



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**

**EFFECTO DE UNA CEPA DE BACTERIA ACÉTICA NATIVA SOBRE LA  
COMPOSICIÓN FENÓLICA DE VINAGRES OBTENIDOS A PARTIR DE VINO  
BLANCO Y TINTO**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGRÓNOMO Y  
GRADO DE MAGÍSTER EN ENOLOGÍA Y VITIVINICULTURA**

**CAROLINA ALEJANDRA RIVERA CARO**

**DIRECTOR DE TESIS**  
**ALVARO PEÑA NEIRA**  
**JAIME ROMERO ORMAZÁBAL**

**PROFESORES CONSEJEROS**  
**CARLA JARA CAMPOS**  
**ELIAS OBREQUE SLIER**

**SANTIAGO DE CHILE**

**2013**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**EFFECTO DE UNA CEPA DE BACTERIA ACÉTICA NATIVA SOBRE LA  
COMPOSICIÓN FENÓLICA DE VINAGRES OBTENIDOS A PARTIR DE VINO  
BLANCO Y TINTO**

Tesis para optar al Título profesional de Ingeniero Agrónomo y Grado de magíster en  
Enología y Vitivinicultura

**CAROLINA ALEJANDRA RIVERA CARO**

	Calificaciones (Memoria de Título)	Calificaciones (Tesis de Grado)
<b>Directores de Tesis</b>		
Álvaro Peña Neira Dr. Ingeniero Agrónomo-Enólogo	67	Aprobada
Jaime Romero Ormazábal Dr. Bioquímico	60	Aprobada
<b>Profesores Consejeros</b>		
Carla Jara Campos Dra. Ingeniero Agrónomo-Enólogo	63	Aprobada
Elías Obreque Slier Dr. Ingeniero Agrónomo	65	Aprobada

Santiago, Chile  
2013

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis profesores guías, especialmente al profesor Jaime Romero, por todo su apoyo y comprensión para terminar esta tesis.

A mis amigos, siempre con sus palabras de apoyo

Por último y lo más importante, mi familia, especialmente a mi madre, esposo e hijo por toda su paciencia, sacrificio y apoyo incondicional.

## ÍNDICE

### CAPÍTULO I

<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	1
Antecedentes generales del Vinagre	1
Proceso de Acetificación	2
Factores que intervienen en la acetificación	2
Métodos de elaboración	3
Acetificación en cultivo superficial (lenta)	3
Acetificación en cultivo sumergido (rápida)	4
Bacterias Acéticas	5
Taxonomía	5
Metabolismo de las bacterias acéticas	6
Métodos moleculares de identificación	7
PCR-RFLP 16S rRNA gen	7
PCR-RFLP ITS 16S-23S rRNA gen	8
Compuestos fenólicos	8
Clasificación de compuestos fenólicos	8
Compuestos fenólicos en el vino y vinagre	9
<b>BIBLIOGRAFIA CITADA</b>	12

### CAPÍTULO II

<b>EFFECTO DE UNA CEPA DE BACTERIA ACETICA NATIVA SOBRE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE VINAGRES OBTENIDOS A PARTIR DE VINO BLANCO Y TINTO</b>	17
---	----

<b>RESUMEN</b>	18
<b>ABSTRACT</b>	19
<b>INTRODUCCIÓN</b>	20
Hipotesis	24
Objetivos	24
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	25
Lugar de estudio	25
Materia Prima	25
Microorganismo iniciador de la acetificación	25
Metodología	26
Caracterización fenotípica de <i>Acetobacter cerevisiae</i>	26
Resistencia a etanol	26
Resistencia a anhídrido sulfuroso	27

Caracterización genética de <i>Acetobacter cerevisiae</i>	27
Extracción DNA	27
Condiciones de PCR	28
Análisis de Restricción	28
Proceso de Acetificación	29
Análisis físico-químicos	30
Diseño experimental y análisis estadístico de los datos	31
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	32
Crecimiento de <i>Acetobacter cerevisiae</i> 209 a distintas concentraciones de etanol	32
Resistencia de <i>Acetobacter cerevisiae</i> 209 a distintas concentraciones de anhídrido sulfuroso libre	33
Determinación de presencia de <i>Acetobacter cerevisiae</i> 209 durante el proceso de acetificación	34
Caracterización por PCR-RFLP del gen 16S rRNA	34
Caracterización por PCR-RFLP ITS 16S-23S rRNA	36
Caracterización genética del vinagre de vino blanco y vinagre de vino tinto	37
Análisis físico-químicos	39
Grado Alcohólico	39
Acidez volátil	40
Intensidad colorante y Matiz	40
Compuestos fenólicos	41
Compuestos fenólicos de bajo peso molecular	43
Perfil Antociánico	46
Capacidad Antioxidante	47
<b>CONCLUSIONES</b>	50
<b>BIBLIOGRAFIA CITADA</b>	51

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Análisis físicos químicos y muestras a analizar	29
<b>Cuadro 2.</b> Crecimiento de <i>Acetobacter cerevisiae</i> 209 en medio V50 a 0, 5, 20, 15 y 20 ppm de metabisulfito de potasio al 5%.	33
<b>Cuadro 3.</b> Características físico químicas de vinagres blancos y tintos	38
<b>Cuadro 4.</b> Evolución de la intensidad colorante y matiz durante la elaboración de vinagre.	40
<b>Cuadro 5.</b> Análisis de compuestos fenólicos realizados por espectrofotometría del vino y vinagre.	41
<b>Cuadro 6.</b> Compuestos fenólicos de bajo peso molecular, identificados y cuantificados (mg/L) por HPLC-DAD a 280nm de muestras de vino blanco y vino tinto y, posterior a la acetificación, de vinagre de vino blanco y vinagre de vino tinto.	44
<b>Cuadro 7.</b> Perfil de antocianos, identificados y cuantificados (mg/L) por HPLC-DAD 520nm de vino tinto y vinagre de vino tinto.	45
<b>Cuadro 8.</b> Capacidad antioxidante del vino blanco y tinto y posterior a la acetificación de vinagre de vino blanco y vinagre de vino tinto.	47

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Curvas de crecimiento de <i>Acetobacter cerevisiae</i> 209 en medio V50 a 0, 6, 8 y 10% v/v de etanol.	32
<b>Figura 2.</b> Caracterización genética de <i>Acetobacter cerevisiae</i> 209. Análisis PCR-RFLP del gen 16S rRNA.	34
<b>Figura 3.</b> Caracterización genética de <i>Acetobacter cerevisiae</i> 209. Análisis PCR-RFLP del ITS 16S-23 rRNA.	35
<b>Figura 4.</b> Caracterización genética del vinagre de vino blanco (A) y vino tinto (B). Análisis PCR-RFLP del gen 16S rRNA.	36
<b>Figura 5.</b> Caracterización genética del vinagre de vino blanco (A) y vino tinto (B). Análisis PCR-RFLP ITS 16S-23S rRNA.	37

**ABREVIATURAS**

BA	Bacterias acéticas.
DNA	Ácido desoxirribonucleico (ADN).
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
GY	Medio líquido (5% D-glucosa, 1% extracto de levadura).
GYC	Medio sólido (Glucosa 5%, extracto de levadura 1%, carbonato de calcio 3%)
HLPC	High-Performance Liquid Chromatography. Cromatografía de Alta Eficiencia.
INTA	Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos.
ITS	Internally Transcribed Spacer. Espacio Interno Trascrito
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity. Capacidad de Absorbancia de Radicales de Oxígeno
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa.
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphisms.
RNA	Ribonucleic Acid. Ácido Ribonucleico (ARN)
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal.
TBE	Disolución tampón formada por Tris, borato y EDTA.
UFC	Unidades formadoras de colonias.
UA	Unidades de Absorbancia.
uL	microlitros.
% v/v	Porcentaje volumen/volumen.
°C	Grados Celcius
ppm	partes por millon



## CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Antecedentes Generales del Vinagre

El vinagre ha formado parte de la alimentación humana desde la antigüedad, siendo utilizado principalmente como condimento y conservador de alimentos; también ha sido utilizado como base de medicamentos sencillos para hombres y animales, siendo un producto habitual en la mayoría de los países mediterráneos (Morales *et al.*, 2003; Pujolá *et al.*, 2003). En Francia en el siglo XVI, el vinagre se elaboraba a partir de uvas, tanto para el consumo del hogar como para la exportación. En Inglaterra, el vinagre era hecho de malta y en América no se sabe con certeza desde cuando, aunque se piensa que se utilizó desde muy temprano como un producto del hogar, siendo el jugo de manzana el que se ha utilizado para este fin en los Estados Unidos (Proluxsa, 2008).

La elaboración de vinagre en Chile se realiza a baja escala en comparación con países como España e Italia, aunque actualmente el proceso de producción y elaboración de vinagre ha ido adquiriendo importancia y junto con esto la investigación de los microorganismos responsables del proceso de acetificación (Carrascosa *et al.*, 2005).

El vinagre es esencialmente una solución diluida de ácido acético elaborado a través del proceso fermentativo y subsiguiente acetificación, por lo tanto, el azúcar es la base de la producción de vinagre y cualquier solución diluida de un azúcar fermentable puede transformarse en vinagre en condiciones favorables. Aunque el jugo de manzana es el más utilizado para hacer vinagre, cualquier fruta o vegetal que contenga una proporción adecuada de azúcar u otras sustancias necesarias y deseables, servirá para la elaboración de vinagre (Guzmán, 1998). Sin embargo, para que la acetificación sea óptima, se deben cumplir una serie de requisitos específicos, que incluyen tanto el suministro de oxígeno, la temperatura óptima y las características de la materia prima (Guillamón *et al.*, 2003; Pizarro, 2005), como el contenido de azúcares (Silva, 2006).

Según la comisión del Codex Alimentarius (1985) citado por Llaguno y Polo (1991), se ha coincidido definir vinagre como un líquido, apto para el consumo humano, producido exclusivamente a partir de materias primas de origen agrícola, que contenga almidón y/o azúcares, por un doble proceso, fermentación alcohólica y posterior acetificación.

De acuerdo al decreto N°78 de la ley 18.455 (MINAGRI, 1985), señala que un vinagre para que sea denominado como tal, tiene que tener un contenido de ácido acético mínimo de 40 g/L y un alcohol no superior a 1% v/v. No debe contener sustancias extrañas a la materia prima de origen, no aceptándose que sean adicionados ácidos minerales ni orgánicos, materias tóxicas, ni colorantes de cualquier naturaleza. También señala que tiene que ser obtenido por la acetificación del vino, sin embargo, si un vinagre es obtenido en base a una materia prima distinta de vino, este deberá ir acompañado con el nombre de la materia prima del cual procede.

### **Proceso de Acetificación**

El vinagre es producido por dos procesos bioquímicos distintos, ambos desarrollados por acción de microorganismos. El primer proceso corresponde a la fermentación alcohólica la cual es realizada por levaduras principalmente del género *Saccharomyces*, éstas realizan la conversión de los azúcares fermentables a etanol. El segundo proceso corresponde a la acetificación la cual es realizada por bacterias acéticas, principalmente del género *Acetobacter*, las cuales oxidan el etanol en ácido acético (Tesfaye *et al.*, 2002).

### **Factores que intervienen en la acetificación**

Para el mantenimiento de la población de microorganismos viables, el proceso de acetificación considera numerosos factores. Estos factores pueden ser divididos en factores principales y secundarios. Los factores principales son la disponibilidad de sustrato, oxígeno y temperatura, involucrados en el metabolismo de las bacterias acéticas (BA) y en la actividad enzimática. Dichos factores podrían detener el proceso de acetificación, a menos que ellos sean estrictamente controlados. Dentro de los factores secundarios están el diseño de fermentación y volumen de trabajo. Estos factores incrementan la potencia de la bacteria acética y determinan la tasa de acetificación y el costo de producción del producto final. Sin embargo,

estos factores son interdependientes y podrían gobernar el proceso total de acetificación (Tesfaye *et al.*, 2003). Por lo tanto, la optimización de las condiciones de acetificación se refiere a la adquisición de información sobre la cinética de crecimiento bacteriano y la automatización de los procesos de acetificación. En general, los sistemas de acetificación industrial deben ser capaces de proporcionar grandes volúmenes y operar en condiciones óptimas la acetificación de las bacterias acéticas (Tesfaye *et al.*, 2002).

Por otra parte, es importante señalar que además hay otros factores de la materia prima (vino) que afectan al desarrollo de las BA como: el pH, la concentración de etanol, la concentración de anhídrido sulfuroso ( $\text{SO}_2$ ) (Drysdale y Fleet, 1988). Con respecto al anhídrido sulfuroso, este es el antimicrobiano más utilizado en la producción de vinos y es también activo contra las bacterias acéticas. Cabe destacar que el efecto antimicrobiano del  $\text{SO}_2$  aumenta con valores reducidos de pH. Los niveles de anhídrido sulfuroso necesarios para frenar la actividad bacteriana oscilan entre los 10 y 20 mg/L de  $\text{SO}_2$  libre en el caso de los vinos con pH, menor a 3. Sin embargo, a pesar que estos valores dificultan el desarrollo bacteriano en general, en el caso de las bacterias acéticas tal vez pudiera ser limitante para su proliferación, pero no para su supervivencia, ya que se han encontrado en vinos con pH de 3. Por otra parte, los efectos de distintas concentraciones de  $\text{SO}_2$  sobre la supervivencia y desarrollo de las bacterias acéticas no han sido estudiados con detalle (Carrascosa *et. al.*, 2005).

### **Métodos de elaboración**

Los actuales métodos industriales de elaboración de vinagre se basan esencialmente, en el aumento de la superficie de contacto entre el líquido y el aire. Se puede hacer una diferenciación entre las dos formas de acetificación usualmente empleadas: cultivo superficial o cultivo sumergido (Llaguno y Polo, 1991; Guzmán, 1998; Hidalgo, 2008)

**Acetificación en cultivo superficial (lenta):** Se caracteriza porque las BA se encuentran en la superficie de los acetificadores en contacto directo con el oxígeno gaseoso, situadas en la interfase líquido/gas, como es el caso del método Orleans, o bien fijadas a soportes de materiales tales como virutas y la transferencia de oxígeno se hace por difusión, elaborándose así la mayoría de los vinagres tradicionales. Los vinagres que se obtienen con este proceso son de mejor calidad, debido principalmente al metabolismo, al aporte aromático y sensorial proporcionado por la madera utilizada en la elaboración. También son suficientemente

límpidos y brillantes, y los constituyentes volátiles no experimentan desequilibrios dada la lentitud del proceso (Llaguno y Polo, 1991; Hidalgo, 2008). Este sistema de acetificación constituyó el primer paso hacia la industrialización del proceso de fabricación de vinagre y, en cierto modo, es también precursor de los actuales sistemas de bacterias inmovilizadas. No obstante, a pesar del notable avance tecnológico este sistema presenta una serie de desventajas, tales como la pérdida de sustancias volátiles por evaporación del orden del 10%, el material de soporte, generalmente virutas de madera, se contamina fácilmente y requieren una limpieza periódica, teniendo que reemplazarlo cada año. Además de las desventajas expuestas anteriormente, la lentitud del proceso hace que este sistema esté siendo relegado en beneficio de la acetificación sumergida (Llaguno y Polo, 1991; Guzmán, 1998).

