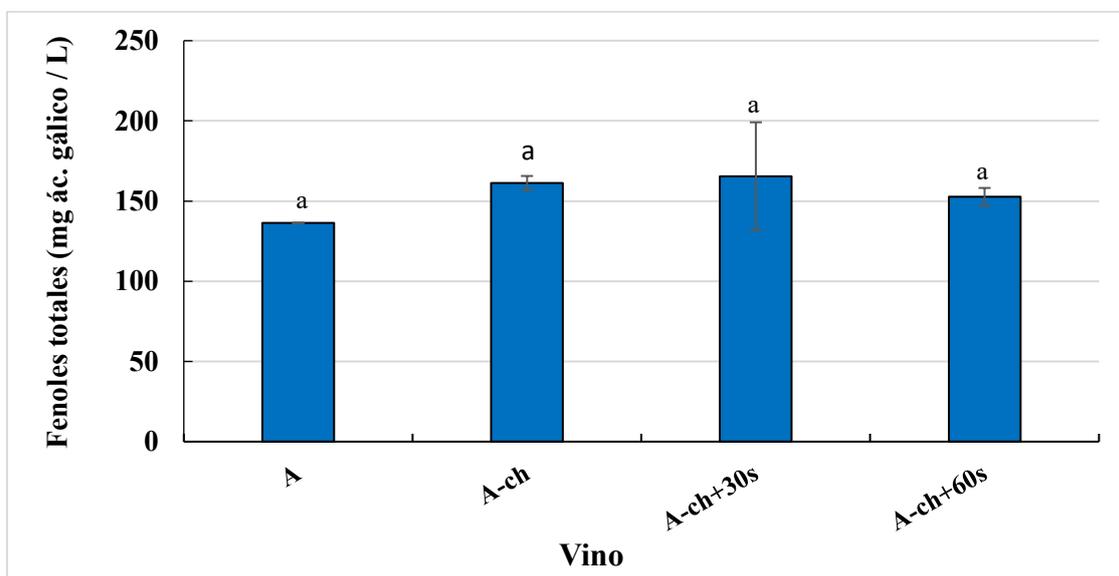


Figura 111: Fenoles totales de los vinos A, A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s (mg ácido gálico/litro). Letras diferentes en las barras indican diferencia significativa (LSD de Fisher).

En la *Figura 12*, se presenta el porcentaje de la capacidad antioxidante obtenidos en los vinos A, A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s mediante el método DPPH.

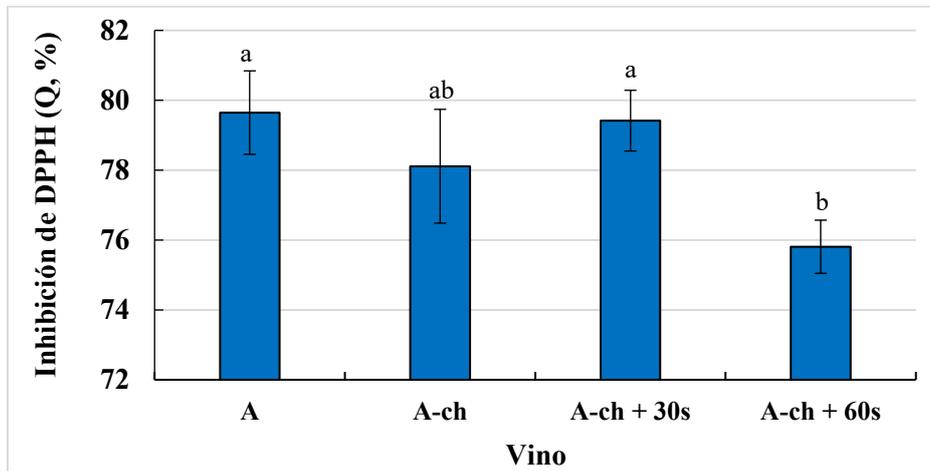


Figura 122: Porcentaje de inhibición del radical DPPH en los vinos A, A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s. Letras diferentes en las barras indican diferencia significativa (LSD de Fisher).

En la *Figura 13*, se presenta la capacidad antioxidante en equivalentes de ácido ascórbico obtenidos en los vinos A, A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s mediante el método DPPH.

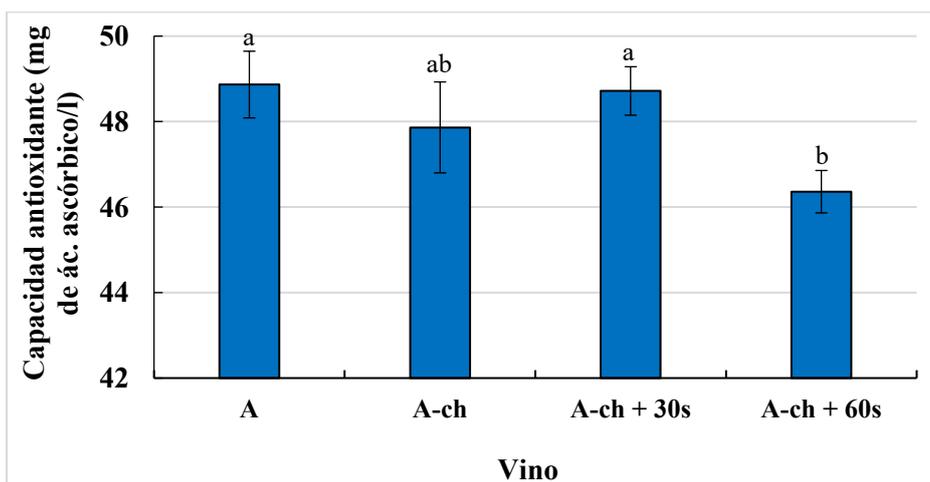


Figura 133: Capacidad antioxidante en los vinos A, A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s expresado como miligramos ácido ascórbico/litro del DPPH. Letras diferentes en las barras indican diferencia significativa (LSD de Fisher).

3.3.3. Características fisicoquímicas de los vinagres obtenidos

En la *Tabla 21* se presenta la intensidad colorante y antocianos monómeros totales obtenidos para los vinagres A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s.

Tabla 221:

Intensidad colorante (IC) y antocianos monómeros totales (AMT) en los vinagres obtenidos (medias \pm desviaciones estándar).

Vinagre	IC	AMT (mg/l)
A-ch	1.21 \pm 0.32 ^a	26.91 \pm 13.3 ^a
A-ch+30s	1.26 \pm 0.00 ^a	38.62 \pm 4.78 ^a
A-ch+60s	1.33 \pm 0.15 ^a	34.69 \pm 20.85 ^a

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (LSD de Fisher).

En la *Figura 14* se muestra la acidez total alcanzada en los vinagres A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s.

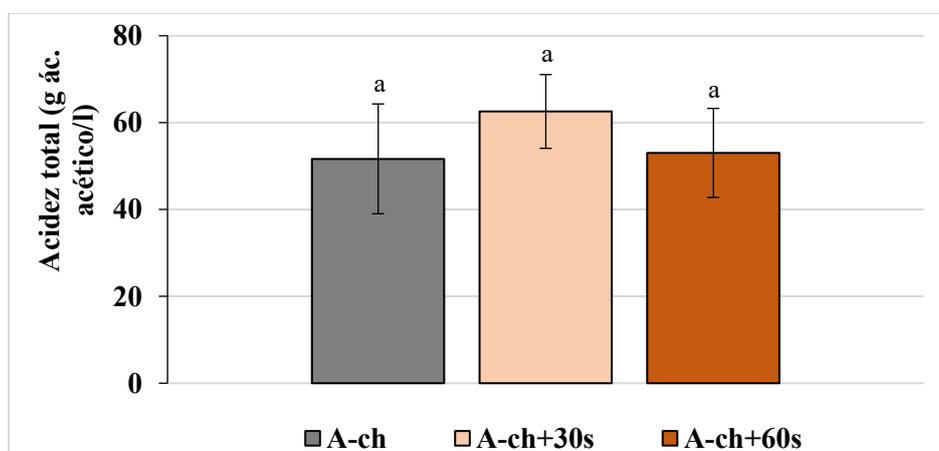


Figura 144: Acidez (g/l de ácido acético) alcanzada en los vinagres A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s, tras 50 días de fermentación acética. Letras diferentes en las barras indican diferencia significativa (LSD de Fisher).

En la *Figura 15* se presenta el contenido total de fenoles obtenidos en los vinagres A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s.

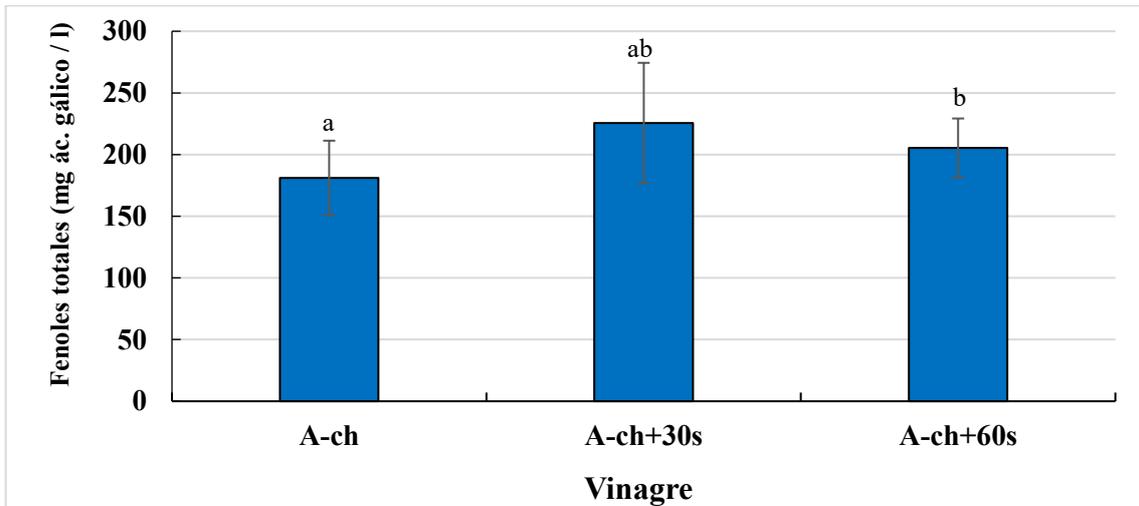


Figura 155: Fenoles totales de los vinagres A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s (miligramos ácido gálico/litro). Letras diferentes en las barras indican diferencia significativa (LSD de Fisher).

En la Figura 16, se presenta el porcentaje de capacidad antioxidante obtenidos en los vinagres A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s mediante el método DPPH.

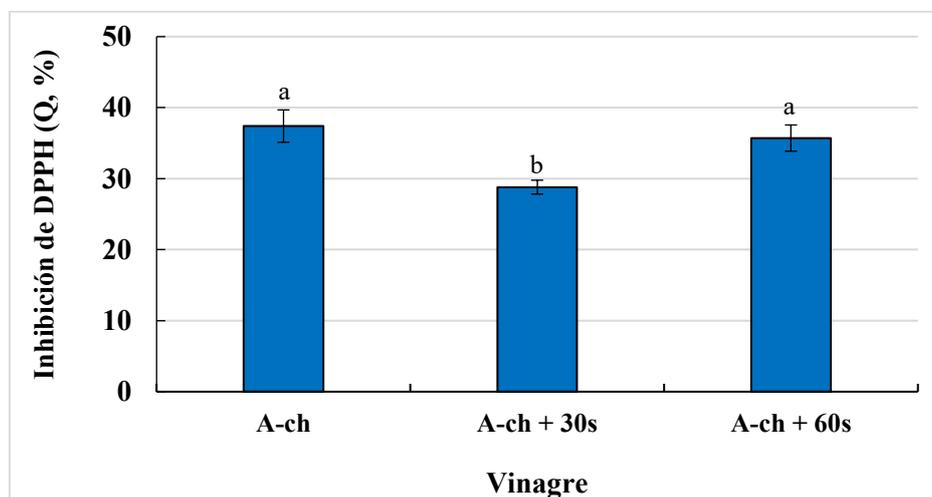


Figura 166: Porcentaje de inhibición del radical DPPH en los vinagres A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s. Letras diferentes en las barras indican diferencia significativa (LSD de Fisher).

En la *Figura 17* se presenta la cantidad de equivalentes de ácido ascórbico obtenidos en los vinagres A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s mediante el método DPPH.

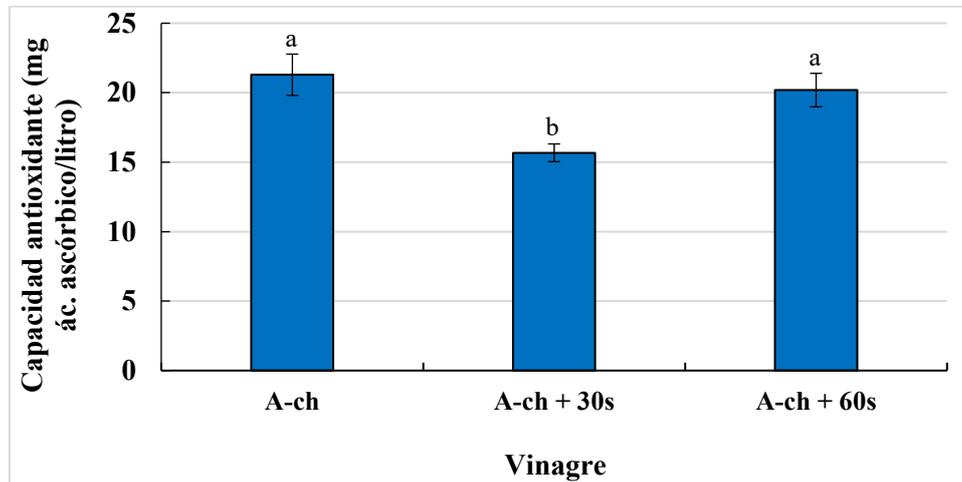


Figura 177: Capacidad antioxidante en los vinagres A-ch, A-ch+30s y A-ch+60s expresado como miligramos ácido ascórbico/litro del DPPH. Letras diferentes en las barras indican diferencia significativa (LSD de Fisher).

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.1 Discusión

Respecto a los sólidos solubles, Flanzky (2000) indica que las concentraciones elevadas de azúcares tienen un efecto nocivo sobre las levaduras, ya que la alta presión osmótica causa plasmólisis. Es por ello, que el mismo autor sugiere que una buena fermentación alcohólica se alcanza a concentraciones entre 16 a 18 °Brix. Sin embargo, en el presente trabajo se enriqueció el medio fermentativo (jugo de arándano) hasta 22.6 °Brix (Fase 2), lo cual se justifica en el hecho de que las cepas de levadura utilizadas previamente han mostrado una buena capacidad fermentativa a altos niveles de azúcares, especialmente la cepa 7VA (Morata, 2004).

4.1.1 Extracción de antocianos durante la elaboración del vino base

La cantidad de antocianos monómeros totales (AMT) determinados en la Fase 1 presentan diferencia significativa entre ambas cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Tabla 14), pues la cepa US-05 (levadura B) permitió extraer una mayor cantidad de AMT en el vino base, respecto a la cepa 7VA (levadura A) de acuerdo con el análisis de varianza (ANOVA) a un 94.9% de confianza (Anexo 03), una posible explicación a la menor cantidad de AMT de la cepa 7VA, podría deberse a que su pared celular presenta un alto poder de adsorción de antocianos, dado que dicha cepa ha sido reportada por mostrar en algunos casos esta característica (Morata, Gómez y Colomo, 2004).

En la Fase 2 existen diferencias entre los vinos obtenidos a partir de mosto *chaptalizado* respecto a los vinos control (mosto sin *chaptalizar*) (Tabla 17), mostrando mayor contenido de AMT los vinos obtenidos del mosto *chaptalizado*, en concordancia con Gil et al. (2016),

quienes mediante *chaptalización* de jugo de arándano incrementaron la disponibilidad de azúcares, con el consiguiente incremento en la producción de etanol por la levadura, incrementando de ese modo la solubilización, y por tanto, la extracción de antocianos hacia el mosto/vino durante la etapa de fermentación alcohólica.

La *chaptalización* permitió un incremento del grado alcohólico hasta alcanzar 10.7 % v/v, (*Tabla 17*), lo cual repercutió en la extracción de AMT y en la intensidad colorante (IC) de los vinos obtenidos con ambas cepas de *S. cerevisiae*. Sin embargo, se obtuvo mejores niveles de AMT con la cepa US-05.

Respecto a la IC, en la *Tabla 14* (Fase 1) se observa un comportamiento similar al contenido de AMT, al comparar entre los vinos obtenidos con ambas levaduras. La cepa US-05 (levadura B) presentó mayor IC. Sin embargo, en la Fase 2 (*Tabla 17*), la IC fue mayor en el vino obtenido con la cepa 7VA (levadura A), lo cual se podría explicar en base al estudio de Vejarano, Morata, Loira, González, y Suárez-Lepe (2013), quienes señalaron que la producción de piranoantocianinas (vitisinas y vinilfenoles) por *S. cerevisiae* a partir de la condensación de las antocianinas monómeras mejora su estabilidad, frente a la degradación causada, entre otros factores, por la enzima antocianasa (antocianina β -glucosidasa), minimizando así la pérdida de antocianinas y por tanto de color.

Previamente, Morata, Gómez-Córdoves, Calderón y Suárez (2005) reportaron que la cepa 7VA presenta alta producción de vitisinas piranoantociánicas a partir de la condensación de las antocianinas con ácido pirúvico y acetaldehído, durante la fermentación alcohólica. De modo que la levadura 7VA en la Fase 2, pudo haber producido altos niveles de vitisinas, permitiendo mejorar el color, como primer atributo percibido y valorado por el consumidor, de modo que para la Fase 3, se seleccionó la cepa 7VA, debido a las mejoras observadas (Fase 2, *Tabla 17*).

Otro factor determinante en el contenido de color y de AMT es el estado de madurez de las bayas. Las pruebas experimentales fueron realizadas en diferentes fases, lo que conllevó a emplear materia prima cosechada en diferentes momentos, siendo el estado de maduración de las bayas utilizadas, diferente para cada fase. Ello puede ser explicado por el estudio reportado por Valls (2004) aplicado en uvas tintas, quién determinó que el contenido de antocianos de las uvas aumentan durante la maduración y que su acumulación empieza tras el envero, momento en el que termina el crecimiento en volumen y cambia de color de la baya (*Figura 18*). Similar comportamiento podría haberse presentado en las bayas de arándano.

Por su parte, Morata (2005), menciona tres estructuras diferenciadas a nivel de materia prima: pulpa, semilla y hollejo, los cuales contribuyen de manera diferente a la composición de un vino, predominando los antocianos en el hollejo. Estudios previos mencionan que la aplicación de tratamientos físicos permite una mayor ruptura de las paredes celulares del hollejo, los cuales incluyen el ultrasonido, las altas presiones hidrostáticas (Morata et al., 2015; Vejarano et al., 2019), la radiación microondas (Brahim et al., 2014; Jaime y Sosa, 2017; Tomaz et al., 2019), entre otras. Estos tratamientos permiten que, tras el estrujado de la baya, se facilite la migración de antocianos, y, por tanto, el contenido de estos pigmentos en el mosto/vino durante la fermentación alcohólica.