**Acetificación en cultivo sumergido (rápida):** Se caracteriza por la presencia de un cultivo de bacterias libremente sumergidas dentro del acetificador y con un aporte continuo de aire (sólo o enriquecido con oxígeno) en condiciones que permitan la máxima transferencia posible desde la fase gaseosa a la fase líquida. Es decir, en este caso no existe soporte alguno para las bacterias (Llaguno y Polo, 1991; Hidalgo, 2008). Los vinagres elaborados por este sistema son algo turbios, con características químicas y organolépticas de menor aprecio, con respecto al vinagre obtenido de cultivo superficial. Esto se debe a la perturbación originada como consecuencia de la introducción de gran cantidad de aire a presión. Por su parte, con el método sumergido se obtiene un mayor rendimiento y velocidad de acetificación, además de un producto más uniforme en comparación con el método superficial. Los rendimientos obtenidos mediante este sistema de acetificación sumergida son alrededor del 95% en comparación a los del sistema superficial que son solo del 90%. Los avances tecnológicos de la acetificación en cultivo sumergido presenta las siguientes ventajas, la pérdida de sustancias volátiles por evaporación se reduce al 3-5%, se prescinde de material de relleno (virutas), se facilita la incorporación de sistemas automáticos para la carga y descarga del acetificador, se consiguen temperaturas más uniformes, y la limpieza y mantenimiento es más ágil y eficaz (Guzmán, 1998; Llaguno y Polo, 1991; Hidalgo, 2008).

## Bacterias Acéticas

Las bacterias acéticas son Gram-negativas, tienen forma de pequeños bastoncitos, que al ser observadas al microscopio se pueden encontrar agrupadas a menudo en parejas y a veces en pequeñas cadenas. Algunas especies son inmóviles y otras móviles con flagelos polares ó peritricos. También algunas de estas especies están pigmentadas y a veces producen celulosa y polisacáridos (Flanzy, 2000). Son microorganismos aerobios, presentando exclusivamente un metabolismo respiratorio, con el oxígeno como aceptor final de electrones. Sin embargo, pueden sobrevivir en condiciones cercanas a la anaerobiosis, debido a la posibilidad de utilizar quinonas como aceptor final de electrones. La temperatura óptima a la cual se desarrollan es de 25-30° C y el pH óptimo de 5-6, aunque crecen bien en pH inferiores a 4 (Carrascosa *et. al*, 2005; Prieto *et. al*, 2007). Estas bacterias se encuentran sobre sustratos azucarados y/o con presencia de alcohol como: vinos, jugos de frutas, cerveza y vinagre. Sobre éstos llevan a cabo una oxidación incompleta de los azúcares y los alcoholes, produciendo una acumulación de ácidos orgánicos como productos finales. Cuando el sustrato es etanol, se produce ácido acético, de ahí deriva el nombre con el cual se conocen estas bacterias. Sin embargo, estos microorganismos son capaces de oxidar la glucosa a ácido glucónico, la galactosa a ácido galactónico o la arabinosa a ácido arabónico (Guillamon *et al.*, 2003). Debido a estas transformaciones, las bacterias acéticas presentan un gran interés para la industria biotecnológica, ya que además de la conocida producción de vinagre, también se utilizan para la producción de sorbosa y de celulosa (Jara, 2009).

### Taxonomía

Las bacterias acéticas eran divididas en dos géneros hasta hace pocos años: *Acetobacter* y *Gluconobacter*. *Acetobacter* oxida etanol más fuertemente que glucosa y *Gluconobacter* oxida glucosa más fuertemente que etanol. La oxidación de etanol por bacterias acéticas es catalizada por una reacción en dos pasos: la oxidación de etanol a acetaldehído seguida por la oxidación de acetaldehído a ácido acético, en el caso de *Acetobacter* este podía completar la oxidación de acético hasta CO<sub>2</sub> y agua, a diferencia de *Gluconobacter* que eran incapaces de llevar a cabo la oxidación completa del ácido acético (Tesfaye *et al.*, 2002; Guillamon *et al.*, 2003)

La clasificación taxonómica bacteriana ha sufrido grandes cambios en los últimos años debido a la aplicación de nuevas pruebas basadas en técnicas de biología molecular, ha permitido la revisión de la clasificación de las bacterias acéticas, tanto por el reordenamiento de géneros y especies ya existentes, como por la identificación de nuevos géneros y especies (Jara, 2009). Actualmente las bacterias acéticas pertenecen a la familia *Acetobacteraceae* basada en 10 géneros: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neoasaia* y *Granulibacter* (Yamada y Yukphan, 2008). Las especies de estos dos géneros, *Acetobacter* y *Gluconacetobacter*, son las que tradicionalmente se han asociado con la producción de vinagre, en especial las cepas de *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconoacetobacter europaeus* y *Gluconoacetobacter xylinus* (Guillamon *et al.*, 2003).

### **Metabolismo de las bacterias acéticas**

Una característica importante de las bacterias acéticas es la capacidad de oxidar una gran variedad de sustratos, y de poder acumular los productos del metabolismo en el medio sin gran toxicidad para las bacterias. La capacidad de oxidación es debida, en parte, a la gran actividad de las enzimas deshidrogenasas que poseen en la membrana celular (Barja *et al.*, 2003).

La alcohol deshidrogenasa y la aldehído deshidrogenasa pueden oxidar el etanol a acetaldehído, siendo la actividad enzimática óptima a un pH de 5 y de 6,6 respectivamente. Ambas enzimas poseen una afinidad diferente por el oxígeno, lo que implica que una limitación del oxígeno disuelto en el medio provoca la acumulación del acetaldehído en el medio de cultivo. La acumulación de este metabolito intermedio representa una fuente de toxicidad para las bacterias (Barja *et al.*, 2003).

Las bacterias acéticas del género *Acetobacter* oxidan el etanol del medio a ácido acético, y cuando el etanol se ha consumido totalmente, oxidan el acetato. El etanol inhibe las enzimas que oxidan el acetato y a concentraciones elevadas el ácido acético inhibe la oxidación del etanol (Barja *et al.*, 2003).

## Métodos Moleculares de Identificación

La taxonomía microbiana clásica identificaba las especies bacterianas de acuerdo a criterios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos. Sin embargo con el desarrollo de la biología molecular, estas pruebas han quedado prácticamente obsoletas y actualmente los criterios utilizados para la clasificación e identificación bacteriana son genotípicos o moleculares (Jara, 2009).

Hoy en día el interés de los investigadores para la identificación de BA se ha basado en la extracción directa del ácido desoxirribonucleico (DNA) desde el medio (vinagre), ya que se desconocen las condiciones para crecer de todos los microorganismos, lo que limitaría el desarrollo de especies en los medios de cultivo. La mayoría de los taxónomos microbianos han aceptado que las pruebas moleculares, especialmente aquellos métodos basados en el análisis de los ácidos nucleicos, son la opción más fiable para la designación e identificación de especies y para determinar las relaciones entre los diferentes organismos (Guillamón *et al.*, 2003).

En los últimos años se han desarrollado técnicas moleculares rápidas basadas mayoritariamente en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Es importante destacar que estas técnicas dan como resultado agrupamientos de microorganismos que no son concluyentes a nivel taxonómico y que, por lo tanto, el uso de estas técnicas requiere de la comprobación de algunos miembros representativos de cada uno de estos agrupamientos mediante técnicas moleculares, basadas en el análisis del DNA y aplicadas a la taxonomía bacteriana como son: hibridación DNA-DNA, el análisis de restricción o RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) del DNA ribosomal, de la zona intergénica entre los genes 16S y 23S rRNA (ITS o Internally Transcribed Spacer) y análisis de secuencias (Guillamón *et al.*, 2003; Jara, 2009).

**PCR-RFLP 16S rRNA gen.** Esta técnica ha sido utilizada para caracterizar bacterias acéticas en vinos y vinagres, permitiendo identificarlas y diferenciarlas, agrupándolas en base a sus relaciones filogenéticas. Consiste en amplificar el gen ribosomal 16S y después digerir el fragmento amplificado con diferentes enzimas de restricción. La combinación de diferentes enzimas permite la identificación de prácticamente todas las especies de bacterias acéticas. La principal ventaja de esta técnica es que es un método rápido y fiable para la identificación de

bacterias acéticas a nivel de género y especie (Ruiz *et al.*, 2000; González *et al.*, 2006; Prieto *et al.*, 2007, Ilabaca *et al.*, 2008, Jara, 2009).

**PCR-RFLP ITS 16S-23S rRNA gen.** Esta técnica consiste en amplificar la región intergénica (ITS) comprendida entre los genes ribosomales 16S y 23S para posteriormente digerir estos amplificados con diversas endonucleasas de restricción. Aunque las secuencias intergénicas se caracterizan por presentar alta variabilidad y permitir distinguir a nivel de cepa, en algunos estudios realizados con bacterias acéticas, la discriminación se ha limitado a nivel de especie (Ruiz *et al.*, 2000; González *et al.*, 2006; Jara, 2009).

## **Compuestos Fenólicos**

### **Clasificación de compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos se pueden clasificar como no flavonoides y flavonoides. El grupo de los no flavonoides son aquellos compuestos de menor peso molecular, fenoles simples caracterizados por presentar solo un anillo de 6 carbonos, aquí encontramos principalmente los ácidos benzoicos ( $C_6-C_1$ ), los cuales tienen relación con el gusto amargo; y los ácidos cinámicos ( $C_6-C_3$ ), los cuales resultan importantes por su relación con el pardeamiento. En cambio el grupo de los flavonoides se caracteriza por presentar una estructura común de dos anillos de 6 carbonos unidos por un heterociclo central de 3 carbonos ( $C_6-C_3-C_6$ ). Dentro de este grupo están los Flavonoles, los cuales se encuentran siempre en forma glicosidada, aquí encontramos el Kaempferol, Quercitina, Miricetina), estos son responsables de color amarillo en los vinos blancos y son importantes por sus efectos antioxidantes, los cuales son beneficiosos para la salud. También están los Antocianos que son los responsables del color rojo del vino tinto, siendo los principales la Cianidina, Peonidina, Delfinidina, Petunidina y Malvidina. Finalmente, están los Flavanoles (taninos condensados o procianidinas), que son la clase más abundante de flavonoides en uva, vino y vinagre. Éstos presentan como estructura base la (+)-catequina y la (-)-epicatequina. Éstos son responsables del sabor amargo y de la astringencia del vino, pero también de parte de la componente amarilla del color, de la sensación de estructura o cuerpo y de la capacidad de envejecer entendiéndose por ello la capacidad de mantener el color a lo largo del tiempo (Peña-Neira, 1998; Zamora, 2003)



## Compuestos fenólicos en el vino y vinagre

El vinagre como producto final, está influenciado tanto por la materia prima empleada en su elaboración, como por la tecnología involucrada en la misma (Tesfaye *et al.*, 2002). En relación a la materia prima, uno de los importantes elementos son los compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos son encontrados en alimentos como, vegetales, frutas, chocolate, té, café, vino, jugos de uva y vinagre, en diferentes concentraciones. Las uvas muestran una alta concentración y gran variedad de compuestos fenólicos. Así, los mostos son una rica fuente de flavonoides y otros fenoles en la dieta humana incrementando la capacidad antioxidante, disminución de la oxidación de proteínas entre otros beneficios. Por lo dicho anteriormente, los fermentados de productos de uva, vino y vinagre son ricos en fenoles, aunque es más conocido que un consumo moderado de vino tinto entrega efectos beneficiosos, que pueden ser atribuidos a estos contenidos de compuestos fenólicos. También se exhibe el potencial beneficioso para la salud con el consumo de vinagre de vino, debido a que su composición fenólica estará determinada en gran parte por la composición fenólica del vino utilizado en su elaboración (Dávalos *et al.*, 2005).

Los compuestos fenólicos presentes en el vino contribuyen a las características organolépticas como, color, astringencia y amargor. Además presentan interés por sus propiedades antioxidantes (Paixao *et al.*, 2007). Sin embargo, no todos los vegetales, frutas o sus derivados tienen una misma composición fenólica y no todos los fenoles tienen la misma capacidad antioxidante. Por consiguiente es el tipo de polifenol y no la cantidad de polifenoles la que determina la capacidad antioxidante de los alimentos y en consecuencia, condiciona la capacidad antioxidante de un fermento o vinagre (Verzelloni *et al.*, 2007).

La composición fenólica de los vinos está condicionada por la cepa y por otros factores que influyen sobre el desarrollo de las bayas tales como el suelo, la localización geográfica y las condiciones medio ambientales (Paixao *et al.*, 2007). Por lo tanto, la presencia de polifenoles en vinos y vinagres tiene positivos efectos en la salud, debido a que estos productos mantienen o guardan una buena porción de los fenoles presentes en las bayas, expresando una importante capacidad antioxidante. El más abundante grupo de compuestos fenólicos presente en vinos tintos corresponde a los ácidos fenólicos y flavonoides. Sin embargo, el vino blanco contiene más ácidos fenólicos (principalmente ácidos hidroxicinámicos), pero menos flavonoides con respecto al vino tinto (Verzelloni *et al.*, 2007).

Los vinagres de vino pueden exhibir un potencial beneficioso para la salud como antioxidante. Esta capacidad antioxidante está correlacionada con su contenido de polifenoles (Verzelloni *et al.*, 2007). Además, se debe considerar que no todos polifenoles presentan la misma capacidad antioxidante. Algunos estudios señalan que los polifenoles pertenecientes al grupo de los flavanoles son los que presentan una mayor capacidad antioxidante por unidad de polifenoles, es decir, son más eficientes en atrapar radicales libre por cada unidad de polifenoles (Urquiaga, 2002). Se ha descrito que en productos derivados de uva, la actividad antioxidante decrece en el siguiente orden: vino tinto, jugo de uvas y finalmente vinagre de vino (Dávalos *et al.*, 2005). Se ha propuesto que la acetificación del vino podría disminuir el contenido de los fenoles con alta actividad antioxidante y/o podría conducir a nuevos compuestos fenólicos con baja actividad antioxidante a diferencia de los originalmente presentes en el vino (Dávalos *et al.*, 2005).

Los microorganismos responsables de la fermentación alcohólica (levaduras) del mosto, que generan el vino, y la posterior acetificación de éste para convertirlo en vinagre, provocan diversos cambios a la composición química de las materias primas, incluyendo cambios en los compuestos fenólicos (Llaguno y Polo, 1991).