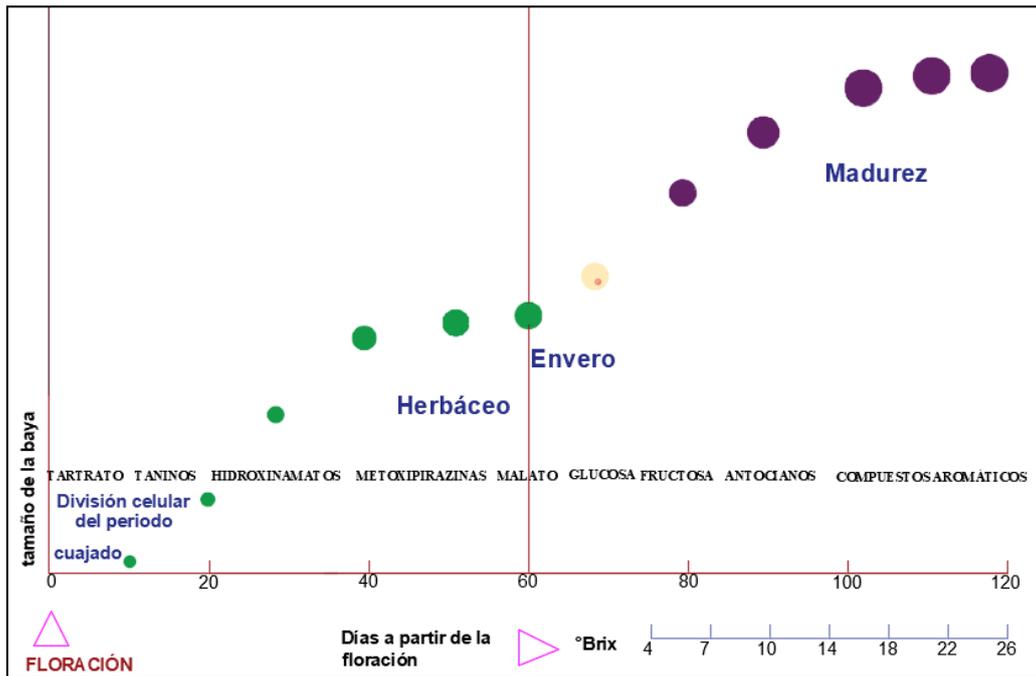


Figura 188: Etapas en la maduración de la baya en intervalos de 10 días a partir de la floración (Adaptado de Valls, 2004).

En la Fase 3 no se observó un efecto significativo entre los tratamientos de radiación microondas aplicados a las bayas de arándano, durante 30 y 60 segundos, respecto al control (A), pues no se logró incrementar el contenido de AMT en los vinos obtenidos: A-ch+30s y A-ch+60s, respectivamente (Tabla 20). Ello indica que este tipo de radiación no tiene un efecto significativo sobre la extracción de antocianos en bayas de arándano, como si se ha observado en bayas de uva tinta, e incluso en hollejos de uva tinta (Brahim et al., 2014; Liazid et al., 2011; Tomaz et al. (2019).

4.1.2. Fermentación acética

Según Llaguno y Polo (2004), la temperatura óptima de fermentación acética está entre 28 y 33 °C. Al sobrepasar los 33 °C, puede ocurrir inactivación bacteriana, en el cual las enzimas son desnaturalizadas, generando daños en la membrana, causando que los constituyentes se

dispersen y el organismo sea más sensible. Lo mencionado anteriormente fue tomado en cuenta para fijar la temperatura en un rango entre 24 y 26 °C, pues además de darle condiciones óptimas a la bacteria acética, se buscó una menor pérdida de sustancias aromáticas varietales como consecuencia de su volatilización.

En las figuras 7 y 10, se aprecia que, durante la fermentación acética, los vinagres A (obtenidos a partir de los vinos producidos con la cepa de *S. cerevisiae* 7VA), alcanzaron mayores niveles de acidez que los vinagres B (producidos a partir del vino de la cepa US-05) en menor tiempo. Ello sugiere que, en la etapa de fermentación acética, la bacteria *A. aceti* puede ser afectada por sustancias producidas durante la fermentación alcohólica por la levadura US-05 (vino B), lo cual explicaría la menor producción de ácido acético en los vinagres B. Este fenómeno podría ser explicado por la producción de sustancias inhibitorias para otros microorganismos por parte de algunas cepas de *S. cerevisiae*, fenómeno conocido como factor *killer* (Vejarano, 2018). Estas levaduras *killer* producen y excretan hacia el vino, glicoproteínas tóxicas (toxinas) que pueden causar inhibición o muerte de otros microorganismos sensibles (Lopes y Sangorrin, 2010) que tengan contacto posterior con el vino base. En el presente estudio, posiblemente *Acetobacter aceti*, añadida en el vino B, se haya visto afectada.

Además, en las figuras 7 y 10, se observa que en ambos vinos base (A y B), se alcanza un contenido de acidez de aproximadamente 35 a 40 g/l en torno a los 48 días.

4.1.3 Efecto de la fermentación acética sobre los antocianos

De acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) aplicado en la Fase 2 con un 95% de confianza (Anexo 4), se demostró que el efecto combinado de los factores (cepa de levadura y el contenido de azúcares) fue significativo en el contenido de AMT, dado que la utilización de la cepa US-05 (levadura B) junto con mosto *chaptalizado*, aumentaron el contenido de AMT en el vino

base (*Tabla 17*, descrito en el apartado 4.1.1), lo cual repercutió en el vinagre obtenido (*Tabla 18*). Mientras que la intensidad colorante (IC) de los vinagres obtenidos en la Fase 2 (*Tabla 18*), no fue afectada significativamente (*Anexo 4*), a diferencia de lo observado en la etapa de vino (*Tabla 17*).

En la Fase 1, las tablas *14* y *15* muestran que en el paso de vino a vinagre se reduce el contenido de AMT. Similar comportamiento se observa en la Fase 2 (tablas *17* y *18*) y en la Fase 3 (tablas *20* y *21*). Una posible explicación a este fenómeno es la actividad antocianasa observada en algunas bacterias, por ejemplo, *Oenococcus oeni* (Barbagallo, Spagna, Palmeri y Torriani, 2004), a partir de lo cual se puede asumir un similar comportamiento en *Acetobacter aceti*. Al respecto, Barbagallo, Palmeri, Fabiano, Rapisarda y Spagna (2007) reportaron que sistemas enzimáticos como antocianasa podrían intervenir en el proceso de degradación de las antocianinas, las cuales actúan hidrolizando y oxidando estas moléculas.

Otra posible explicación a este efecto es la polimerización de los antocianos de bajo peso molecular, especialmente cuando su concentración alcanza valores altos (Hoshino et al., 1992; Dangles et al., 1994). Al respecto, Cerezo et al. (2010), reportó que después del proceso de acetificación, la mayoría de los compuestos de tipo vitisina aumentan significativamente, siendo uno de ellos los isómeros de malvidina-3-glucósido-etil-catequina, generando como consecuencia una disminución en la concentración de su antocianina monomérica respectiva.

Finalmente, cabe mencionar que muchos de los trabajos realizados en producción de vinagre de frutas, reportan que el proceso de acetificación disminuye la concentración de compuestos fenólicos, principalmente de antocianinas, y por tanto de la actividad antioxidante (Ubeda et al., 2013; Cerezo et al., 2008; Su y Chien, 2007; Andlauer, Stumpf, Fürst, 2000). Lo cual fue también evidenciado en el presente estudio.

4.1.4 Efecto de la radiación microondas sobre la extracción de antocianos en el vino base

Brahim, Gabier y Brosse (2014) demostraron que la radiación microondas altera la estructura sólida de las paredes celulares, facilitando la migración y por tanto la extracción de compuestos fenólicos. Similares resultados fueron reportados por Liazid et al. (2011).

No obstante, en el presente trabajo (Fase 3) no se mejoró la extracción de AMT y fenoles totales (*Tabla 20* y *Figura 11*, respectivamente) al irradiar los arándanos con microondas, debida a que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los vinos obtenidos a partir de los arándanos irradiados, respecto a los obtenidos de arándanos sin irradiar.

Una posible explicación estaría en la diferente composición química de la piel del arándano respecto a la piel de uva tratada en los estudios de Brahim et al. (2014) y Liazid et al. (2011). Además, en dichos estudios utilizaron la radiación microondas sobre piel de uva estrujada en contacto con el medio lixivante (mosto), a diferencia del presente estudio donde la baya de arándano fue tratada sin estrujar (entera). Adicionalmente, Pratt (1971) señala que, durante el desarrollo de las bayas, desde el ovario de la flor hasta la fruta madura, existen numerosos cambios fisiológicos: división celular y alargamiento de las células, por lo que la piel y la pulpa de la baya se desarrollan de modo diferente y tienen distinta estructura. Lo cual explicaría la resistencia a la radiación de la piel del arándano, sin obtener una mejora en la extracción fenólica (*Tabla 20*).

Una posible mejora para estudios futuros sería irradiar las bayas de arándano ya estrujadas a fin de facilitar la extracción de los compuestos fenólicos, considerando que Tomaz et al. (2019), menciona que, al pasar la radiación microondas por el medio líquido (agua del mosto), se convierte en energía térmica, incrementando la temperatura del líquido, y por tanto la presión dentro de las células, produciendo la degradación de estas.

4.1.5 Capacidad antioxidante de los vinagres elaborados

Otro de los parámetros evaluados fue la capacidad antioxidante del vinagre mediante los métodos DPPH y ABTS. No obstante, los datos reportados solamente corresponden a los resultados obtenidos con el método DPPH, dado que con el método ABTS todas las muestras analizadas mostraron porcentajes de inhibición iguales al 100% (datos no reportados). Estos datos no se validaron estadísticamente para la Fase 2 por no tener replicaciones, sin embargo, se puede observar que tiene tendencia a aumentar o disminuir de acuerdo a los factores (cepa de levadura y contenido de azúcares).

Por otro lado, se encontraron diferencias entre los resultados obtenidos con los métodos DPPH y ABTS, lo cual se explica en que sus condiciones de reacción y cinética son diferentes. El radical DPPH es estable en su formación por fácil disolución en alcohol, mientras que el radical ABTS requiere de una activación previa con un oxidante ($K_2S_2O_8$), haciéndolo menos estable (Floegel, Kin, Chung, Koo y Chun, 2011). Con el ABTS se puede evaluar la actividad antioxidante de compuestos tanto de naturaleza hidrofílica como lipofílica, mientras que con el DPPH solo en compuestos hidrofílicos (Surveswaran, Cai, Corke y Sun, 2007), lo cual explica los mayores porcentajes de inhibición (Q, %) obtenidos con el método ABTS (en todas las muestras Q = 100%), respecto al método DPPH (Figuras 8, 12 y 16), en concordancia con Floegel et al. (2011).