En el caso de las cepas de levaduras, por ejemplo, la implicancia sobre la coloración del vino es doble. Por una parte, influyen en la extracción de antocianos durante el proceso fermentativo ya que éstas transforman el medio acuoso a alcohólico durante la fermentación, lo cual permite una mayor solubilidad y extracción de antocianos presentes y por otro, lado, pueden promover la degradación de antocianinas y participar en interacciones con pigmentos que resultan en pérdidas de color. También estos microorganismos influyen sobre la composición fenólica del vino y por ende en su estabilidad y propiedades antioxidantes (Monagas *et al.*, 2007). Por lo tanto, la acción de las levaduras durante la fermentación alcohólica y el proceso de envejecimiento tiene repercusiones en el proceso de elaboración del vinagre, ya que éstas pueden afectar el perfil cromático y contenido de fenoles del vino base utilizado posteriormente para la elaboración de vinagre (Bautista-Ortín *et al.*, 2007).

Por otra parte, es importante señalar que los efectos que tienen los compuestos fenólicos sobre los microorganismos aún no son claros del todo. Mientras algunos estimulan el crecimiento y actividad de las bacterias, otros tienen efectos inhibitorios. Es así que algunos ácidos fenólicos

tienen una influencia negativa sobre el crecimiento y supervivencia de bacterias lácticas, disminuyendo su tasa de crecimiento y la concentración final. Por otra parte, los taninos influyen sobre la fisiología de la célula generando una progresiva inactivación, siendo los efectos de inactivación mayores con el aumento del promedio de tamaño de taninos (Figueiredo *et al.*, 2007).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, existen algunos compuestos fenólicos pertenecientes al grupo de los flavanoles, como las procianidinas, que son conocidas por inhibir el crecimiento de microorganismos al presentar efectos tóxicos para ellos. También han demostrado tener una particular resistencia a la degradación por parte de los microorganismos. Sin embargo, hay evidencias de que algunos microorganismos, principalmente bacterias, pueden tolerar las procianidinas e incluso son capaces de degradarlas por medio de modificaciones enzimáticas (Contreras – Domínguez *et al.*, 2006).

## BIBLIOGRAFIA CITADA

BAUTISTA-ORTÍN, A. B.; ROMERO-CASCALES, I.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J. I.; LÓPEZ-ROCA J. M.; GÓMEZ-PLAZA, E. 2007. Influence of the yeast strain on monastrell wine colour. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8: 322-328.

BARJA, F.; MESA, M.; MACÍAS, M.; BERMUDEZ, I.; CANTERO, D.; LOPEZ, J. 2003. Aspectos bioquímicos, moleculares y morfológicos de las bacterias acéticas. Pp 17-20. *In: Mas, A. (Ed.). Primeras Jornadas de I + d + i en la Elaboración de Vinagres de Vino. Tarragona, España, Octubre 2003. Edició de la Facultat d'Enologia de Tarragona. España. 92p.*

CARRASCOSA, A.; MUÑOZ, R.; GONZÁLEZ, R. 2005. *Microbiología del vino*. Ediciones A. Madrid Vicente, España. 398p.

CODEX ALEMENTARIUS MUNDI. 1985. Decisión de la 16ª sesión de la comisión del Codex Alimentarius, Ginebra.

CONTRERAS-DOMÍNGUEZ, M.; GUYOT, S.; MARNET, N.; PETIT, J.; PERRAUD-GAIME, I.; ROUSSOS, S.; AUGUR, C. 2006. Degradation of procyanidins by *Aspergillus fumigatus*: Identification of a novel aromatic ring cleavage product. *Biochimie* 88: 844-848.

DÁVALOS, A.; BARTOLOME, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. 2005. Antioxidant properties of comercial grape juices and vinegars. *Food Chemistry*, 93: 325-330.

DRYSDALE, G.S.; FLEET, G.H. 1988. Acetic acid bacteria in Winemaking: A Review. *American Journal of Enology and Vitiviniculture* 39: 143-154.

FIGUEIREDO, A. R.; CAMPOS, F.; FREITAS, V.; HOGG, T.; COUTO, J.A. 2008. Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Food Microbiology*, 25: 105-112

FLANZY, C. 2000. "Enología". Fundamentos científicos y tecnológicos. Ed. Mundi Prensa. Madrid, España. 783p.

GONZÁLEZ, A.; GUILLAMÓN, J. M.; MAS, A.; POBLET, M. 2006. Application of molecular methods for routine identification of acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 108: 141-146.

GUILLAMÓN, J.M.; GONZÁLEZ, A.; HIERRO, N.; ROZÉS, N.; MAS, A.; POBLET, M. 2003. Técnicas de identificación de bacterias acéticas. p 9-15, *In: Mas, A. (Ed.). Primeras Jornadas de I + d + i en la Elaboración de Vinagres de Vino. Tarragona, España, Octubre 2003. Edició de la Facultat d'Enologia de Tarragona. España. 92p.*

GUZMAN, M. 1998. Vinagre: Características, atributos y control de calidad. Editorial Díaz de santos, S.A., Madrid, España. 133p.

HIDALGO, C. 2008. Estudio Comparativo de la imposición de una cepa inoculada de *Acetobacter pasteurianus* para la elaboración de vinagre de vino por método superficial y sumergido. Trabajo de investigación para el Master en Enología. Universitat Rovira i Virgili. Departament de Bioquímica i Biotecnologia. Facultat d'Enologia. España. 26p.

ILABACA, C.; NAVARRETE, P.; MARDONES, P.; ROMERO, J.; MAS, A. 2008. Application of culture culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. *International Journal of Food Microbiology* 126: 245-249.

JARA, C. 2009. Desarrollo de métodos de biología molecular para el análisis directo de bacterias acéticas e vinagre. Tesis Doctoral. Universitat Rovira i Virgili. Departament de Bioquímica i Biotecnologia. Facultat d'Enologia. España. 185p.

LLAGUNO, C. y POLO, MC. 1991. El vinagre de vino. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España. 238p.

MINAGRI, CHILE 1985 Ley N° 18.455, Fija normas sobre producción, elaboración, y comercialización de alcoholes etílicos, bebidas alcohólicas y vinagres. Diario oficial de la

República de Chile N° 32.318. Disponible en: <http://www.sag.cl/common/asp/pagAtachadorVisualizador.asp?argCryptedData=GP1TkTXdhRJAS2Wp3v88hBm9NI6W3Ajkl9EkwRPIU%3D&argModo=&argOrigen=BD&argFlagYaGrabados=&argArchivoId=27755>. Leído el 11 de Noviembre de 2011.

MONAGAS, M.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOME, B. 2007. Evaluation of different *Saccharomyces cerevisiae* strain for red winemaking. Influence on the anthocyanin, pyranoanthocyanin and non-anthocyanin phenolic content and color characteristics of wines. *Food Chemistry*, 104: 814-823.

MORALES, M.; BENITEZ, B.; TRONCOSO, A. 2003. El vinagre de vino: Análisis de sus compuestos volátiles y su evolución durante la acetificación y el envejecimiento. Pp 31-38, *In: Mas, A. (Ed.). Primeras Jornadas de I + d + i en la Elaboración de Vinagres de Vino. Tarragona, España, Octubre 2003. Edición de la Facultat d'Enologia de Tarragona. España. 92p.*

PAIXAO, N.; PERESTRELO, R.; MARQUES, J.C.; CAMARA, S. 2007. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry*, 105: 204-214.

PEÑA, 1998. Contribución al conocimiento del origen de problemas sensoriales en vinos. Su relación con los compuestos fenólicos y la presencia de compuestos organoclorados. Tesis Dr. Ingeniero Agrónomo Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España. 345p.

PIZARRO, A. 2005. Obtención de Condiciones de Elaboración de Vinagre de Arándanos (*Vaccinium corybosum*) Utilizando Torta de Prensa. Tesis Ingeniero Alimentos. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia, Chile. 81p.

PRIETO, C.; JARA, C.; MAS, A.; ROMERO, J. 2007. Application of molecular methods for analysing the distribution and diversity of acetic bacteria in Chilean vineyards. *Food Microbiology*, 115: 348-345.

PUJOLÁ, M.; CARBÓ, R.; SANTOS, D.; SÁNCHEZ, S.; DE CASTRO, J. 2003. Estudio de la calidad de los vinagres vínicos comerciales. Pp 45-52, *In*: Mas, A. (Ed.). Primeras Jornadas de I + d + i en la Elaboración de Vinagres de Vino. Tarragona, España, Octubre 2003. Edició de la Facultat d'Enologia de Tarragona. España. 92p.

PROLUXSA, 2008. EL VINAGRE: ORIGEN Y USOS. [www.proluxsa.com/spanish/elvinagre.html#EL%20VINAGRE%20-%20ORIGEN](http://www.proluxsa.com/spanish/elvinagre.html#EL%20VINAGRE%20-%20ORIGEN). Leído en enero 2008.

RUIZ, A.; POBLETE, M.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J.M.2000. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1981-1987.

SILVA, P. 2006. Elaboración de Vinagre tipo Balsámico utilizando ecotipos de Tunas (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill) de colores. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 36p.

URQUIAGA, I. 2002. Polifenoles del vino. *Medwave* 2002 Nov;2(10) doi: 10.5867/medwave.2002.10.3321.

TESTAFAYE, W.; MORALES, M.L.; GARCIA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. 2002. Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science and Technology*, 13: 12-21.

TESTAFAYE, W.; MORALES, M.L.; GARCIA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. 2003. Optimising wine vinegar production: fermentation and ageing. *Applied Biotechnology, Food Science and Policy*, 1(2).

VERZELLONI, E.; TAGLIAZUCCI, D.; CONTE, A. 2007. Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonid content in traditional balsamic vinegar. *Food Chemistry*. 105: 564-571.

YAMADA, Y.; YUKPHAN, P. 2008. Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125: 15-24.

ZAMORA, F. 2003. Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 225p.



## **CAPÍTULO II**

### **EFECTO DE UNA CEPA DE BACTERIA ACÉTICA NATIVA SOBRE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE VINAGRES OBTENIDOS A PARTIR DE VINO BLANCO Y TINTO**

## RESUMEN

En la elaboración de vinagre, la utilización de nuevas materias primas y la búsqueda de nuevas alternativas para su consumo, hace que la elaboración de vinagres presente un gran interés por parte de la industria alimentaria. Con esto, el estudio de las bacterias acéticas juegan un rol fundamental en la acetificación ya que pueden aportar un carácter particular al producto final. A través de técnicas moleculares, desarrolladas recientemente, se pueden identificar y trazar estos microorganismos durante el proceso de acetificación, presentando un potencial biotecnológico de interés industrial.

El principal objetivo planteado en esta investigación, fue determinar la capacidad de una bacteria acética, *Acetobacter cerevisiae* 209, para modificar el perfil fenólico durante el proceso de acetificación a un vino blanco y un vino tinto.

La identificación de la bacteria acética utilizada en este estudio se realizó mediante dos técnicas moleculares, PCR-RFLP 16S rRNA y PCR-RFLP ITS 16S-23S rRNA. Una vez identificada, se evaluó el crecimiento bacteriano a distintas concentraciones de etanol y de anhídrido sulfuroso y se estudió la modificación de los compuestos fenólicos en el vino blanco y el vino tinto durante la acetificación.

*Acetobacter cerevisiae* presentó crecimiento a 10%v/v en etanol y a concentraciones de anhídrido sulfuroso inferiores a 25ppm. Para determinar la modificación de los compuestos fenólicos se utilizaron muestras de vino blanco, vinagre de vino blanco, vino tinto y vinagre de vino tinto. Los fenoles totales, taninos totales y antocianos totales (sólo en vino y vinagre tintos) disminuyeron de manera significativa durante el proceso de acetificación. En relación a los fenoles de bajo peso molecular, disminuyeron los ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos) y los flavanoles, provocando una disminución en la capacidad antioxidante en los vinagres obtenidos. Por ende, es posible que dichas modificaciones estén asociadas a enzimas que están presentes en nuestra cepa en estudio.

**Palabras Claves:** *Acetobacter cerevisiae*, PCR, acetificación, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante.

## ABSTRACT

In the production of vinegar, the use of new raw materials and research for its alternative consumption makes vinegars preparation a great interest from the food industry. Regarding this, the acetic bacteria study plays a fundamental role on the acetification, due to them can provide a particular character to the final product, and through recently developed molecular techniques, can be identified and trace in the acetification process, introducing a potential biotechnological of industrial interest.

The main objective proposed in this research, was to determine the ability of an acetic bacteria, *Acetobacter cerevisiae* 209, to modify the phenolic profile during acetification process to a white wine and red wine.

Identifying acetic bacteria used in this study was performed by means of two molecular techniques, PCR-RFLP 16S rRNA and PCR-RFLP ITS 16S-23S rRNA. Once identified them, bacterial growth was evaluated at different concentrations of ethanol and sulphurous anhydride, and it was studied the modification of phenolic compounds during acetification in white wine and red wine.

*Acetobacter cerevisiae* showed growth to 10% v/ v of ethanol and sulphurous anhydride concentrations below 25ppm. To determine the phenolic compounds modification it had used samples of white wine, white wine vinegar, red wine and red wine vinegar. Total phenols, total tannins and total anthocyanins (only in red wine and red vinegar) decreased significantly during the acetification process. In relation to the low molecular weight phenols, phenolic acids (hydroxybenzoic) and flavanols decreased, causing a reduction in the antioxidant capacity of vinegars obtained. Therefore, it is possible that such changes are associated with enzymes that are present in our stock under study.

**Keywords:** *Acetobacter cerevisiae*, PCR, acetification, phenolic compounds, antioxidant capacity.

## INTRODUCCION

El vinagre tradicionalmente se ha utilizado como conservador de alimentos, resaltador de sabores y aromas. También ha sido utilizado como base de medicamentos sencillos, siendo un producto habitual en la mayoría de los países mediterráneos (Morales *et al.*, 2003). Hoy en día existe una gran variedad de materias primas de origen agrícola que se emplean para la obtención de vinagres, encontrándose una gran oferta en el mercado (Pujolá *et al.*, 2003). Silva, (2006) señala que la producción nacional está orientada a la elaboración de vinagres de baja calidad en comparación con vinagres balsámicos.

El vinagre se puede definir brevemente como la oxidación bioquímica del etanol a ácido acético, esta reacción es realizada por bacterias acéticas (LLaguno y Polo, 1991; Barja *et al.*, 2003). Por lo tanto, el vinagre es esencialmente una solución diluida de ácido acético elaborado a través del proceso fermentativo y subsiguiente acetificación. Actualmente, se conocen muchas características de la biología de las bacterias acéticas, entre las cuales se puede destacar que son Gram-negativas, de forma elipsoidal o cilíndrica, se pueden encontrar a menudo en parejas o formando pequeñas cadenas, algunas son inmóviles y otras móviles con flagelos polares ó peritricos. Son aerobias, presentando exclusivamente un metabolismo respiratorio con el oxígeno como aceptor final de electrones, otorgándole un metabolismo estrictamente aerobio, además son catalasa positivas y oxidasa negativas (Guillamón *et al.*, 2003). Referente a sus condiciones de desarrollo, la temperatura óptima a la cual se desarrollan es de 25-30° C y el pH óptimo de 5-6, aunque crecen bien en pH inferiores a 4 (Carrascosa *et. al.*, 2005; Prieto *et. al.*, 2007).