De acuerdo con los resultados mostrados en la *Tabla 21*, aparentemente la aplicación de microondas sobre las bayas de arándano no incrementó la extracción de AMT (no se observan diferencias estadísticamente significativas). Sin embargo, la *Figura 16* muestra una disminución en la capacidad antioxidante en el vinagre elaborado a partir del vino del arándano irradiado durante 30 segundos. Este fenómeno estaría relacionado con el efecto sobre la

estabilidad de los antocianos frente a la radiación (Morata et al., 2015), de modo que la dosis y el tiempo de irradiación son dos parámetros de vital importancia respecto a la aplicación del microondas para mejorar la extracción de compuestos fenólicos.

4.2 Conclusiones

- En la etapa de elaboración de vino base, la adición de azúcares exógenos al mosto de arándano (*chaptalización*), hasta los 22.6 °Brix, permite incrementar el grado alcohólico y por tanto mejorar la extracción de antocianos y la intensidad colorante.
- La aplicación de radiación microondas durante 30 y 60 segundos, a una potencia de 70 Watts al fruto de arándano no mejoró la extracción de antocianos durante la fermentación alcohólica.
- El paso de vino a vinagre reduce el contenido de compuestos fenólicos, en promedio un 68% (Fase 1), 90% (Fase 2) y 62% (Fase 3), principalmente de antocianos. De modo que, la aplicación de estrategias tecnológicas como la *chaptalización*, previo a la fermentación alcohólica es de vital importancia para lograr una alta extracción fenólica hacia el vino, de modo que, al finalizar la siguiente etapa de fermentación acética, el contenido de compuestos bioactivos no se vea considerablemente afectado.
- El efecto individual de las cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (7VA y US-05) en la elaboración del vino base no presentó mejoras significativas en el perfil bioactivo del vinagre obtenido. Sin embargo, el efecto combinado de la cepa US-05 con la *chaptalización*, demostraron un incremento del contenido de AMT.

REFERENCIAS

- Aguilar, T., De Brujin, J., Loyola, C., Vidal, L. y Melín, P. (2014). Comparación de la capacidad antioxidante de mostos y vinos tintos del valle del Itata, Chile. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, 10, 85-94.
- Al-Awwadi, N.A., Araiz, C., Bornet, A., Delbosc, S., Cristol, J., Linck, N., Azay, J., Teissedre, P. y Cros, G. (2005). Extracts enriched in different polyphenolic families normalize increased cardiac NADPH oxidase expression while having differential effects on insulin resistance, hypertension, and cardiac hypertrophy in high-fructose-fed rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 151-7.
- Alighourchi, H., Barzegar, M. y Abbasi, S. (2008). Effect of gamma irradiation on the stability of anthocyanins and shelf-life of varios pomegranate juices. *Food chemistry*, 110(2008), 1036-1040.
- Almenar, E., Auras, R., Rubino, M. y Harte, B. (2007). A new technique to prevent the main post harvest diseases in berries during storage: Inclusion complexes – cyclodextrin-hexannal. *International Journal of Food Microbiology*, 118(2), 164-172.
- Álvarez, A., Poejo, J., Matias, A., Duarte, C., Cocero, M. y Mato, R. (2017). Microwave pretreatment to improve extraction efficiency and polyphenol extract richness from grape pomace. Effect on antioxidant bioactivity. *Food and Bioproducts Processing*, 106, 162-170.
- Andlauer W., Stumpf C. y Fürst P. (2000). Influence of the acetification process on phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3533–36.

- AOAC 981.12. Method to determine pH of Acidified Foods. Official Methods of Analysis. Association of Analytical Chemists (AOAC). Arlington. United States.
- Barba, F.J., Esteve, M.J. y Frigola, A. (2013). Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing. *Food Research International*, 50(2), 545-549.
- Barbagallo, R., Palmeri, R., Fabiano, S., Raspisarda, P. y Spagna, P. (2007). Characteristic of β -glucosidase from Sicilian blood oranges in relation to anthocyanin degradation. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 50-575.
- Barbagallo, R., Spagna, G., Palmeri, R. y Torriani, S. (2004). Assessment of β -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 292-296.
- Basu, A., Du, M., Leyva, M., Sánchez, K., Betts, N., Wu, M., Aston, C. y Lyons, T. (2010). Blueberries decrease cardiovascular risk factors in obese men and women with metabolic syndrome. *Journal of Nutrition*, 140(9), 1582–1587.
- Brahim, M., Gambier, F. y Brosse, N. (2014). Optimization of polyphenols extraction from grape residues in water medium. *Industrial Crops and Products*, 52, 18–22.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. y Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Brouillard, R. y Dangles, O. (1994). Flavonoids and flower colour. En Harbone, J. (Ed.), *The Flavonoids advances in research since 1986* (pp. 565-588). London, United Kingdom: Chapman and Hall.

- Budak, N., Aykin, E., Seydim, A., Greene, A., y Seydim, Z. (2014). Functional properties of vinegar. *Journal of Food Science*, 79(5), 757-764.
- Caló, R. y Marabini, L. (2014). Protective effect of *Vaccinium myrtillus* extract against UVA- and UVB-induced damage in a human keratinocyte cell line (HaCaT Cells). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 132(5), 27-35.
- Castagnini, J. (2014). *Estudio del proceso de obtención de zumo de arándanos y su utilización como ingrediente para la obtención de un alimento funcional por impregnación a vacío*. (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
- Cerezo, A., Cuevas, E., Winterhalter, P., Garcia, M. y Troncoso, A. (2010). Anthocyanin composition in *Cabernet Sauvignon* red wine vinegar obtained by submerged acetification. *Food research international*, 43(2010), 1577-1584.
- Cerezo, A., Tesfaye, W., Torija, M., Mateo, E., García, M. y Troncoso, M. (2008). The phenolic composition of red wine vinegar produced in barrels made from different woods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 109(3), 606-615.
- Charoenkiatkul, S., Thiyajai, P. y Judprasong, K. (2016). Nutrients and bioactive compounds in popular and indigenous durian (*Durio zibethinus* murr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 193, 181-186.
- Chiabrando, V. y Giacalone, G. (2011). Shelf-life extension of highbush blueberry using 1-methyleyleopropene stored under air and controlled atmosphere. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 126(4), 1812-1816.

- Chou, C., Liu, C., Yang, D., Wu, Y. y Chen, Y. (2015). Amino acid, mineral, and polyphenolic profiles of black vinegar, and its lipid lowering and antioxidant effects *in vivo*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 168, 63-69.
- Contreras, C. y Del Campo. M. (2014). *Productos de la fermentación alcohólica; un beneficio para la salud*. (Tesis de pregrado). Universidad de San Buena Aventura, Bogotá, Colombia.
- Corrales, L., Antolinez, D., Bohórquez, J. y Corredor, A. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *Nova*, 13, 55-81.
- Dinamarca, P., Poblete, R. y Sánchez, A. (1986). *Aspectos técnico económico en la producción de berries*. Santiago de Chile, Chile: Editorial Fundación Chile.
- España. Ley 24/2003, de 10 de julio, de la Viña y del Vino. *Boletín Oficial del Estado*, 11 de julio de 2003.
- España. Real Decreto 661/2012, de 13 de abril, de calidad para la elaboración y comercialización de los vinagres. *Boletín Oficial del Estado*, 26 de abril de 2012.
- Espinoza, M., Gómez, E., Aguilar, J., Cabanillas, J., Santa Cruz, M., Rodríguez, I., Ríos, R., Zuta, I. y Siche., R. (2016). Impacto térmico del secado por Ventana RefractanteTM sobre los metabolitos antioxidantes de la cáscara del membrillo (*Cydonia oblonga L.*). *Agroindustrial Science*, 5, 143–151.
- Etherton, P., Lefevre, M., Beecher, G., Gross, M., Keen, C. y Etherton, T. (2004). Bioactive compounds in nutrition and health-research methodologies for establishing biological function: the antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids on atherosclerosis. *Annual Review of Nutrition*, 24, 511-538.

- Fermentis Division of S.I. Lesaffre. (2016). *SafAle US-05*. Recuperado de <https://fermentis.com/wp-content/uploads/2017/10/SafAle-US-05.pdf>
- Fermentis. (2019). SafAle US-05. Recuperado de <https://fermentis.com/en/fermentation-solutions/you-create-beer/safale-us-05/>
- Flanzy, C. (2000). *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Floegel, A., Kin, D., Chung, S., Koo, S. y Chun, O. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048.
- Food and agriculture organization of the United Nations (FAO) (s.f). *Vitaminas*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/w0073s/w0073s0f.htm>
- Frontela, C., Canali, R. y Virgili, F. (2010). Empleo de compuestos fenólicos en la dieta para modular la respuesta inflamatoria intestinal. *Gastroenterología y Hepatología*, 33(4), 307-312.
- Fukami, H., Tachimoto, H., Kishi, M., Kaga, T., y Tanaka, Y. (2010). Acetic acid bacteria lipids improve cognitive function in dementia model rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 4084-4089.
- Fushimi, T., Tayama, K., Fukaya, M., Kotakoshi, K., Nakai, N., y Tsukamoto, Y. (2001). Acetic acid feeding enhances glycogen repletion in liver and skeletal muscle of rats. *Journal of Nutrition*, 131, 1973-1977.

- Gamarra, J. (2016). *Estrategias de mercado para fomentar la exportación de arándano (Vaccinium spp.) desde Lima a Estados Unidos*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
- Garzón, G. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: *Acta Biológica Colombiana*, 13, 27-36.
- Georgi, M. (1992). *Comportamiento de arándano, mora cultivada y mora silvestre en almacenamiento refrigerado y su impacto en la calidad* (Tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Gil, A., González, A., Díaz, V. y Pereda, W. (2016). Mejora de los parámetros colorimétricos en vino de arándano (*Vaccinium corymbosum*) mediante chaptalización. *Agroindustrial Science*, 6(1).
- Giusti, M. y Wrolstad R. (2001). Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad, R.E. editors. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (pp. 1-13). New York, EEUU: John Wiley and Sons.
- Granato D, Katayama F. y Alves, I. (2011). Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 129(2), 366–373.
- Gutiérrez, A., Gribenow, F., Rolando, S. y Zúñiga, W. (2017). *Exportación de arándano azul orgánico a estados unidos*. (Tesis de maestría). Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, Lima, Perú.
- Gutiérrez, M. y Sánchez, M. (2014). *Producción y exportación de arándanos para Estados Unidos*. (Tesis de maestría). Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, Lima, Perú.