Los principales factores que intervienen en el desarrollo de las bacterias acéticas son la temperatura, el pH, la concentración de etanol, la concentración de SO<sub>2</sub> y fundamentalmente la concentración de oxígeno disuelto en el medio (Drysdale y Fleet, 1988).

Hasta hace pocos años las bacterias acéticas eran divididas en dos géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*. La oxidación de etanol por bacterias acéticas es catalizada por una reacción en dos pasos: la oxidación de etanol a acetaldehído seguida por la oxidación de acetaldehído a ácido acético, en el caso de *Acetobacter* este podía completar la oxidación de acético hasta

CO<sub>2</sub> y agua, a diferencia de *Gluconobacter* que eran incapaces de llevar a cabo la oxidación completa del ácido acético (Tesfaye *et al.*, 2002; Guillamón *et al.*, 2003).

La clasificación taxonómica bacteriana ha sufrido grandes cambios debido a la aplicación de nuevas técnicas de biología molecular. Actualmente las bacterias acéticas pertenecen a la familia *Acetobacteraceae* basada en 10 géneros: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neoasaia* y *Granulibacter* (Yamada y Yukphan, 2008). Las especies de estos dos géneros, *Acetobacter* y *Gluconacetobacter*, son las que tradicionalmente se han asociado con la producción de vinagre, en especial las cepas de *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconoacetobacter europaeus* y *Gluconoacetobacter xylinus* (Guillamón *et al.*, 2003). Estas especies son de suma importancia, sin embargo, existen pocos estudios enfocados a conocer el comportamiento y la diversidad poblacional de las bacterias acéticas del vinagre (Quintero, 2010). Actualmente los cultivos de bacterias utilizados en la elaboración de vinagre son mixtos, ya que la identificación de las bacterias acéticas se ha hecho a través de pruebas fisiológicas y bioquímicas, lo que ha impedido una buena selección (Vegas, 2007).

Dentro del género *Acetobacter* se encuentra *Acetobacter cerevisiae* que es una especie relativamente nueva, descrita y caracterizada genotípicamente (Cleenwerck *et al.*, 2002; Prieto *et al.*, 2007).

Recientemente, se han descrito técnicas moleculares para la caracterización de las bacterias acéticas, las cuales han provocado grandes avances en la investigación de estas bacterias. Estas técnicas moleculares son rápidas, fiables y de fácil manejo para su identificación; uno de los métodos más utilizados consiste en el análisis de marcadores moleculares, siendo el más común el análisis de restricción del gen ribosomal 16S, previamente amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Un segundo método de identificación es el análisis de la zona comprendida entre los genes ribosomales 16S y 23S. Esta zona intergénica se conoce como ITS (Internal Transcribed Spacer) y posee un mayor grado de polimorfismo entre las cepas estudiadas (Ruiz *et al.*, 2000).

En la naturaleza hay una gran cantidad de bacterias acéticas que aun no han sido aisladas ni caracterizadas, debido a que son difíciles de cultivar. Estas bacterias presentan un potencial biotecnológico en la elaboración de vinagres, ya sea por su comportamiento dentro del proceso como por la modificación que pueden realizar a los compuestos de la materia prima. Es por esto, que se hace necesario su selección en base a técnicas moleculares, que son más precisas

que las técnicas tradicionales y permiten conocer la trazabilidad de un microorganismo durante la elaboración de vinagres.

Por todo lo expuesto anteriormente es importante saber si *Acetobacter cerevisiae* es capaz de desarrollar el proceso de acetificación, así como también de modificar los compuestos de la materia prima. Por lo tanto en esta investigación se evaluó la resistencia a etanol, SO<sub>2</sub> y la modificación de los compuestos fenólicos de la materia prima.

El etanol es la materia prima en la elaboración de vinagre, por lo tanto, es el principal sustrato de *Acetobacter cerevisiae* en la producción de ácido acético. Altas concentraciones de etanol y de SO<sub>2</sub> afectan la tasa de crecimiento ya que son inhibidores microbiológicos. Las bacterias acéticas que puedan sobrevivir en aquellas condiciones, presentan adaptaciones particulares que le permiten estar metabólicamente activas (Sokollek *et al.*, 1998). Por lo tanto es imprescindible evaluar que concentraciones de etanol y de SO<sub>2</sub> es capaz de tolerar nuestra cepa en estudio.

Por otra parte, los compuestos fenólicos están presentes en variados alimentos como, vegetales, frutas, chocolate, té, café, vino, jugos de uva y vinagre, en diferentes concentraciones. Estos compuestos fenólicos se clasifican como no flavonoides y flavonoides. Los no flavonoides se caracterizan por presentar un anillo de 6 carbonos, aquí encontramos los ácidos benzoicos (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>), los cuales tienen relación con el gusto amargo y los ácidos cinámicos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), los cuales tienen relación con el pardeamiento en vinos. En cambio los flavonoides presentan una estructura de dos anillos de 6 carbonos unidos por un heterociclo central de 3 carbonos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>). Dentro de este grupo están los Flavonoles, los cuales se encuentran siempre en forma glicosidada, estos son responsables de color amarillo en los vinos blancos y son importantes por sus efectos antioxidantes, los cuales son beneficiosos para la salud. También están los Antocianos que son los responsables del color rojo del vino tinto, siendo los principales la Cianidina, Peonidina, Delfinidina, Petunidina y Malvidina. Finalmente, están los Flavanoles (taninos condensados o procianidinas), que son la clase más abundante de flavonoides en uva, vino y vinagre. Estos presentan como estructura base la (+)-catequina y la (-)-epicatequina. Estos son responsables del sabor amargo y de la astringencia del vino, pero también de parte de la componente amarilla del color, de la sensación de estructura o cuerpo (Peña-Neira, 1998; Zamora, 2003).

Los vinos exhiben una alta concentración y variedad de compuestos fenólicos. Por lo tanto, productos derivados como el vinagre guardan una buena porción de los fenoles presentes en la

materia prima; por ende el vinagre presenta importantes concentraciones de polifenoles a pesar del proceso de acetificación (Davalos *et al.*, 2005; Carbo *et al.*, 2006). Estos polifenoles como se dijo anteriormente contribuyen a las características organolépticas como color, astringencia y amargor, además de presentar propiedades antioxidantes (Paixao *et al.*, 2007). Sin embargo la capacidad antioxidante de estos polifenoles dependerá del tipo de polifenol que encontremos y su concentración en el vino y posteriormente en el vinagre (Verzelloni *et al.*, 2007). Algunos estudios señalan que los polifenoles pertenecientes al grupo de los flavanoles son los que presentan una mayor capacidad antioxidante (Urquiaga, 2002). Por lo tanto una ingesta de alimentos ricos en sustancias antioxidantes previene o disminuye el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, el daño oxidativo del ADN y el cáncer, por lo que es una propiedad importante de los vinagres y que lo convierte en un alimento funcional, permitiendo aportar un componente saludable a la dieta el consumo de este (Gerster, 1995; Jampol y Ferris, 2001).

Actualmente, la composición fenólica de los vinagres se ha estudiado estableciendo comparaciones en base al método de elaboración y procedencia de los vinagres (Galvez *et al.*, 1994; García-Parilla *et al.*, 1997). Sin embargo no se ha considerado que el componente bacteriano tendría la capacidad de modificar el perfil fenólico de los vinagres. Por lo dicho anteriormente, es importante destacar que los efectos que tienen las bacterias acéticas sobre la modificación de compuestos fenólicos durante el proceso de acetificación aún no son del todo claros, y más aún no se han encontrado estudios que muestren la influencia de una cepa de bacteria acética sobre la modificación fenólica durante el proceso de elaboración de vinagre. Por lo tanto, es importante estudiar cómo *Acetobacter cerevisiae* es capaz de modificar bioquímicamente los compuestos fenólicos presentes en el vino durante el proceso de acetificación.

## **Hipótesis**

Se postula que la bacteria acética nativa *Acetobacter cerevisiae 209* es capaz de imponerse en una acetificación experimental y en este proceso disminuye la concentración de compuestos fenólicos, principalmente la concentración de flavanoles presentes en el vino

## **Objetivo general**

Determinar la capacidad de *Acetobacter cerevisiae 209* para modificar el perfil fenólico en diferentes matrices de vino.

## **Objetivos específicos**

Determinar las condiciones de anhídrido sulfuroso libre (SO<sub>2</sub>) y etanol que permitan la imposición y acetificación de *Acetobacter cerevisiae 209* en la elaboración de vinagres de vino.

Determinar la presencia de *Acetobacter cerevisiae 209* durante el proceso de acetificación.

Determinar la disminución de compuestos fenólicos y características químicas del vinagre.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Lugar de estudio**

La elaboración del vinagre se realizó en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), perteneciente a la Universidad de Chile. Los análisis químicos y microbiológicos se realizaron en los laboratorios del INTA y laboratorios de Química Enológica, Cromatografía y Microbiología del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

### **Materia Prima**

Para la elaboración del vinagre, se empleó como materia prima vino blanco y tinto de los cultivares Chardonnay y Carménère, respectivamente, ambos de la temporada 2010, de viñedos y bodegas pertenecientes a Viñedos Emiliana ubicados en el valle de Colchagua.

### **Microorganismo iniciador de la acetificación**

Se utilizó una cepa nativa de Chile, *Acetobacter cerevisiae* 209, perteneciente al Laboratorio de Microbiología del Departamento de Agroindustria y Enología de la facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

## Metodología

### Caracterización fenotípica de *Acetobacter cerevisiae*

Previo a la elaboración de vinagre se realizó una caracterización fenotípica, asociada a las propiedades tecnológicas, de la bacteria acética, *Acetobacter cerevisiae 209*, determinando su capacidad de acetificación a distintas concentraciones de etanol (0, 6, 8 10% v/v), para esto se realizaron curvas de crecimiento a distintas concentraciones de etanol. También se evaluó resistencia de *Acetobacter cerevisiae 209* a distintas concentraciones de anhídrido sulfuroso libre (5-10-15-20 ppm).

### Resistencia a Etanol

**Medios y condiciones de cultivo:** Para realizar dicha caracterización se cultivó *Acetobacter cerevisiae 209* en un medio líquido GY (5% D-glucosa, 1% extracto de levadura), donde se incubó por 2 a 4 días a 28°C, en condiciones aeróbicas. La cuantificación bacteriana se realizó diariamente mediante microscopia, con cámara de Petroff-Hausser, hasta llegar a una concentración de  $1 \times 10^{10}$  células/mL.

Posteriormente para la elaboración de curvas de crecimiento se utilizó un vino sintético (Medio V50) descrito por Quintero *et al.*, 2009, que presenta la siguiente composición:

Etanol	0-6-8-10%
Extracto de levadura	0,4 %
Glicerol	0,2 %
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,05 %
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,05 %
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O.	0,02 %
CaCl <sub>2</sub>	0,01 %
Acetato de Sodio	0,1 %
Ácido Tartárico	0.2 %

Una vez elaborado este vino sintético a distintas concentraciones de etanol (0-6-8-10% v/v) en tubos de ensayo, se inoculó *Acetobacter cerevisiae 209*, e incubó a 28°C. El ensayo fue

realizado por triplicado y el crecimiento bacteriano fue medido mediante espectofotometría a DO 620 nm, para seguir el crecimiento de la población.

### **Resistencia a anhídrido sulfuroso**

**Medios y condiciones de cultivo:** Se cultivó *Acetobacter cerevisiae* 209 en un medio líquido GY (5% D-glucosa, 1% extracto de levadura), donde se incubó por no más de 48 horas a 28°C. La cuantificación bacteriana, al igual que la anterior, se realizó mediante microscopía con cámara de Petroff-Hausser. Se obtuvo una concentración de  $2,4 \times 10^9$  células/mL. Para realizar el ensayo, se tomó 1 ml de este cultivo y se ambientó con vino sintético (composición descrita anteriormente).

Posteriormente, el volumen final del ensayo fue de 50 mL, para lo cual se utilizaron tubos falcón de 50 mL, se alicuotó con vino sintético, considerando el volumen de bacterias que se aplicaron (obteniendo una concentración final de  $10^6$  células/mL). Luego, se aplicaron dosis de metabisulfito de potasio al 5%, para obtener las distintas concentraciones de anhídrido sulfuroso libre (5-10-15-20 ppm).

Una vez sulfitado, se dejaron los tubos falcón por 20 minutos, antes de realizar el recuento de bacterias por microgota, en medio de cultivo sólido GYC. Una vez aplicadas las microgotas (con un volumen de 10uL) en el medio de cultivo sólido, se incubaron las placas a 28°C durante 24 a 48 horas. Posteriormente, se realizó el recuento directo de colonias (UFC)/mL.

### **Caracterización genética de *Acetobacter cerevisiae***

Con el fin de corroborar la identidad, y tener la certeza que el cultivo iniciador del proceso de acetificación corresponde al género y especie *Acetobacter cerevisiae*, se caracterizó genéticamente la cepa *Acetobacter cerevisiae* 209 a través de pruebas moleculares (RFLP del gen 16S rRNA y RFLP ITS 16S-23S rRNA). También se caracterizó genéticamente el vinagre terminado, para asegurar que fue *Acetobacter cerevisiae* 209 quien realizó el proceso de acetificación.

**Extracción de DNA.** Se preparó el cultivo iniciador de la acetificación (*Acetobacter cerevisiae* 209) en medio GY (5%D-glucosa, 1% Extracto de levadura), por 2 a 4 días a 28°C en agitación en condiciones aeróbicas. Luego de esto, con el fin de obtener un pellet

bacteriano, el cultivo fue centrifugado a 10.000 g por 2 minutos y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente para la extracción de DNA se siguió el protocolo del Kit comercial Wizard genomic DNA purification kit (Promega).

Una vez finalizado el proceso de acetificación, la extracción de DNA del vinagre se realizó mediante una extracción directa, incubando las muestras por 30 minutos con enzima lisozima a 0,7 mg/mL y proteinasa K a 0,1 mg/mL. Para la extracción de DNA, se utilizó el kit comercial PowerSoil™ DNA Isolation kit (MoBio), siguiendo protocolo del fabricante.

En ambos casos, la concentración de DNA se estimó a través de un gel de agarosa al 1%, el cual se colocó en una solución de TBE 1X, con un marcador de peso molecular conocido ladder de 100pb y se corrió el gel por 45 minutos a 100 volts. Luego el gel fue teñido con bromuro de etidio y posteriormente se fotografió.

**Condiciones de PCR.** Una vez extraído el DNA, se realizó la amplificación del gen ribosomal 16S rRNA con los partidores 27F y 1492R. Las condiciones de amplificación fueron las descritas por Romero *et al.*, (2002). Para amplificar la zona intergénica 16S-23S rRNA (ITS 16S-23S rRNA) se realizó con los partidores ITS1 forwards e ITS2 reverse y las condiciones de amplificación fueron las descritas por Ruiz *et al.*, (2000).