- Holtung, L., Grimmer, S. y Aaby, K. (2011). Effect of processing of black currant press-residue on polyphenol composition and cell proliferation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 3632–3640.
- Horiuchi, J., Kanno, T. y Kobayashi, M. (1999). New vinegar production from onions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 23(433), 107-109.
- Hoshino, T., Matsumoto, U. y Goto, T. (1982). Evidence for the self-association of anthocyanins in neutral aqueous solution. *Phytochemistry*, 20(8), 1971-1976.
- Huertas, E. (2019). Las enfermedades al corazón son la primera causa de muerte en adultos del Perú [Mensaje en un blog]. Recuperado de <https://vital.rpp.pe/salud/las-enfermedades-al-corazon-son-la-primera-causa-de-muerte-en-adultos-del-peru-segun-estudio-noticia-1185333>
- Hutchings, J. (1999). Food color and appearance. 2nd ed. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers.
- Jaime, M. y Sosa, M. (2017). Tratamientos postcosecha con microondas en uvas para el control del moho *Botrytis cinerea*. *Revista Jóvenes en la ciencia*, 3(2), 2490-2494.
- Jiang, H.L., Yang, J.L., Shi, Y.P. (2017). Optimization of ultrasonic cell grinder extraction of anthocyanins from blueberry using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 325-331.
- Laranjinha, J., Almeida L. y Madeira V. (1994). Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation. *Biochemical Pharmacology*, 48(3), 487- 494.

- Lee, J., Cho, H., Jeong, J., Lee, M., Jeong, Y., Shim, K. y Seo, K. (2013). New vinegar produced by tomato suppresses adipocyte differentiation and fat accumulation in 3T3-L1 cells and obese rat model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 141(3), 3241-3249.
- Liazid, A., Guerrero, R., Cantos, E., Palma, M. y Barroso, C. (2011). Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 124(3):1238-1243.
- Liazid, A.; Guerrero, R.; Cantos, E.; Palma, M. y Barroso, C. (2011). Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 124, 1238-1243.
- Liu, J., Zhang, W., Jing, H. y Popovich, D. (2010). Bog bilberry (*Vaccinium uliginosum* L.) extract reduces cultured Hep-G2, Caco-2, and 3T3-L1 cell viability, affects cell cycle progression, and has variable effects on membrane permeability. *Journal of Food Science*, 75(3), 103–107.
- Llaguno C. y Polo C. (2004). *El vinagre de vino*. Madrid, España: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Lopes, C. y Samgorrín, M. (2010). Optimization of killer assays for yeast selection protocols. *Revista Argentina de Microbiología*, 42, 298-306.
- Martineau, L.C., Couture, A., Spoor, D., Benhaddou-Andaloussi, A., Harris, C., Meddah, B., Leduca, C., Burtc, A., Vuonga, T. y Le, P. (2006). Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Aiton. *Phytomedicine*, 13(9-10), 612–623.

Ministerio de Agricultura y Riego (2016). El arándano en el Perú y en el mundo: producción comercio y perspectivas. Recuperado de

http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/tematicas/f-taxonomia_plantas/f01-cultivo/el_arandano.pdf

Ministerio de Salud. (2019). *Boletín epidemiológico del Perú*. Recuperado de <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2019/05.pdf>

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.

Montti, M. (2010). *Desarrollo de nuevas metodologías para el análisis de fungicidas triazólicos en arándanos*. (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

Morata, A. (2004). *Influencia de la maduración antociánica de la uva y de la biotecnología fermentativa en color, aroma y estructura de vinos tintos* (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Madrid, España.

Morata, A., Gómez-Cordovés, M., Calderón, F. y Suárez, J. (2004). Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes. *European Food Research and Technology*, 220, 341-346.

Morata, A., Gómez-Cordovés, M., Calderón, F. y Suárez, J. (2005). Effects of pH, temperatura and SO₂ on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermentation with two species of *Saccharomyces*. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 123-129.

- Morata, A., Bañuelos, M.A., Tesfaye, W., Loira, I., Palomero, F., Benito, S., Callejo, M.J., Villa, A., González, M.C., Suárez-Lepe, J.A. (2015). Electron beam irradiation of wine grapes: Effect on microbial populations, phenol extraction and wine quality. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 1845-1853.
- Morata, A.; Loira, I.; Vejarano, R.; Bañuelos, M.A.; Sanz, P.; Otero, L.; Suárez-Lepe, J.A. (2015). Grape processing by high hydrostatic pressure: Effect on microbial populations, phenol extraction and wine quality. *Food and Bioprocess Technology*, 8(2), 277-286.
- Moyer, R., Hummer, K., Finn, C., Frei, B. y Wrolstad, R. (2002). Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus* and *Ribes*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50(3), 519-525.
- Mu, J., Yu, Z., Wu, W., y Wu, Q. (2006). Preliminary study of application effect of bamboo vinegar on vegetable growth. *Forestry Studies in China*, 8(3), 43-47.
- Munitz, M. (2013). *Arándanos: micoflora contaminante, micotoxinas, residuos de fungicidas y cinéticas de degradación*. (Tesis doctoral). Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Nishidai, S., Nakamura, Y., Torikai, K., Yamamoto, M., Ishihara, N., Mori, H. y Ohigashi, H. (2000). Kurosu, a traditional vinegar produced from unpolished rice, suppresses lipid peroxidation *in vitro* and in mouse skin. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64(9), 1909-1914.
- Ofek, I., Goldhar, J., Zafriri, D., Lis, H., Adar, R. y Sharon, N. (1991). Anti-*Escherichia coli* adhesin activity of cranberry and blueberry juices. *New England Journal of Medicine*, 324(22), 1599.

OIV MA-AS2-07B. Method to determine chromatics characteristics. Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. Volume I. International Organization of Vine and Wine (OIV). Paris. France.

OIV MA-AS312-01. Method to determine alcoholic strength. Compendium of International Methods of Vinegar Wine Analysis. Volume I. International Organization of Vine and Wine (OIV). Paris. France.

OIV. 2016. International Code of Oenological Practices. International Organization of Vine and Wine (OIV). Paris. France.

OIV. 2018. Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. Volume I. International Organization of Vine and Wine (OIV). Paris. France.

OIV-MA-AS2-10. Method to determine Folin-Ciocalteu Index. Compendium of International Methods of Vinegar Wine Analysis. Volume I. International Organization of Vine and Wine (OIV). Paris. France.

OIV-MA-AS313-01. Method to determine total acidity. Compendium of International Methods of Vinegar Wine Analysis. Volume I. International Organization of Vine and Wine (OIV). Paris. France.

Oliveira, J., Becker, O., Villar, F. y Salas, M. (2007). Estudio del arándano (*Vaccinium corymbosum*) en el procesamiento de productos alimenticios. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 27, 18-22.

Osada, K., Suzuki, T., Karakami, Y., Senda, M., Kasai, A., Sami, M., Ohta, Y., Kanda, T., y Ikeda, M. (2006). Dose-dependent hypocholesterolemic actions of dietary apple phenol in rats fed cholesterol. *Lipids*, 41(2), 133-139.

- Ozturk, I., Caliskan, O., Tornuk, F., Ozcan, N., Yalcin, H., Baslar, M. y Sagdic, O. (2015). Antioxidant, antimicrobial, mineral, volatile, physicochemical and microbiological characteristics of traditional home-made Turkish vinegars. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 144–151.
- Pervin, M., Hasnat, A., Lim, J.H., Lee, Y.M., Kim, E., Umb, B.H., Lim, B. (2016). Preventive and therapeutic effects of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) extract against DSS-induced ulcerative colitis by regulation of antioxidant and inflammatory mediators. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 28, 103-113.
- Pino, C. (2007). *Descripción del desarrollo vegetativo y de las características físicas y químicas de los frutos de cuatro clones de arándano alto (Vaccinium corymbosum L.)* (Tesis de pregrado). Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Pizarro, C., Esteban, I., Sáenz, C. y González, J. (2008). Vinegar classification based on feature extraction and selection from headspace solid-phase microextraction/gas chromatography volatile analyses: A feasibility study. *Analytica Chimica Acta*, 608(1), 38-47.
- Pomareda, C. (2015). Berries: Entre oportunidades y Desafíos. *Revista Agroenfoque*, 197, 28-32.
- Pratt, C. (1971). Reproductive Anatomy in Cultivated Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 22, 92-109.
- Prior, R., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G. y Mainland, M. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 46(7), 2686-2693.

- Prior, R., Wu, X., Gu, L., Hager, T., Hager, A., Wilkes, S. y Howard, L. (2009). Purified berry anthocyanins but not whole berries normalize lipid parameters in mice fed an obesogenic high fat diet. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(11), 1406–1418.
- Qui, J., Ren, C., Fan, J., y Li, Z. (2010). Antioxidant activities of aged oat vinegar *in vitro* and in mouse serum and liver. *Journal of the Science and Food Agriculture*, 90(11), 1951-1958.
- Raspor, P. y Goranovic, D. (2008). Biotechnological applications of acetic acid bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(2), 101-124.
- Rebolo S. (2007). *Estudio de la composición polifenólica de vinos tintos gallegos con D.O.: Ribeiro, Valdeorras y Ribeira Sacra*. (Tesis doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Sakanaka, S. y Ishihara, Y. (2008). Comparison of antioxidant properties of persimmon vinegar and some other commercial vinegars in radical-scavenging assays and on lipid oxidation in tuna homogenates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 107(2), 739-744.
- Salbe, A., Jognston, C., Buyukbese, M., Tsitouras, P. y Harman, S. (2009). Vinegar lacks antiglycemic action on enteral carbohydrate absorption in human subjects. *Nutrition Research*, 29, 846-849.
- Sapers, G., Burgher, A., Phillips, J., y Jones, S. (1987). Color and composition of highbush blueberry cultivars. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 109(1), 105-111.