**Análisis de Restricción.** Para realizar el análisis de restricción (RFLP) del gen 16S rRNA, se digirió con enzima *TaqI* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2 µL de cada DNA amplificado, luego se agregó proteinasa K a 0,1 mg/mL y se incubó a 37°C por 1 hora (Romero *et al.*, 2002). Esta digestión fue analizada por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% en TBE 1x. Se utilizó marcador de peso molecular conocido, ladder de 100pb (Invitrogen), separado a 200 volts por 20 min. Luego, el gel fue revelado con bromuro de etidio y posteriormente fotografiado (Romero *et al.*, 2002).

Para el análisis de restricción de la zona intergénica entre los genes 16S y 23S rRNA (ITS 16S-23S rRNA), 2 µL de cada amplificado fueron digeridos con la enzima *AluI* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), luego se agregó proteinasa K a 0,1 mg/mL y se incubó a 37°C, por 1 hora (Romero *et al.*, 2002). El resultado fue analizado por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% en TBE 1x, con un marcador de peso molecular conocido ladder 100 pares de base (pb), invitrogen, separados a 150 volts por 45 min. Luego, el gel fue teñido con bromuro de etidio y posteriormente fotografiado (Romero *et al.*, 2002).

### **Proceso de Acetificación**

La elaboración del vinagre se realizó por el proceso de acetificación superficial (Llaguno y Polo, 1991). Este vinagre se realizó en un recipiente plástico de 4 litros de capacidad, tapado con papel alusa plast para evitar contaminación con partículas extrañas y disminuir las pérdidas de etanol y ácido acético. Éstos se mantuvieron en un recinto temperado entre 25-30°C, por 4 semanas. El vinagre se elaboró mezclando vino, agua e inóculo en una relación 2:1:1% v/v, respectivamente, obteniendo un volumen final de 2 litros. También se fue agregando semanalmente 500 ml de vino, para mantener el volumen final de 2 litros. El proceso de acetificación terminó cuando el vinagre llegó a una concentración igual o superior a 40 g/L de ácido acético.

## Análisis físicos y químicos

Se realizaron los siguientes análisis físico-químicos al vino y posteriormente al vinagre, con el fin de caracterizar a *Acetobacter cerevisiae* 209 por medio de la modificación de los compuestos fenólicos en el proceso de acetificación. Los análisis que se hicieron corresponden a los indicados en el Cuadro 1.

Cuadro1. Análisis físicos químicos y muestras a analizar

Análisis	Método	Vino Blanco	Vinagre Blanco	Vino Tinto	Vinagre Tinto
pH*	Potenciómetro	X	X	X	X
Acidez volátil (g/L ác. Acético)*	Blarez	X	X	X	X
Grado Alcohólico (°GL)*	Densimétrico	X	X	X	X
Anhídrido sulfuroso libre y total (mg/L SO <sub>2</sub> )*	Ripper	X	X	X	X
Fenoles totales (mg/L), expresado como ác. Gálico *	Espectofotometría, DO 280 nm	X	X	X	X
Taninos totales (g/L), expresado como(+)-catequina*	Espectofotometría, DO 550 nm	X	X	X	X
Antocianos totales (mg/L), expresado como malvidina-3-glucósido*	Espectofotometría, DO 520 nm	-	-	X	X
Intensidad colorante*	Espectofotometría, DO 420 nm+520+620	X	X	X	X
Matiz*	Espectofotometría, DO 420 nm/520	-	-	X	X
Perfil antocianídico (mg/L)**	HPLC	-	-	X	X
Polifenoles de bajo peso molecular (mg/L)**	HPLC	X	X	X	X
Capacidad antioxidante uMET/g***	ORAC	X	X	X	X

Intensidad colorante en vino y vinagre blanco se medira solo a 420nm

\* Bordeau y Scarpa, 1998

\*\*Hernández-Orte *et al.*, 2006

\*\*\*Huang *et al.*, 2002

### **Diseño experimental y análisis estadístico de los datos**

En esta investigación se utilizó un diseño experimental con 2 ensayos en paralelo. Un ensayo para vino blanco y otro para vino tinto, independientes entre sí. En los cuales se comparó un testigo (vino) contra un tratamiento (Cepa *Acetobacter cerevisiae* 209), ambos con 3 repeticiones cada uno. La unidad experimental fue de 2 litros

Las variables que se analizaron estadísticamente fueron: fenoles totales, taninos totales, antocianos totales, intensidad colorante, matiz, perfil antocianídico, polifenoles de bajo peso molecular, y capacidad antioxidante.

Los resultados de esta investigación fueron sometidos al análisis estadístico de *t*-Student, con un nivel de confianza del 95%. Para este análisis se utilizó el programa estadístico InfoStat.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Condiciones de etanol y anhídrido sulfuroso libre que permitan la imposición de *Acetobacter cerevisiae* 209 en la elaboración de vinagres

#### Crecimiento de *Acetobacter cerevisiae* 209 a distintas concentraciones de etanol

El etanol es el sustrato primordial para la producción de ácido acético en la elaboración de vinagre. Este metabolito afecta directamente la membrana plasmática de las bacterias acéticas inhibiendo su crecimiento celular (Madigan *et al.*, 2003). Por lo tanto, la tasa de crecimiento de *Acetobacter cerevisiae* dependerá directamente de la concentración de etanol (Sokollek *et al.*, 1998; Altieri *et al.*, 2007). Por este motivo Llaguno y Polo (1991), han considerado que los vinos utilizados en el proceso de acetificación deben de ser de baja graduación alcohólica.

En la actualidad, las técnicas de fermentación permiten utilizar vinos con graduación alcohólica de 10-12% v/v (Llaguno y Polo, 1991). De acuerdo a lo planteado anteriormente, es necesario seleccionar la mayor concentración de etanol posible que permita el crecimiento de *Acetobacter cerevisiae*, ya que éste es la materia prima en la elaboración del vinagre. Alternativamente, se busca seleccionar o contar con bacterias acéticas capaces de tolerar y crecer en altas concentraciones de etanol, debido a que las mayores pérdidas de etanol durante el proceso de acetificación se producen por evaporación.

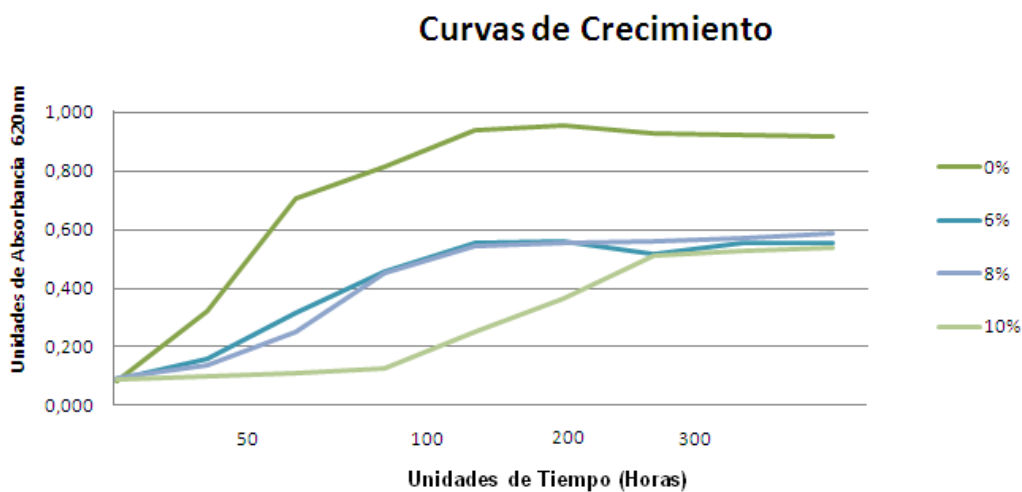
Para analizar la tolerancia al etanol de *Acetobacter cerevisiae* 209, se inoculó la cepa en diferentes concentraciones de etanol y se midió su crecimiento. Este crecimiento bacteriano fue monitoreado por espectrofotometría, midiendo la DO a una longitud de onda de 620nm. El incremento en el número de células se ve reflejado en la turbidez de la suspensión celular, siendo proporcional el número de células presentes a las unidades de densidad óptica (Madigan *et al.*, 2003).

Las curvas de crecimiento de la cepa *Acetobacter cerevisiae* 209 se muestran en la Figura 1. Para las concentraciones de 6 y 8 % v/v de etanol el comportamiento bacteriano fue similar. Presentaron una fase de latencia de alrededor de 48 horas, para luego comenzar la fase exponencial de crecimiento. Sin embargo, a una concentración de 10% v/v de etanol la fase de



latencia es mayor, alrededor de 100 horas para luego comenzar una fase de crecimiento exponencial de aproximadamente 8 días (200 horas) antes de la fase estacionaria. A pesar de presentar una mayor fase de latencia, el crecimiento bacteriano osciló entre 0,2 a 0,6 unidades de absorbancia (UA) al igual que para las concentraciones de 6 y 8 %v/v etanol. Por lo tanto, considerando que el etanol es la materia prima para la elaboración del vinagre y además teniendo en cuenta que la evaporación es una de las principales causas en la pérdida de éste, es que se seleccionó la concentración de 10%v/v de etanol para realizar el vinagre de vino.

Figura 1. Curvas de crecimiento de *Acetobacter cerevisiae* 209 en medio V50 a 0, 6, 8 y 10% v/v de etanol.



### **Resistencia de *Acetobacter cerevisiae* 209 a distintas concentraciones de anhídrido sulfuroso libre**

El anhídrido sulfuroso es el principal agente utilizado como antiséptico y antioxidante en el proceso final de acetificación, siendo especialmente importante por inhibir el crecimiento bacteriano, así como también para prevenir la oxidación y evitar el pardeamiento (Bordeu y Scarpa, 1998). Como se aprecia en el Cuadro 2 el contenido de anhídrido sulfuroso libre no presenta una inhibición en el crecimiento de *Acetobacter cerevisiae* 209 en concentraciones de 5, 10, 15 y 20 ppm, permitiendo el desarrollo de unidades formadoras colonias (UFC) para

estas concentraciones. En los resultados de siembra directa a concentraciones de 5, 10 y 15 ppm, las colonias crecieron aglomeradas lo que hizo imposible el recuento. Sin embargo en las diluciones -1,-2 y -3 se pudo realizar el recuento de cada repetición y se obtuvo un promedio en todas  $10^4$  UFC/mL. Este recuento es muy similar al obtenido para la condición sin sulfuroso, por lo tanto, estas dosis no inhiben el crecimiento de la cepa 209. Sin embargo a una concentración de 25 ppm de anhídrido sulfuroso libre no hubo desarrollo de colonias en ninguna dilución y tampoco en la siembra directa. Por lo tanto, se puede concluir que *Acetobacter cerevisiae* 209 es sensible a concentraciones iguales o mayores a 25 ppm. Esto concuerda con lo planteado por Carrascosa *et al.* (2005), sobre crecimiento de bacterias acéticas, quien señala que concentraciones alrededor de 30 ppm podrían inhibir completamente el crecimiento de bacterias acéticas en el vino. Por otra parte Llaguno y Polo (1991), señalan que en cantidades bajas, 10 ppm de SO<sub>2</sub> libre, la acción antiséptica es eficaz contra el crecimiento de bacterias acéticas.

Cuadro 2. Crecimiento de *Acetobacter cerevisiae* 209 en medio V50 a 0, 5, 20, 15 y 20 ppm de metabisulfito de potasio a una solución al 5%.

Solución de metabisulfito de potasio al 5%						
Diluciones	Blanco	5 ppm	10 ppm	15 ppm	20 ppm	25 ppm
Siembra Directa	$1,12 \times 10^4$ UFC/mL	Incontable	Incontable	Incontable	$2,6 \times 10^4$ UFC/mL	0UFC/mL
Dilución -1	$2,6 \times 10^4$ UFC/mL	$2,6 \times 10^4$ UFC/mL	$2,7 \times 10^4$ UFC/mL	$3,5 \times 10^4$ UFC/mL	$2 \times 10^4$ UFC/mL	0UFC/mL
Dilución -2	$2 \times 10^4$ UFC/mL	$2,4 \times 10^4$ UFC/mL	$3,6 \times 10^4$ UFC/mL	$4 \times 10^4$ UFC/mL	$1,1 \times 10^4$ UFC/mL	0UFC/mL
Dilución -3	0 UFC/mL	$2 \times 10^4$ UFC/mL	$3 \times 10^4$ UFC/mL	0UFC/mL	0UFC/mL	0UFC/mL
Dilución -4	0UFC/mL	0UFC/mL	0UFC/mL	0UFC/mL	0UFC/mL	0UFC/mL

### **Determinación de presencia de *Acetobacter cerevisiae* 209 durante el proceso de acetificación.**

#### **Caracterización por PCR-RFLP del gen 16S rRNA**

A través de la caracterización genética se identificó el inóculo con el fin de determinar su pureza e identidad. La estrategia empleada consistió en amplificar el gen ribosomal 16S y después digerir el fragmento amplificado con diversas enzimas de restricción. Se empleó una combinación de diferentes enzimas, la cual permite la identificación de prácticamente todas las especies de bacterias acéticas (Jara, 2009). Guillamón *et al.* (2003) señalan que las

secuencias de esta zona están muy conservadas entre las cepas de una misma especie, de manera que los RFLPs de esta región pueden producir patrones de bandas específicos para cada especie.

Para identificar a *Acetobacter cerevisiae* 209 en el inóculo y en el vinagre final se comparó con una cepa de colección *Acetobacter cerevisiae* (DSMZ 14362). Para dicha caracterización se analizó el gen 16S rRNA del inóculo utilizando partidores universales bajo las condiciones descritas por Romero *et al.* (2002) y se realizó un análisis de restricción con la endonucleasa *TaqI*. Como se observa en la Figura 2, la cepa *Acetobacter cerevisiae* 209 mostró los mismos perfiles de restricción de la cepa de colección *Acetobacter cerevisiae* (DSMZ 14362), por lo tanto, con esta técnica se puede corroborar que corresponde a la misma especie. Los perfiles de restricción para el análisis del gen 16S rRNA fueron los siguientes: 850-350-190 pb.

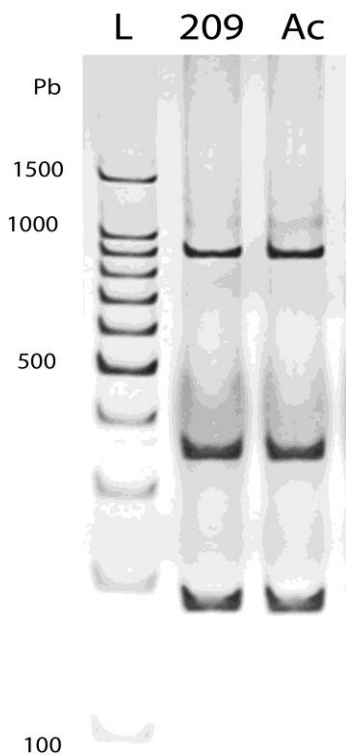


Figura 2. Caracterización genética de *Acetobacter cerevisiae* 209. Análisis PCR-RFLP del gen 16S rRNA. Carril L: Ladder 100. Carril 209: *Acetobacter cerevisiae* 209. Carril Ac: *Acetobacter cerevisiae* (DSMZ 14362) cepa de colección.

### Caracterización por PCR-RFLP ITS 16S-23S rRNA

Para profundizar más en la identificación de *Acetobacter cerevisiae* 209, se utilizó un segundo método de identificación basado en el espaciador intergénico 16S-23S rRNA, que son porciones variables, que varían en tamaño y secuencia, permitiendo diferenciar especie y cepa utilizando enzimas de restricción (Jensen *et al.*, 1993). Como se observa en la Figura 3, la cepa 209 mostró un amplificado de 750pb y luego éste fue digerido con la enzima de restricción *AluI*. Los perfiles de restricción para el análisis de la zona intergénica 16S-23S fueron 430-250-110pb. Sin embargo, la cepa de colección *Acetobacter cerevisiae* (DSMZ 14362) mostró un patrón distinto a *Acetobacter cerevisiae* 209, los perfiles de restricción fueron 430-200-110. Por lo tanto, el resultado del análisis de restricción del ITS 16S-23S rRNA indicó que *Acetobacter cerevisiae* 209 se pudo distinguir de la cepa de colección *Acetobacter cerevisiae* (DSMZ 14362).

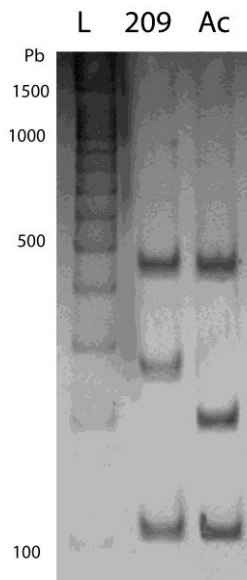


Figura 3. Caracterización genética de *Acetobacter cerevisiae* 209. Análisis PCR-RFLP del ITS 16S-23 rRNA. Carril L: Ladder 100 pb. Carril 209: *Acetobacter cerevisiae* 209. Carril Ac: *Acetobacter cerevisiae* (DSMZ 14362) cepa de colección.

### Caracterización genética del vinagre de vino blanco y vinagre de vino tinto

Se realizó la caracterización genética a los vinagres, tanto de vino blanco como de vino tinto. Dicha caracterización se realizó al inicio y al final del proceso de acetificación, con la finalidad de corroborar que la cepa que se inóculo fue realmente quién realizó el proceso de acetificación. Como se puede apreciar en las Figuras 4 y 5, tanto en los vinagres iniciales (VI) como en los vinagres finales (VF) de vino blanco y vino tinto sólo se aprecia el perfil de *Acetobacter cerevisiae* 209. Por lo que se puede concluir que el proceso de acetificación fue realizado únicamente por la cepa 209.

En la Figura 4 A y B, vinagre de vino blanco (A) y tinto (B), se pueden apreciar los perfiles de restricción para el análisis del gen 16S rRNA que fueron 850-350-190 pb.

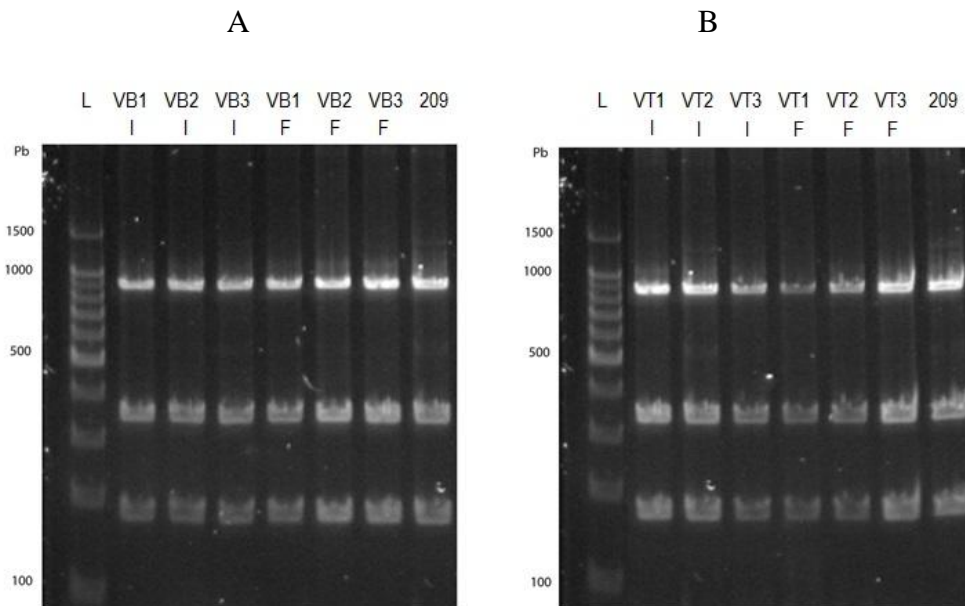


Figura 4 A y B. Caracterización genética del vinagre de vino blanco (A) y tinto (B). Análisis PCR-RFLP del gen 16S rRNA. L: Ladder 100pb. 209: *Acetobacter cerevisiae* 209. VB1 I vinagre blanco inicial repetición 1, VB2 I vinagre blanco inicial repetición 2, VB3 I vinagre blanco inicial repetición 3, VB1 F vinagre blanco final repetición 1, VB2 F vinagre blanco final repetición 2, VB3 F vinagre blanco final repetición 3, VT1 I vinagre tinto inicial repetición 1, VT2 I vinagre tinto inicial repetición 2, VT3 I vinagre tinto inicial repetición 3, VT1 F vinagre tinto final repetición 1, VT2 F vinagre tinto final repetición 2, VT3 F vinagre tinto final repetición 3.

En la Figura 5 A y B, vinagre de vino blanco (A) y vino tinto (B), se puede apreciar los perfiles de restricción para el análisis de la zona intergénica 16S-23S corresponden a 430-250-110pb. Por lo que se puede concluir que el proceso de acetificación fue realizado únicamente por la cepa 209, y no arrojan la presencia de otras bacterias.

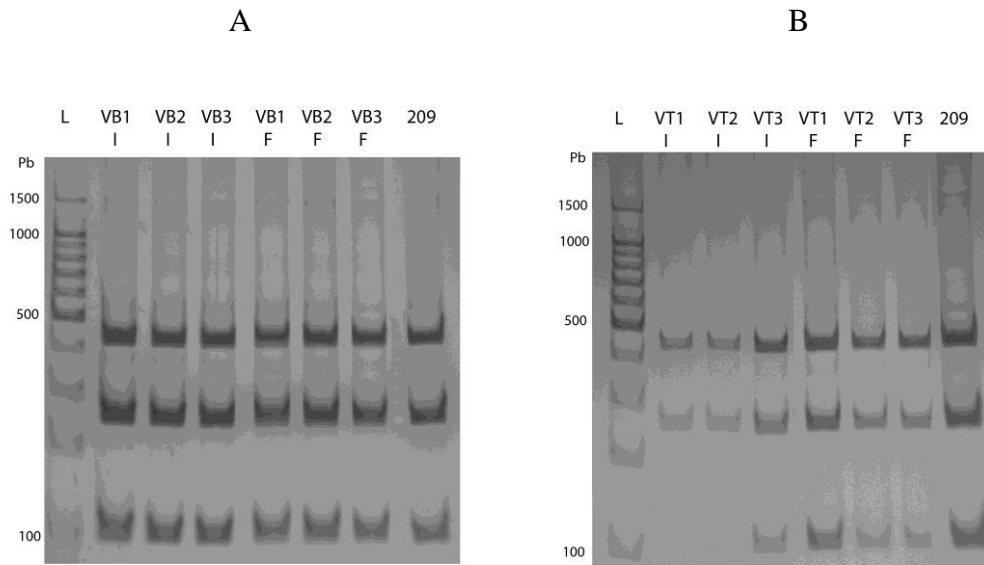


Figura 5 A y B. Caracterización genética del vinagre de vino blanco (A) y tinto (B). Análisis PCR-RFLP ITS 16S-23S rRNA. L: marcador de peso molecular conocido Ladder 100pb invitrogen. 209: *Acetobacter cerevisiae* 209. VB1 I vinagre blanco inicial repetición 1, VB2 I vinagre blanco inicial repetición 2, VB3 I vinagre blanco inicial repetición 3, VB1 F vinagre blanco final repetición 1, VB2 F vinagre blanco final repetición 2, VB3 F vinagre blanco final repetición 3, VT1 I vinagre tinto inicial repetición 1, VT2 I vinagre tinto inicial repetición 2, VT3 I vinagre tinto inicial repetición 3, VT1 F vinagre tinto final repetición 1, VT2 F vinagre tinto final repetición 2, VT3 F vinagre tinto final repetición 3.

### Análisis físicos químicos

Los resultados presentados en el Cuadro 3, corresponden a muestras tomadas al término de la acetificación del vinagre de vino blanco y vinagre de vino tinto, con sus respectivas repeticiones.

Cuadro 3. Características físico químicas de vinagres blancos y tintos

Análisis	Vinagre blanco 1	Vinagre blanco 2	Vinagre blanco 3	Vinagre tinto 1	Vinagre tinto 2	Vinagre tinto 3
Grado Alcohólico (%v/v)	0,5	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4
Acidez volátil (g/L ác. Acético)	41,28	41,76	42,54	45,08	44,23	44,4

#### Grado Alcohólico

El grado alcohólico es la cantidad porcentual, en volumen, de etanol (alcohol etílico) efectivamente presente en el vinagre. El contenido de etanol residual en vinagres vínicos, aunque es variable, oscila en un estrecho margen. La reglamentación Española (Presidencia del Gobierno, 1993) establece un límite superior del 0,5% v/v, aunque en la práctica se pueden obtener valores hasta de 2-3% v/v (Guzmán, 1998). Sin embargo el decreto N°78 de la ley 18.455 (MINAGRI, 1985), señala que un vinagre para que sea denominado como tal, tiene que tener un contenido de alcohol no superior a 1% v/v. Como se aprecia en el Cuadro 3, el contenido de alcohol tanto para el vinagre blanco, como para el vinagre tinto, fluctúa entre 0,3 y 0,5% v/v, encontrándose dentro de los márgenes establecidos por la ley para ser denominados como tal.

Durante el proceso de acetificación, se procura el mayor rendimiento posible de la transformación de etanol hasta ácido acético. Pero no resulta beneficioso agotar por completo el etanol, ya que entonces las bacterias acéticas podrían degradar el ácido acético producido. En los métodos artesanales, no se desea agotar todo el etanol, ya que éste al reaccionar con el ácido acético mejora las características organolépticas del vinagre. Esto se debe a la formación de ésteres tales como, el acetato de etilo, que le confieren al vinagre aromas frutales y florales (Guzmán, 1998; Zoecklein *et al.*, 2001)

### **Acidez volátil**

La acidez volátil en el vino está formada por un conjunto de ácidos grasos, principalmente por el ácido acético, acompañado en menor medida por el ácido butírico, ácido fórmico, ácido propiónico, entre otros. Por lo tanto el olor y flavor (sabor y aroma) de los vinagres dependen en gran medida de la existencia de una serie de constituyentes volátiles formados durante el proceso de acetificación (Guzmán, 1998).

Mesa *et al.* (2003) señalan que durante el proceso de acetificación se producen pérdidas de rendimiento por evaporación, debido a aumentos de temperaturas difíciles de controlar en la acetificación. Una excesiva disminución de etanol, por evaporación, puede influir negativamente en la elaboración del vinagre. Además bacterias del género *Acetobacter* oxidan el etanol del medio a ácido acético, y luego cuando el etanol se ha consumido totalmente, oxidan el acetato. El etanol inhibe las enzimas que oxidan el acetato y el ácido acético a concentraciones elevadas inhibe la oxidación del etanol (Barja *et al.*, 2003; Hidalgo, 2008).

De acuerdo a los resultados que se indican en el Cuadro 3, se observa que los valores obtenidos tanto para el vinagre blanco como, para el vinagre tinto fluctuaron entre los 41,28 g/L y 45,08 g/L de ácido acético. Por lo tanto, estos valores se encuentran de acuerdo a lo que establece el decreto N°78 de la ley 18.455 (MINAGRI, 1985), que señala que, un vinagre para que sea denominado como tal, tiene que tener un contenido de ácido acético mínimo de 40 g/L.

### **Intensidad colorante y Matiz**

En los vinos blancos la intensidad colorante corresponde a la medición de absorbancia a 420nm (tonalidades amarillas). En cambio, en los vinos tintos la intensidad colorante es la suma de las densidades ópticas a 420, 520 y 620nm, ya que a 520nm y 620nm se pueden apreciar las tonalidades rojas y azules respectivamente, a diferencia del vino blanco. Por lo tanto, para la medición de este parámetro en los vinagres se procedió de la misma forma. La relación de la componente amarilla del color sobre la roja se define como matiz ( $420\text{nm} \cdot 520\text{nm}^{-1}$ ), esta nos permite ver la evolución de un vino. Como se aprecia en el Cuadro 4, el comportamiento de la intensidad colorante aumenta del vino al vinagre tanto para el vinagre tinto como para el vinagre blanco, este aumento podría deberse a la formación de nuevos pigmentos. Por lo tanto este aumento en la intensidad colorante puede atribuirse a que



el complejo antociano-tanino al estar en contacto con el oxígeno presenta una mayor coloración roja por la oxidación de este (Flanzy, 2000). Al aumentar la componente roja del color, el matiz disminuye como también se observa en el Cuadro 4. Esto también ocurre en el estudio realizado por Obreque (2003), quien explica que los vinos en contacto con oxígeno tienen 2 etapas de desarrollo de color, primero la etapa de formación del complejo antociano-tanino, que es incolora, y la segunda etapa, en donde bajo concentraciones adecuadas de oxígeno, este complejo se oxida aumentando así la componente roja del vino. Como el proceso de acetificación no tiene restricción de oxígeno, ya que la elaboración de vinagre es completamente aeróbica, este complejo tiene todas las condiciones para ser oxidado.

Cuadro 4. Evolución de la intensidad colorante y matiz durante la elaboración de vinagre. Cada valor corresponde al promedio  $\pm$  desviación estándar.

Análisis	Vino Blanco	Vinagre Blanco	Vino Tinto	Vinagre Tinto
Intensidad colorante	0,24 $\pm$ 0,001 (a)	0,32 $\pm$ 0,01 (b)	6,76 $\pm$ 0,01 (a)	16,97 $\pm$ 0,45 (b)
Matiz	-	-	0,80 $\pm$ 0,01 (b)	0,57 $\pm$ 0,02 (a)

Letras distintas en una misma fila indican diferencia significativas ( $p \leq 0,05$ ).