- Schantz, M., Mohn, C., Baum, M., Richling, E. (2010). Antioxidative efficiency of an anthocyanin rich bilberry extract in the human colon tumor cell lines Caco-2 and HT-29. *Journal of Berry Research*, 1(1), 25–33.
- Segura, C., Posada, E., Revuelta, A., Bohorquez, N. y Pérez, W. (2015). Caracterización fisicoquímica de vinagres obtenidos a partir de mostos de uva (*Vitis labrusca*). En L. Gómez (Presidencia), *Inclusión social y desarrollo humano*. Conferencia llevada a cabo en el Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo, Manizales, Colombia.
- Shellapan, S., Akoh, C. y Krewer, G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 519-525
- Shen, C., Von Bergen, V., Chyu, M., Jenkins, M., Mo, H., Chen, C. y Kwun, I. (2012). Fruits and dietary phytochemicals in bone protection. *Nutrition Research*, 32(12), 897–910.
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., Sochor, J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 24673-24706.
- Srivastava, A., Akoh, C., Fischer, J. y Krewer, G. (2007). Effect of anthocyanin fractions from selected cultivars of Georgia-grown blueberries on apoptosis and phase II enzymes. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 55(8), 3180–3185.
- Stull, A., Cash, K., Johnson, W., Champagne, C. y Cefalu, W. (2010). Bioactives in blueberries improve insulin sensitivity in obese, insulin-resistant men and women. *Journal of Nutrition*, 140(10), 1764–1768.

- Su, M. y Chien, P. (2007). Antioxidant activity, anthocyanins and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 104(1), 182-187.
- Superintendencia Nacional de Aduanas y Administración Tributaria. (2018). *Exportación definitiva, principales subpartidas nacionales*. Recuperado de <http://www.sunat.gob.pe/estadisticasestudios/exportaciones.html>
- Superintendencia Nacional de Aduanas y Administración Tributaria. (2018). *Exportación definitiva, principales subpartidas nacionales por país destino*. Recuperado de <http://www.sunat.gob.pe/estadisticasestudios/exportaciones.html>
- Superintendencia Nacional de Aduanas y Administración Tributaria. (2018). *Régimen aduanero de exportación: exportación definitiva, principales subpartidas nacionales por categoría de producto, 2000 - 2017 (peso bruto en toneladas)*. Recuperado de http://www.sunat.gob.pe/estad-comExt/modelo_web/boletines.html
- Surveswaran, S., Cai, Y., Corke, H. y Sun, M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, 102(3), 938-953.
- Taipe, K. *Efecto de la levadura (Saccharomyces cerevisiae) y los grados brix en las características del vinagre de Ananas comosus L. descarte en Río Negro – Satipo* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional del Centro del Perú, Huancayo, Perú.
- Tassa E. (2000). *Elaboración de bebidas alcohólicas fermentadas de naranja*. Universidad Nacional Agraria de la Selva (UNAS). Tingo María, Huánuco, Perú.
- Thostenson, E. y Chou, T. (1999). Microwave processing: fundamentals and applications. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 30(9), 1055-1071.

- Tomaz, I., Huzanić, N., Preiner, D., Stupić, D., Andabaka, Ž., Maletić, Edi., Kontić, J. y Ašperger, D. (2019). Extraction methods of polyphenol from grapes: Extractions of grape polyphenols. (2da Edición). *Polyphenols in plants* (pp. 151-167). Massachusetts, Estados Unidos: Academic Press.
- Tovar, J. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante pro DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecorregión cafetera*. (Tesis de pregrado). Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Risaralda, Colombia.
- Ubeda, C., Callejón, R., Hidalgo, C., Torija, M., Troncoso, A., y Morales, M. (2013). Employment of different processes for the production of strawberry vinegars: Effects on antioxidant activity, total phenols and monomeric anthocyanins. *LWT—Food Science and Technology*, 52(2), 139-145.
- United States Department Agriculture (2019). *Food Composition Databases* (09050 Blueberries, raw). Recuperado de <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search/list>.
- Valls, J. (2004). *Composición fenólica en variedades negras de Vitis vinífera. Influencia de diferentes factores*. (Tesis doctoral). Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España.
- Vázquez, H. y Dacosta, O. (2007). Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*, 4, 249-259.
- Vejarano, M. (2013). *Utilización de bloqueadores metabólicos y optimización de las condiciones de aplicación para la reducción del grado alcohólico en vinos elaborados a partir de uva procedente de zonas cálidas*. (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España.

- Vejarano, R. (2018). *Saccharomyces ludwigii*, control and potential uses in winemaking processes. *Fermentation*, 4(3), 71.
- Vejarano, R., Morata, A., Loira, I., González, M. y Suárez-Lepe, J. (2013). Theoretical considerations about usage of metabolic inhibitors as possible alternative to reduce alcohol content of wines from hot areas. *European Food Research and Technology*, 237(3), 281-290.
- Vejarano, R.; Gil-Calderón, A.; Díaz-Silva, V.; León-Vargas, J. (2019). Improvement of the bioactive profile in wines and its incidence on human health: technological strategies. In: Morata, A.; Loira, I., editors. *Advances in Grape and Wine Biotechnology*. London: IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85861>.
- Verzelloni, E., Tagliazucchi, D., y Conte, A. (2007). Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 105(2), 564-571.
- Villaño, D., Fernández, M., Troncoso, A. y García, M. (2006). Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 95(3), 394-404.
- Viuda, M., Navajas, Y., Zapata, E., Fernandez, J. y Perez, J. (2010). Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Journal*, 25, 13–19.
- Wai Ho, C., Mat Lazim, A., Fazry, S., Hussain Zaki, U y Joe Lim, S. (2016). Varieties, production, composition and health benefits of vinegars: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 221, 1621-1630.

- Wu, X., Kang, J., Xie, C., Burris, R., Ferguson, M., Badger, T. y Nagarajan, S. (2010). Dietary blueberries attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by upregulating antioxidant enzyme expression. *Journal of Nutrition*, 140(9), 1628–1632.
- Yano, T., Aimi, T., Nakano, Y., y Tamai, M. (1997). Prediction of the concentrations of ethanol and acetic acids in the culture broth of a rice vinegar fermentation using near infrared spectroscopy. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(5), 461-465.
- Zhang, Q., Zhang, J., Shen, J., Silva, A., Dennis, D. y Barrow, C. (2006). A simple 96-well microplate method for estimation of total polyphenol content in seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 18(3-5), 445-450.
- Zheng, W. y Wang, S. (2003). Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries and lingonberries. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 51(2), 502-509.
- Zou, X., Li, Y., Shi, J, Huang, X., y Zhao, J. (2012). Traditional vinegars identification by colorimetric sensor. *Procedia Chemistry*, 6, 20-26.

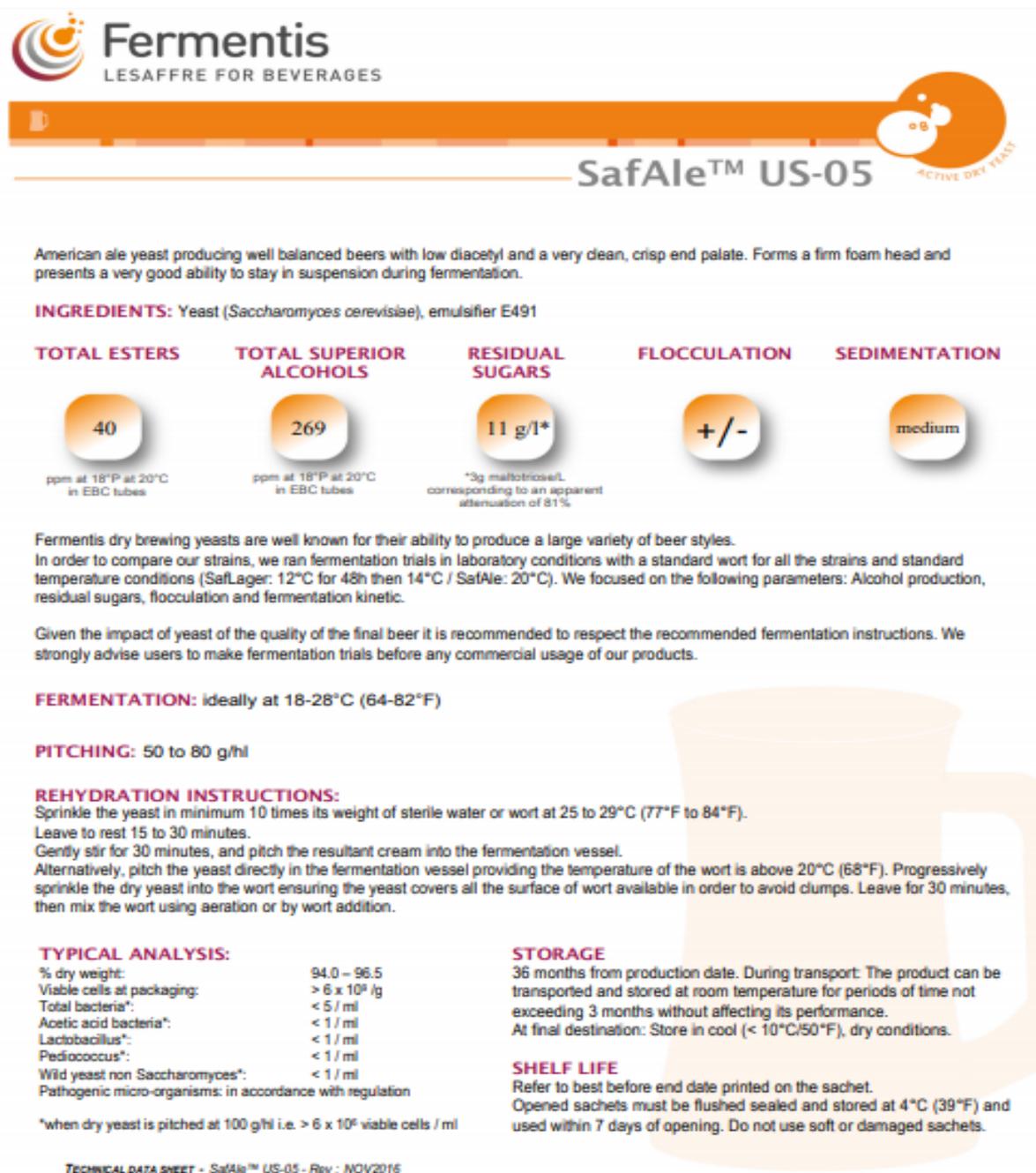
ANEXO 1

Ficha técnica de *Saccharomyces cerevisiae*, cepa vinífera 7VA. Fuente: Morata (2004).