### Compuestos fenólicos

El vinagre se produce en dos etapas. La primera etapa es la fermentación alcohólica que corresponde a la conversión de los azúcares fermentables en etanol, principalmente realizada por levaduras del género *Saccharomyces*. La segunda etapa, es el proceso de acetificación propiamente tal, donde se produce la oxidación del etanol en ácido acético por parte de las bacterias acéticas, del género *Acetobacter* principalmente (Tesfaye *et al.*, 2002; Hidalgo *et al.*, 2010). En este caso particular de *Acetobacter cerevisiae* 209, por lo tanto, cualquier modificación ocurrida durante el proceso de acetificación en los compuestos fenólicos, se podría correlacionar con dicha cepa.

De acuerdo a lo planteado por Tesfaye *et al.* (2003), los compuestos fenólicos pueden ser modificados por procesos oxidativos, como es el proceso de acetificación. Sin embargo, existen evidencias claras de cómo las bacterias acéticas modifican los compuestos fenólicos. Es por esto, que se evaluó los efectos de la acetificación sobre los compuestos fenólicos durante la elaboración de vinagres de vino con la cepa *Acetobacter cerevisiae* 209.

Los resultados de los compuestos fenólicos presentados en el Cuadro 5 corresponden a muestras de vino blanco y vino tinto tomadas al inicio del proceso de acetificación y posteriormente al vinagre obtenido de ellos.

Cuadro 5. Análisis de compuestos fenólicos realizados por espectrofotometría del vino y vinagre. Cada valor corresponde al promedio  $\pm$  desviación estándar.

Análisis	Vino Blanco	Vinagre Blanco	Vino Tinto	Vinagre Tinto
Fenoles totales (mg/L Ac.Gálico)	309,97 $\pm$ 17,30 (b)	271,96 $\pm$ 1,56 (a)	1436,98 $\pm$ 30,05 (b)	1043,76 $\pm$ 42,08 (a)
Taninos totales (g/L de Procianidina)	0,17 $\pm$ 0,03 (b)	0,08 $\pm$ 0,02 (a)	2,35 $\pm$ 0,14 (b)	1,61 $\pm$ 0,10 (a)
Antocianos totales (ml/L Malvidina)	-	-	171,53 $\pm$ 20,80 (b)	159,97 $\pm$ 13,18 (a)

Letras distintas en una misma fila indican diferencia significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Como se puede apreciar en el cuadro 5, existe una disminución significativa en los fenoles totales y taninos totales, durante el proceso de acetificación, tanto para el vinagre de vino blanco como el vinagre de vino tinto. Lo mismo ocurre para los antocianos totales en el vino tinto. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Tesfase *et al.*, (2003), en donde la variación de los compuestos fenólicos durante la acetificación, no presentó cambios estadísticamente significativos.

La concentración inicial de fenoles totales presentes en el vino blanco fue de 309,97 mg/L, y de 1436,98 mg/L para el vino tinto, expresado como ácido gálico. Al final del proceso de acetificación se registró una disminución del 15% en la concentración de fenoles totales para el vinagre de vino blanco, quedando en 271,96 mg/L y una disminución de 25% para el vinagre de vino tinto. Esta disminución de los compuestos fenólicos coincide con lo señalado por Tesfaye *et al.* (2003) ocurrido durante el proceso de acetificación.

Con respecto a los taninos totales, la concentración inicial presente en el vino blanco fue de 0,17 g/L de procianidina y de 2,35 g/L de procianidina para el vino tinto. Durante el proceso de acetificación se registró una pérdida del 50% para el vinagre de vino blanco obteniéndose una concentración final de 0,08 g/L de procianidinana y de 30% para el vinagre de vino tinto, obteniéndose una concentración final de 1,61 g/L de procianidina.

En caso de los antocianos, estos son pigmentos que dan tonalidades que van desde los rojos intensos hasta los tonos azulados. Además estos pigmentos poseen propiedades antioxidantes, característica que actualmente se aprecia mucho en el mercado y por lo tanto muy buscada por

los productores de alimentos (Rivas-Gonzalo *et al.*, 2003). Como se muestra en el Cuadro 5, al igual que en los análisis anteriores, existe una disminución en el contenido de antocianos totales, siendo el contenido de antocianos totales de 171,53 mg/L de malvidina los cuales presentaron una disminución del 10% con respecto al vino, llegando a un contenido de 159,97 mg/L de malvidina en el vinagre de vino tinto. Esta disminución puede deberse, a que los antocianos se pueden unir a los taninos dando un producto incoloro (Flanzy, 2000). Lo anterior también coincide por lo descrito por Obreque (2003), quien concuerda en que existe una disminución del contenido de antocianos totales, ya que hay una degradación de los antocianos libres y además de que los antocianos libres se unen con los taninos.

### **Compuestos fenólicos de bajo peso molecular**

La identificación de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular se obtuvieron mediante HPLC-DAD a 280nm para las muestras de vino blanco, vino tinto y posterior a la acetificación para las muestras de vinagre de vino blanco y vinagre de vino tinto respectivamente. La identificación de los compuestos correspondientes a los peaks fueron asignados en base a su espectro de absorción y tiempo de retención, identificándose los siguientes compuestos: ácido gálico, procianidina, ácido protocatéquico, ácido caféico, catequina, ácido p-cumárico, trans-resveratrol, quercetina, ácido elágico, tirosol, ácido caftárico, galato de procianidina, ácido vainillínico y ácido siríngico.

Los resultados analíticos obtenidos de la cuantificación de los fenoles de bajo peso molecular identificados en el vino y posteriormente en el vinagre se muestran en el Cuadro 6. Los cambios ocurridos en los perfiles durante el proceso de acetificación serán comentados a continuación.

Durante el proceso de acetificación se modificaron ciertos compuestos fenólicos de bajo peso molecular, dentro de éstos, los que presentaron una disminución estadísticamente significativa fueron el ácido protocatéquico, catequina, epicatequina, procianidina y galato de procianidina. Por otra parte, los compuestos que aumentaron de manera estadísticamente significativa fueron el ácido caféico, ácido p-cúmarico, ácido caftárico.

En los 2 vinagres de vino estudiados, los compuestos fenólicos que no presentaron diferencias estadísticamente significativas fueron: ácido gálico y tirosol. Para el vinagre de vino tinto tampoco presentó diferencias el ácido elágico, trans-resveratrol y quercitina. Dentro de estos

compuestos, el compuesto fenólico que se encuentra en mayor cantidad es el tirosol con concentraciones de  $1,51 \pm 1,02$  y  $15,33 \pm 0,09$  mg/L para vinagre de vino blanco y vinagre de vino tinto respectivamente, concentraciones similares fueron obtenidos por Cerezo *et al.*, 2008. Sin embargo, no presentó diferencias estadísticamente significativas durante el proceso de acetificación de ambos vinagres. Esto concuerda con lo planteado por Ribéreau-Gayon (2000), quien señala que la concentración inicial de tirosol depende de la variedad de uva empleada y que esta permanece relativamente constante durante envejecimiento de vinos, lo mismo ocurriría en vinagres de vino.

Con respecto a los ácidos hidroxibenzoicos, ácido protocatequico, ácido vainillínico y ácido siríngico, en conjunto muestran una disminución si se compara con respecto a su contenido inicial. Esta disminución en su concentración coincide con lo planteado por otros autores en estudios realizados en envejecimiento de vino tinto debido a las distintas reacciones químicas ocurridas (Monagas *et al.*, 2006)

En el caso de los ácidos hidroxicinámicos algunos autores (Zafrilla *et al.*, 2003; Monagas *et al.*, 2005 y Benítez *et al.*, 2006) señalan que han encontrado un aumento de estos, ácido cafeico, ácido cumárico y ácido caftárico, durante el almacenamiento de vinos. Además Benítez *et al.*, (2006) indican que reacciones como la hidrólisis ácida de ésteres a sus respectivos ácidos son facilitadas por una alta temperatura, lo cual es propio del proceso de acetificación. Por otra parte, Schwarz *et al.* (2003) señalan que los ácidos hidroxicinámicos pueden también reaccionar con los antocianos, para producir pigmentos del tipo piroantocianos. Esto también coincide con lo planteado por Peña-Neira (1999), quien señala que los ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido cumárico y ácido caftárico) se producen por la degradación de antocianos, esta degradación es provocada por el proceso de oxidación que ocurre durante la acetificación de los vinagres y que se podría asociar a las bacterias acéticas, particularmente *Acetobacter cerevisiae* ya que fue ésta quien realizó la acetificación.

Los flavanoides, catequina, epicatequina, procianidina y galato de procianidina también disminuyen su concentración durante el proceso de acetificación. La disminución de las procianidinas podría deberse a la degradación de estas. Es principalmente escasa la información sobre la degradación de la procianidina, por parte de microorganismos. Roopesh *et al.* (2010), mencionan la habilidad de algunos microorganismos para degradar estas complejas moléculas, en donde sus enzimas pueden intervenir en la ruta de la procianidina. Contreras-Domínguez *et al.*, (2006) señalan que *Aspergillus fumigatus* posee una enzima

llamada PB2-degrading, la cual es capaz de degradar la procianidina. Por lo tanto, se podría especular que la degradación de la procianidina podría deberse a una enzima de este tipo codificada por *Acetobacter cerevisiae*. No obstante, aún se desconocen muchas de las funciones de sus proteínas.

Con respecto a las catequinas, se han encontrado bacterias aeróbicas capaces de degradar la catequina, como es el caso de *Burkholderia sp*, quien posee enzimas que pueden biotrasformar la catequina (Matsuda *et al.*, 2008; Arunachalam *et al.*, 2003). Por lo tanto, se podría insinuar que *Acetobacter cerevisiae* puede poseer una enzima de este tipo capaz de modificar la catequina. La disponibilidad de genomas de bacterias acéticas tales como *Acetobacter aceti*, *A. pasteurianus*, *A. pomorum*, será de utilidad para identificar actividades enzimáticas asociadas a la alteración de los compuestos fenólicos en el vino.

Cuadro 6. Compuestos fenólicos de bajo peso molecular, identificados y cuantificados (mg/L) por HPLC-DAD a 280nm de muestras de vino blanco y vino tinto y, posterior a la acetificación, de vinagre de vino blanco y vinagre de vino tinto. Cada valor corresponde al promedio  $\pm$  desviación estándar.

Análisis	Vino Blanco	Vinagre Blanco	Vino Tinto	Vinagre Tinto
Ácido gálico	1,45 $\pm$ 0,04 (a)	1,37 $\pm$ 0,04 (a)	9,06 $\pm$ 0,88(a)	8,45 $\pm$ 0,50 (a)
Procianidina	0,71 $\pm$ 0,01 (b)	0,53 $\pm$ 0,02 (a)	1,42 $\pm$ 0,02 (b)	1,12 $\pm$ 0,04 (a)
Ácido protocatéquico	1,50 $\pm$ 1,52	nd	2,04 $\pm$ 0,05	nd
Ácido caféico	0,80 $\pm$ 0,03 (a)	1,47 $\pm$ 0,32 (b)	1,94 $\pm$ 0,03 (a)	3,05 $\pm$ 0,03 (b)
Catequina			3,01 $\pm$ 0,05	nd
Epicatequina			1,01 $\pm$ 0,03	nd
Ácido p-cumárico	0,42 $\pm$ 0,01 (a)	0,83 $\pm$ 0,1 (b)	1,75 $\pm$ 0,03 (a)	2,45 $\pm$ 0,31 (b)
Trans-Resveratrol			0,43 $\pm$ 0,06 (a)	0,34 $\pm$ 0,02 (a)
Quercetina			0,55 $\pm$ 0,03 (a)	0,52 $\pm$ 0,02 (a)
Ácido elágico			1,73 $\pm$ 0,12 (a)	1,64 $\pm$ 0,05 (a)
Tirosol	1,53 $\pm$ 0,02 (a)	1,51 $\pm$ 1,02 (a)	15,55 $\pm$ 0,09 (a)	15,33 $\pm$ 0,09 (a)
Ácido caftárico	0,42 $\pm$ 0,01 (a)	0,69 $\pm$ 0,04 (b)	0,76 $\pm$ 0,02 (a)	2,87 $\pm$ 0,57 (b)
Galato de procianidina	0,69 $\pm$ 0,01 (b)	0,51 $\pm$ 0,02 (a)	1,22 $\pm$ 0,02 (b)	0,92 $\pm$ 0,04 (a)
Ácido vainillínico			1,89 $\pm$ 0,08 (b)	1,54 $\pm$ 0,02 (a)
Ácido siringico			2,15 $\pm$ 0,08 (b)	1,47 $\pm$ 0,02 (a)

Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ). Nd: no detectado

### Perfil Antociánico

Los antocianos, están basados químicamente en una única estructura aromática llamada cianidina y todos se consideran derivados de esta, por adición o sustracción de grupos hidroxilo, por metilación o por glicosilación (Rivas-Gonzalo *et al.*, 2003).

Según el número de grupos hidroxilo, y la menor o mayor metoxilación, se originará una antocianidina diferente o aglucona. Estas agluconas definitivamente no se encuentran libres en la naturaleza sino que unidas a azúcares formando las antocianinas (Peña, 1999)

El perfil polifenólico de los antocianos fue obtenidos mediante HPLC-DAD a 520nm, para las muestras de vino tinto y vinagre de vino tinto, estos correspondieron a los peaks, que se identificaron de acuerdo a su espectro de absorción y tiempo de retención, identificándose los siguientes compuestos: Delfinidina-3-glucósido (Dp3Gl), Cianidina-3-glucósido (Cy3Gl), Petunidina-3-glucósido (Pt3Gl), Peonidina-3-glucósido (Po3Gl)-Malvidina-3-glucósido (Mv3Gl) y Malvidina-3-acetil-glucósido (Mv3acGl).

En el Cuadro 7, se pueden apreciar los resultados analíticos de la cuantificación de los antocianos, encontrados en las muestras de vino tinto y posterior a la acetificación, en las muestras de vinagre de vino tinto.

Cuadro 7. Perfil de antocianos, identificados y cuantificados (mg/L) por HPLC-DAD 520nm de vino tinto y vinagre de vino tinto. Cada valor corresponde al promedio  $\pm$  desviación estándar.

Análisis	Vino Tinto	Vinagre Tinto
Dp3Gl	5,14 $\pm$ 0,17 (b)	2,59 $\pm$ 1,48 (a)
Cy3Gl	0,30 $\pm$ 0,06 (b)	0,04 $\pm$ 0,01 (a)
Pt3Gl	8,02 $\pm$ 0,49 (b)	4,88 $\pm$ 1,60 (a)
Po3Gl	1,62 $\pm$ 0,12 (b)	0,67 $\pm$ 0,23 (a)
Mv3Gl	45,43 $\pm$ 2,11 (b)	20,73 $\pm$ 4,44 (a)
Mv3acGl	2,93 $\pm$ 0,24 (a)	2,09 $\pm$ 1,38 (a)

Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Como se puede observar en el Cuadro 6, todos los antocianos disminuyeron considerablemente a excepción de la malvidina-3-acetil-glucósido quien no presentó una disminución estadísticamente significativa. Este compuesto presentó una disminución del

30%, esto podría ser producto de la mayor concentración de ácido acético en el medio al final de proceso de elaboración de vinagre, ya que estos se unen al ácido acético, formando los antocianos acetil-glucósilados. El antociano que se encuentra en mayor cantidad en el vinagre es la malvidina-3-glucósido con una concentración de 20,73 mg/L seguido a gran distancia de la petunidina-3-glucósido con 4,88 mg/L, delphinidina-3-glucósido con 2,59 mg/L y peonidina-3-glucósido con 0,67 mg/L, mientras que el de cianidina-3-glucósido se encuentra a concentraciones muy bajas (0,04mg/L), este orden en el cual se encuentran los antocianos en el vinagre concuerda con lo descrito por Peña (1999) en vinos. Estos resultados son similares a los descritos por Cereza *et al.*, (2010) en estudios de vinagres de vinos, luego del proceso de acetificación.