Cepa 7VA						
Taxonomía	D. O. (aislamiento)		Variedad	Fase		
<i>S. bayanus</i>	Ribera del Duero		Tempranillo	Residual		
Temperatura (°C)	25	25	32	25	25	25
°Bé	13,5	17	13,5	13,5	13,5	13,5
SO ₂ total (mg/L)	-	-	-	100	200	300
Poder fermentativo	14,1±0,2	17,2±0,2	14,4±0,2	14,25	14,00	-
Glicerina (g/L)	7,82±0,37	8,86±0,06	11,08±0,30			
Acetaldehído (mg/L)	12,88±1,78	22,39±4,07	40,55±2,90			
Polisacáridos (mg/L)	896,7±11,5					
Temperatura (°C)	25	25	%Degradación de ácido málico			
°Bé	13,5	15	1,42 g/L	2,16 g/L	3,07 g/L	
Ac. Volátil (g/L de Ach)	0,17±0,01	0,25±0,02	-0,5	-20,3	25,5	
SH ₂ (escala 1-5)	2-3					
Actividades enzimáticas	(escala 1-5)					
Esterasa (C4)	3					
Esterasa Lipasa (C8)	3					
α-glucosidasa	5					
β-glucosidasa	-					
Volátiles Fermentativos	(mg/L)					
METANOL	23,1±3,7					
1 PROPANOL	27,3±1,2					
2 METIL 1 PROPANOL	28,0±6,8					
1 BUTANOL	1,1±2,0					
2 METIL 1 BUTANOL	88,5±17,5					
3 METIL 1 BUTANOL	308,7±46,1					
HEXANOL	4,6±1,8					
Σ ALCOHOLES	481,3±79,0					
ACETATO DE ETILO	26,4±3,7					
ACETATO DE ISOBUTILO	4,1±0,3					
ACETATO DE ISOAMILO	0,0±0,0					
LACTATO DE ETILO	0,0±0,0					
Σ ÉSTERES	30,5±3,9					
Σ VOLÁTILES	523,8±86,1					

ANEXO 2

Ficha técnica de *Saccharomyces cerevisiae*, cepa cervecera Safale US-05. Fuente: Fermentis Division of S.I. Lesaffre (2016).



Fermentis
LESAFFRE FOR BEVERAGES

SafAle™ US-05 ACTIVE DRY YEAST

American ale yeast producing well balanced beers with low diacetyl and a very clean, crisp end palate. Forms a firm foam head and presents a very good ability to stay in suspension during fermentation.

INGREDIENTS: Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), emulsifier E491

TOTAL ESTERS	TOTAL SUPERIOR ALCOHOLS	RESIDUAL SUGARS	FLOCCULATION	SEDIMENTATION
40	269	11 g/l*	+/-	medium
ppm at 18°P at 20°C in EBC tubes	ppm at 18°P at 20°C in EBC tubes	*3g maltotriose/L corresponding to an apparent attenuation of 81%		

Fermentis dry brewing yeasts are well known for their ability to produce a large variety of beer styles. In order to compare our strains, we ran fermentation trials in laboratory conditions with a standard wort for all the strains and standard temperature conditions (SafLager: 12°C for 48h then 14°C / SafAle: 20°C). We focused on the following parameters: Alcohol production, residual sugars, flocculation and fermentation kinetic.

Given the impact of yeast of the quality of the final beer it is recommended to respect the recommended fermentation instructions. We strongly advise users to make fermentation trials before any commercial usage of our products.

FERMENTATION: ideally at 18-28°C (64-82°F)

PITCHING: 50 to 80 g/hl

REHYDRATION INSTRUCTIONS:
Sprinkle the yeast in minimum 10 times its weight of sterile water or wort at 25 to 29°C (77°F to 84°F).
Leave to rest 15 to 30 minutes.
Gently stir for 30 minutes, and pitch the resultant cream into the fermentation vessel.
Alternatively, pitch the yeast directly in the fermentation vessel providing the temperature of the wort is above 20°C (68°F). Progressively sprinkle the dry yeast into the wort ensuring the yeast covers all the surface of wort available in order to avoid clumps. Leave for 30 minutes, then mix the wort using aeration or by wort addition.

TYPICAL ANALYSIS:	
% dry weight:	94.0 – 96.5
Viable cells at packaging:	> 6 x 10 ⁹ /g
Total bacteria*:	< 5 / ml
Acetic acid bacteria*:	< 1 / ml
Lactobacillus*:	< 1 / ml
Pediococcus*:	< 1 / ml
Wild yeast non <i>Saccharomyces</i> *:	< 1 / ml
Pathogenic micro-organisms:	in accordance with regulation

*when dry yeast is pitched at 100 g/hl i.e. > 6 x 10⁹ viable cells / ml

STORAGE
36 months from production date. During transport: The product can be transported and stored at room temperature for periods of time not exceeding 3 months without affecting its performance.
At final destination: Store in cool (< 10°C/50°F), dry conditions.

SHELF LIFE
Refer to best before end date printed on the sachet.
Opened sachets must be flushed sealed and stored at 4°C (39°F) and used within 7 days of opening. Do not use soft or damaged sachets.

TECHNICAL DATA SHEET - SafAle™ US-05 - Rev : NOV2016

ANEXO 3: Fase 1

Análisis de Varianza (ANOVA) y Prueba de Rangos Múltiples para el contenido de AMT del vino base: diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	17501.2	1	17501.2	48.01	0.0202
Intra grupos	729.1	2	364.55		
Total (Corr.)	18230.3	3			

Método: 95.0 porcentaje LSD

Cepa	Casos	Media	Grupos Homogéneos
A	2	254.195	X
B	2	386.486	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Limites
A - B	*	-132.292	82.1514

* indica una diferencia significativa.

Análisis de Varianza (ANOVA) y Prueba de Rangos Múltiples para la intensidad colorante (IC) del vino base: diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.182329	1	0.182329	42.98	0.0225
Intra grupos	0.008485	2	0.0042425		
Total (Corr.)	0.190814	3			

Método: 95.0 porcentaje LSD

Cepa	Casos	Media	Grupos Homogéneos
A	2	1.0805	X
B	2	1.5075	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Limites
A - B	*	-0.427	0.280251

* indica una diferencia significativa.

Análisis de Varianza (ANOVA) y Prueba de Rangos Múltiples para el contenido de AMT del vinagre: diferentes cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en la elaboración del vino base.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2309.94	1	2309.94	30.25	0.0053
Intra grupos	305.406	4	76.3514		
Total (Corr.)	2615.35	5			

Método: 95.0 porcentaje LSD

Cepa	Casos	Media	Grupos Homogéneos
A	3	71.3043	X
B	3	110.547	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
A - B	*	-39.2423	19.8086

* indica una diferencia significativa.

Análisis de Varianza (ANOVA) y Pruebas de Rangos Múltiples para la IC del vinagre: diferentes cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en la elaboración del vino base.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0833082	1	0.0833082	14.26	0.0195
Intra grupos	0.0233613	4	0.00584033		
Total (Corr.)	0.10667	5			

Método: 95.0 porcentaje LSD

Cepa	Casos	Media	Grupos Homogéneos
A	3	0.657667	X
B	3	0.893333	X

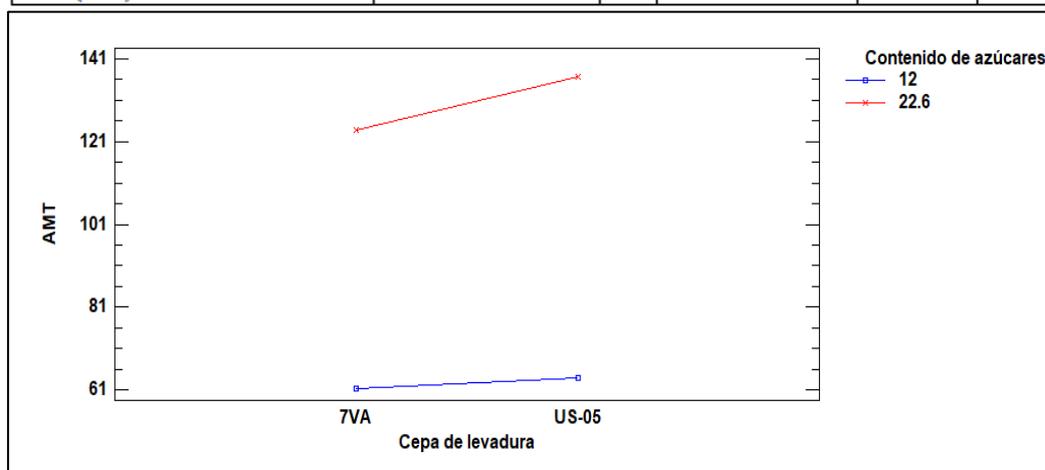
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
A - B	*	-0.235667	0.173246

* indica una diferencia significativa.

ANEXO 4: Fase 2

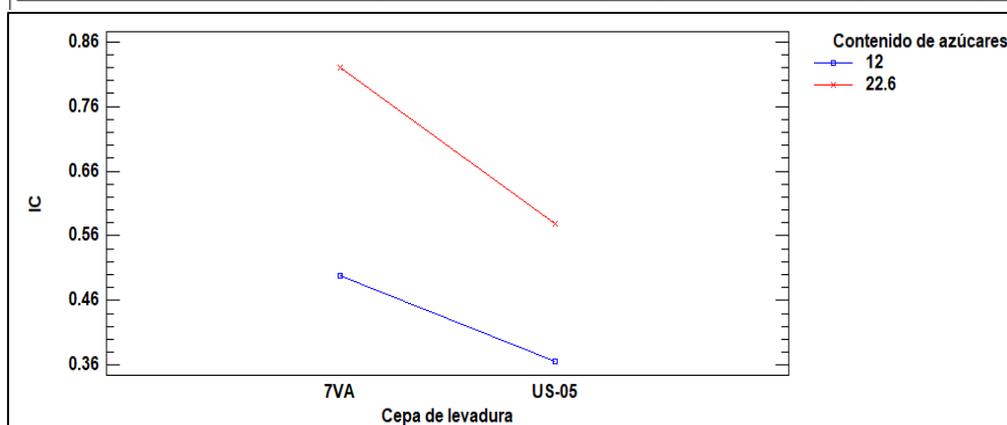
Análisis de Varianza (ANOVA) y Gráfico de Interacciones de las variables independientes, para el contenido de AMT del vino base.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Cepa de levadura+bloque	118.865	1	118.865	10.02	0.0507
B:Contenido de azúcares+bloque	9185.61	1	9185.61	774.07	0.0001
AB	53.0193	1	53.0193	4.47	0.1249
bloques	0.447931	1	0.447931	0.04	0.8584
Error total	35.5998	3	11.8666		
Total (corr.)	9393.55	7			



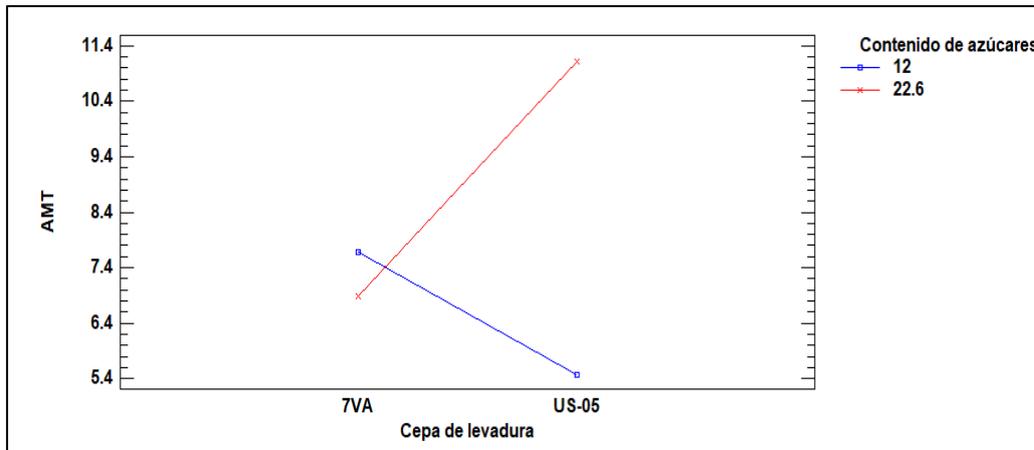
Análisis de Varianza (ANOVA) y Gráfico de Interacciones de las variables independientes, para la IC del vino base.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Cepa de levadura+bloque	0.069938	1	0.069938	190.65	0.0008
B:Contenido de azúcares+bloque	0.143112	1	0.143112	390.13	0.0003
AB	0.0057245	1	0.0057245	15.61	0.0289
bloques	0.0014045	1	0.0014045	3.83	0.1453
Error total	0.0011005	3	0.000366833		
Total (corr.)	0.22128	7			



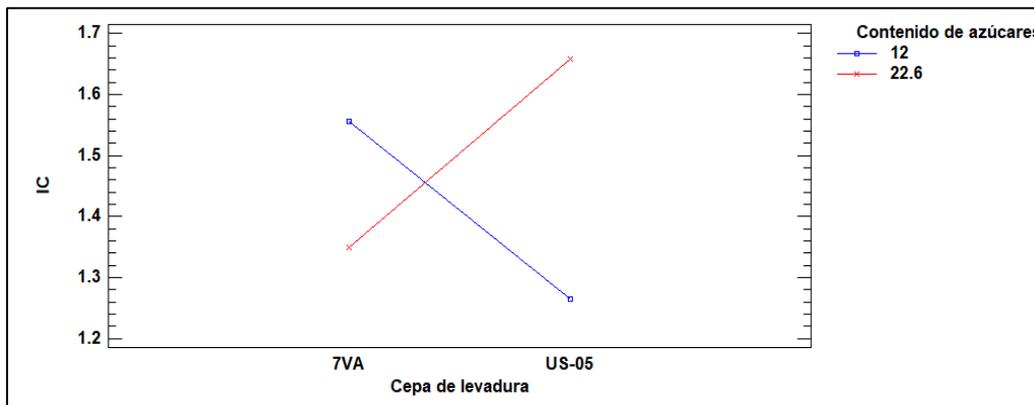
Análisis de Varianza (ANOVA) y Gráfico de Interacciones de las variables independientes, para el contenido de AMT del vinagre.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Cepa de levadura	2.0493	1	2.0493	1.08	0.3749
B:Contenido de azúcares	11.8268	1	11.8268	6.24	0.0879
AB	20.8045	1	20.8045	10.97	0.0453
bloques	38.98	1	38.98	20.56	0.0201
Error total	5.68702	3	1.89567		
Total (corr.)	79.3476	7			



Análisis de Varianza (ANOVA) y Gráfico de Interacciones de las variables independientes, para la IC del vinagre.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Cepa de levadura	0.0001445	1	0.0001445	0.00	0.9845
B:Contenido de azúcares	0.017298	1	0.017298	0.05	0.8319
AB	0.1806	1	0.1806	0.56	0.5089
bloques	0.505012	1	0.505012	1.56	0.2998
Error total	0.968972	3	0.322991		
Total (corr.)	1.67203	7			



ANEXO 5: Fase 3

Análisis de Varianza (ANOVA) y Prueba de Rangos Múltiples para el contenido de AMT del vino base.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	614.49	3	204.83	1.74	0.2960
Intra grupos	469.626	4	117.407		
Total (Corr.)	1084.12	7			

Método: 95.0 porcentaje LSD

Cepa	Casos	Media	Grupos Homogéneos
A	2	69.868	X
A-ch + 30	2	82.9605	X
A-ch	2	88.07	X
A-ch + 60	2	93.514	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Limites
A - A-ch		-18.202	30.0841
A - A-ch + 30		-13.0925	30.0841
A - A-ch + 60		-23.646	30.0841
A-ch - A-ch + 30		5.1095	30.0841
A-ch - A-ch + 60		-5.444	30.0841
A-ch + 30 - A-ch + 60		-10.5535	30.0841

* indica una diferencia significativa.

Análisis de Varianza (ANOVA) y Prueba de Rangos Múltiples para la IC del vino base.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.122343	3	0.0407811	9.00	0.0298
Intra grupos	0.0181165	4	0.00452912		
Total (Corr.)	0.14046	7			

Método: 95.0 porcentaje LSD

Cepa	Casos	Media	Grupos Homogéneos
A	2	0.884	X
A-ch + 60	2	1.084	X
A-ch + 30	2	1.1215	X
A-ch	2	1.225	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Limites
A - A-ch	*	-0.341	0.186852
A - A-ch + 30	*	-0.2375	0.186852
A - A-ch + 60	*	-0.2	0.186852
A-ch - A-ch + 30		0.1035	0.186852
A-ch - A-ch + 60		0.141	0.186852
A-ch + 30 - A-ch + 60		0.0375	0.186852

* indica una diferencia significativa.

Análisis de Varianza (ANOVA) y Prueba de Rangos Múltiples para el contenido de fenoles totales del vino base.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	999.695	3	333.232	1.13	0.4368
Intra grupos	1178.79	4	294.697		
Total (Corr.)	2178.48	7			

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Cepa</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
A	2	136.305	X
A-ch + 60	2	152.664	X
A-ch	2	161.233	X
A-ch + 30	2	165.517	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
A - A-ch		-24.928	47.6627
A - A-ch + 30		-29.2125	47.6627
A - A-ch + 60		-16.359	47.6627
A-ch - A-ch + 30		-4.2845	47.6627
A-ch - A-ch + 60		8.569	47.6627
A-ch + 30 - A-ch + 60		12.8535	47.6627

* indica una diferencia significativa.

Análisis de Varianza (ANOVA) y Prueba de Rangos Múltiples para el contenido de AMT del vinagre.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	268.259	2	134.129	0.55	0.5974
Intra grupos	2211.53	9	245.725		
Total (Corr.)	2479.78	11			

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Cepa</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
A-ch	6	26.913	X
A-ch + 60	4	34.6917	X
A-ch + 30	2	38.6165	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
A-ch - A-ch + 30		-11.7035	28.9536
A-ch - A-ch + 60		-7.77875	22.8898
A-ch + 30 - A-ch + 60		3.92475	30.71

* indica una diferencia significativa.

Análisis de Varianza (ANOVA) y Prueba de Rangos Múltiples para la IC del vinagre.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.0367575	2	0.0183787	0.28	0.7628
Intra grupos	0.592815	9	0.0658683		
Total (Corr.)	0.629572	11			

Método: 95.0 porcentaje LSD

Cepa	Casos	Media	Grupos Homogéneos
A-ch	6	1.206	X
A-ch + 30	2	1.257	X
A-ch + 60	4	1.32975	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
A-ch - A-ch + 30		-0.051	0.474042
A-ch - A-ch + 60		-0.12375	0.374763
A-ch + 30 - A-ch + 60		-0.07275	0.502797

* indica una diferencia significativa.

Análisis de Varianza (ANOVA) y Prueba de Rangos Múltiples para el contenido de fenoles totales del vinagre.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7134.22	2	3567.11	3.72	0.0664
Intra grupos	8623.79	9	958.199		
Total (Corr.)	15758.0	11			

Método: 95.0 porcentaje LSD

Cepa	Casos	Media	Grupos Homogéneos
A-ch	6	181.149	X
A-ch + 30	2	225.604	XX
A-ch + 60	4	231.807	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
A-ch - A-ch + 30		-44.4545	57.175
A-ch - A-ch + 60	*	-50.6575	45.2008
A-ch + 30 - A-ch + 60		-6.20296	60.6432

* indica una diferencia significativa.