Esta disminución en todos los antocianos podría deberse a la glicosilación de los antocianos, ocurrida durante el proceso de acetificación. Por otra parte, los antocianos disminuyen aún más en condiciones de oxigenación debido a la formación de compuestos derivados de las antocianinas y reacciones de degradación (Cerezo *et al.*, 2010). Sin embargo, en la naturaleza existen algunos microorganismos, bacterias principalmente capaces de metabolizar las antocianinas con su sistema enzimático, jugando un papel importante en la producción de compuestos con diferente disponibilidad y actividad biológica. Avila *et al.* (2009), señalan que algunas bacterias poseen enzimas capaces de hidrolizar diversos glucósidos favonoides. La hidrólisis de estos glucósidos de antocianinas es la primera parte antes de la posterior degradación bacteriana y por otra parte, para la formación de un conjunto de nuevos metabolitos que aún no han sido totalmente identificados. De acuerdo a lo anterior se podría inferir que es *Acetobacter cerevisiae* 209 quien participa en la hidrólisis de los antocianos durante el proceso de acetificación ya que es la única bacteria que participa durante la elaboración del vinagre.

### **Capacidad Antioxidante**

Actualmente, existen variados métodos para medir capacidad antioxidante. Dependiendo de la reacción química involucrada se pueden clasificar en 2 tipos. El primer tipo se basan en la transferencia de electrones y el segundo son los que se basan en la transferencia del átomo de hidrógeno, perteneciendo el análisis ORAC a éste último (Huang *et al.*, 2005). Lo dicho anteriormente es importante considerarlo ya que muchas publicaciones no consideran el fundamento químico de estas reacción y utilizan métodos rápidos basados en transferencia de

electrones como TEAC y FRAP sin advertir que estos métodos miden el poder óxido/reductor no equivalente a la actividad antioxidante del compuesto (Ou *et al.*, 2001).

Como se mencionó anteriormente la capacidad antioxidante esta correlacionada con el contenido de polifenoles presentes en la materia prima. Sin embargo hay que considerar que no todos los polifenoles presentan la misma capacidad antioxidante. Por consiguiente es la calidad y no la cantidad de polifenoles la que determinara la capacidad antioxidante de un vinagre. También es importante considerar que las determinaciones de capacidad antioxidantes realizadas in vitro difieren de su efecto antioxidante in vivo y son solo una aproximación de lo que ocurre en la realidad. En las reacciones in vivo ocurren una serie de transformaciones metabólicas en donde hay una gran cantidad de reacciones químicas y por ende la capacidad antioxidante no solo será la suma de los compuestos presentes, sino por los variados efectos sinérgicos o inhibitorios que se producen entre estos compuestos y el medio en el cual se encuentran (Ghiselli *et al.*, 2000).

Cuadro 8. Capacidad antioxidante del vino blanco y tinto y posterior a la acetificación, de vinagre de vino blanco y vinagre de vino tinto. Cada valor corresponde al promedio  $\pm$  desviación estándar.

Análisis	Vino Blanco	Vinagre Blanco	Vino Tinto	Vinagre Tinto
ORAC (uMET/g)	1555,68 $\pm$ 105,00 (b)	1052,87 $\pm$ 213,22 (a)	2254.50 $\pm$ 55,78 (b)	1304,94 $\pm$ 65,46 (a)

Letras distintas en una misma fila indican diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ )

Capacidad antioxidante medida por ORAC, expresados como uM Equivalentes de Trolox/g

En el Cuadro 8 se muestran los cambios que ocurren en la capacidad antioxidante durante proceso de acetificación. Los valores obtenidos de ORAC reflejan un estado particular de la muestra en cuanto a la capacidad antioxidante que tiene, siendo el reflejo de la condición química en que se encuentra la muestra en específico y en ese momento determinado. No entrega una información específica cualitativa sobre el tipo de compuestos fenólicos existentes, sino una referencia de la cantidad de antioxidantes presentes en la muestra. En general los valores de actividad antioxidantes de vinos tintos son significativamente superiores a los de vinos blancos (Fernández-Pachón, 2004 y Fogliano *et al.*, 1999). Los valores obtenidos para vino blanco fueron de 1555,68 uMET/g y para el vino tinto de 2254,50 uMET/g, esto era esperado considerando que el vino tinto posee un mayor contenido de flavonoides, valores similares de capacidad antioxidante fueron obtenidos por Fernández-



Pachón *et al.*, (2004). Luego de realizada la acetificación los valores de ORAC para el vinagre de vino blanco y de vino tinto obtenidos fueron 1052,87 uMET/g y 1304,94 uMET/g respectivamente, presentando una disminución del 30% y 40% respecto al vino. Estas concentraciones fueron mayores en relación a las descritos por Dávalos *et al.*, 2005, quien determino concentraciones de 876 uMET/g y 1177 uMET/g para vinagres de vino blanco y vino tinto respectivamente. Esta disminución en la capacidad antioxidante durante el proceso de acetificación fue un resultado esperado, considerando que es un proceso de carácter oxidativo y también esta disminución se correlaciona de manera positiva con la disminución en el contenido de polifenoles expresados anteriormente durante el proceso de acetificación (Moreno, 2004). En general, se ha encontrado una correlación lineal elevada entre los valores de actividad antioxidante y el índice de polifenoles totales de los vinos (IPT) (Frankel *et al.*, 1995; Vinson *et al.*, 1995; Fogliano *et al.*, 1999 y Sánchez-Moreno *et al.*, 2002). Por otro lado es importante señalar que la capacidad antioxidante de los vinagres varía dependiendo del tipo de vinagre, de la metodología utilizada y de la materia prima utilizada en el proceso de elaboración (Carbo *et al.*, 2006).

Algunos autores señalan que los compuestos que presentan mayor actividad antioxidantes son los flavanoles. Estos contribuyen entre un 33,3% a 40,2% del total de capacidad antioxidante en vinos, seguidos por los ácidos fenólicos los que contribuyen entre un 6,41% a 20,8% y por último los flavonoles, los cuales a pesar de presentar una elevada actividad antioxidantes, no se presentan en suficientes cantidades en el vino para ser considerados determinantes de su actividad antioxidante (Kerry *et al.*, 1997; Maxwell *et al.*, 1997; Ghiselli *et al.*, 1998; Gardner *et al.*, 1999 y Fernández-Pachón *et al.*, 2004).

## CONCLUSIONES

A través de los análisis químicos se comprobó que los vinagres obtenidos de vino blanco y de vino tinto alcanzaron los niveles exigidos por la ley de alcoholes 18.455 para ser denominados como tal, un valor de alcohol no superior al 1% v/v y un mínimo de 40g/L de ácido acético.

Mediante la elaboración de curvas de crecimiento se logró encontrar las condiciones de acetificación que promueven la imposición de *Acetobacter cerevisiae* 209 durante la elaboración de vinagre. Estas son una concentración de etanol de 10% v/v y concentraciones de SO<sub>2</sub> inferiores a 25ppm, ya que concentraciones superiores inhiben su crecimiento.

Mediante pruebas moleculares, principalmente el análisis del gen ribosomal 16S rRNA y de la zona intergénica entre los genes 16S y 23S rRNA, se pudo corroborar la presencia e identidad de la cepa *Acetobacter cerevisiae* 209 y por consiguiente que fue esta quién realizó el proceso de acetificación tanto en el vinagre de vino blanco como en el vinagre de vino tinto. Por lo tanto estas herramientas moleculares son rápidas y sencillas para poder trazar bacterias acéticas durante el proceso de acetificación.

En ambos vinagres, las concentraciones de fenoles totales, taninos totales y antocianos totales disminuyeron significativamente durante el proceso de acetificación. También lo hicieron los fenoles de bajo peso molecular, principalmente los flavanoles, como la catequina y la epicatequina y los ácidos fenólicos (particularmente los ácidos hidroxibenzoicos). Esta disminución puede deberse a la acción de algunas enzimas microbianas presentes en *Acetobacter cerevisiae*. Esta reducción de compuestos fenólicos determinó que la capacidad antioxidante del vinagre disminuyera luego de la acetificación con relación al vino utilizado para este proceso. Por lo tanto, estos resultados aprueban la hipótesis planteada

**BIBLIOGRAFIA CITADA**

ALTIERI, C.; SPERANZA, B.; CARDILLO, D.; SINIGAGLIA, M. 2007. Survival of planktonic and sessile *Acetobacter cerevesiae*. International Journal of Food Science and Tecgnology. Doi: 10.1111/j.1365-2621.2006.01476.x.

ARUNACHALAM, M.; MOHAN, N.; SUGADEV, R.; CHELLAPPAN, P.; MAHADEVAN, A. 2003. Degradation of (+)-catechin by *Acinetobacter calcoaceticus* MTC 127. Biochimica et Biophysica 1621: 261-265.

ÁVILA, M.; HIDALGO, M.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; PELAÉZ, C.; REQUENA, T.; PASCUAL-TERESA, S. 2009. Bioconversion of anthocyanin glycosides by *Bifidobacteria* and lactobacillus. Food Research International 42: 1453-1461.

BARJA, F.; MESA, M.; MACÍAS, M.; BERMUDEZ, I.; CANTERO, D.; LOPEZ, J. 2003. Aspectos bioquímicos, moleculares y morfológicos de las bacterias acéticas. Pp 17-20. *In*: Mas, A. (Ed.). Primeras Jornadas de I + d + i en la Elaboración de Vinagres de Vino. Tarragona, España, Octubre 2003. Edició de la Facultat d'Enologia de Tarragona. España. 92p.

BENÍTEZ, P.; CASTRO, R.; NATERA, R.; GRACÍAS-BARROSO, C. 2006. Changes in the poliphenolics and volatile content of “Fino” sherry wine exposed to high temperature and ultraviolet and visible radiation. European Food Research and Technology 222: 302-309.

BORDEAU, E. y SCARPA, J. 1998. Análisis Químico del vino. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 253p.

CARRASCOSA, A.; MUÑOZ, R.; GONZÁLEZ, R. 2005. Microbiología del vino. Ediciones A. Madrid Vicente, España. 398p.

CARBO, R.; ALMAJANO, M. P.; ACHAERANDIO, I.; LOPEZ, F. 2006. Capacidad antioxidante y antimicrobiana en vinagres comerciales. Pp: 247-255. *In*: García, I. (ed).

Segundas jornadas de I+D+I en la elaboración de vinagres. Córdoba, España, Abrol 2006. Servicio de publicaciones universidad de Córdoba. 295 p.

CEREZO, A.B.; TESFAYE, W.; TORIJA, M.J.; MATEO, E.; GARCÍA-PARILLA, M.C.; TRONCOSO, A. M. 2008. The phenolic composition of red wine vinegar produced in barrels made from different woods. *Food Chemistry* 109: 606-615.

CEREZO, A.B.; CUEVAS, E.; WINTERHALTER, P.; GARCÍA-PARILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. 2010. Anthocyanin composition in Cabernet sauvignon red wine vinegar obtained by submerged acetification. *Food Research International* 43: 1577-1584.

CLEENWERCK, I.; VANDEMEULEBROECKE, K.; JANSSENS, D.; SWINGS, J. 2002. Re-examination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* sp. nov. And *Acetobacter malorum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52: 1551-1558.

CONTRERAS-DOMÍNGUEZ, M.; GUYOT, S.; MARNET, N.; PETIT, J.; PERRAUD-GAIME, I.; ROUSSOS, S.; AUGUR, C. 2006. Degradation of procyanidins by *Aspergillus fumigatus*: Identification of a novel aromatic ring cleavage product. *Biochemistry* 88: 844-848.

DAVALOS, A.; BARTOLOME, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. 2005. Antioxidant properties of comercial grape juices and vinegars. *Food Chemistry*, 93: 325-330.

DRYSDALE, G.S.; FLEET, G.H. 1988. Acetic acid bacteria in Winemaking: A Review. *American Journal of Enology and Vitiviculture* 39: 143-154.

FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; VILLANO, D.; GARCÍA-PARILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M. 2004. Antioxidant activity of wine and relation with their polyphenolic composition. *Anal Chim Acta* 513: 113-118.

FOGLIANO, V.; VERDE, V.; RANDAZZO, G.; RITIENE, A. 1999. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 1035-1040.

FLANZY, C. 2000. "Enología". Fundamentos científicos y tecnológicos. Ed. Mundi Prensa. Madrid, España. 783p.

FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; TEISSEDRE, P. L. 1995. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-Density Lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 890-894.

GALVEZ, M. C.; BARROSO, C. G.; PEREZ-BUSTAMANTE, J. A. 1994. Analysis of phenolic compound of different vinegar samples. *Z. Lebensm. Unters. Forsh* 199: 29-31.

GARCIA-PARILLA, M. C.; GONZALES, G. A.; HEREDIA, F. J.; TRONCOSO, A. M. 1997. Differentiation of wine vinegars base don phenolic composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 3487-3492.

GARDNER, P. T.; MCPHAIL, D. B.; CROZIER, A.; DUTHIE, G. G. 1999. Electron spin resonance (ESR) spectroscopic assesment of the contribution of quercetin and other flavonols to the antioxidant capacity of red wines. *Journal Science Food Agricultural*, 79: 1011-1014.

GESTER, H. 1995. B-Carotene, vitamin E and vitamin C in different stage of experimental carcinogénesis. *Eur J Clin Nutr.* 49: 155-168.

GUILLAMÓN, J.M.; GONZÁLEZ, A.; HIERRO, N.; ROZÉS, N.; MAS, A.; POBLET, M. 2003. Técnicas de identificación de bacterias acéticas. p 9-15, *In: Mas, A. (Ed.). Primeras Jornadas de I + d + i en la Elaboración de Vinagres de Vino.* Tarragona, España, Octubre 2003. Edició de la Facultat d'Enologia de Tarragona. España. 92p.

GUISELLI, A.; SERAFINE, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. 2000. Total antioxidant capacity is a tool to asses redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine.* 29(11): 1106-1114.

GHISELLI, A.; NARDINI, M.; BALDI, A.; SCACCINI, C. 1998. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(2): 361-367.

GUZMAN, M. 1998. Vinagre: Características, atributos y control de calidad. Editorial Díaz de santos, S.A., Madrid, España. 133p.

HIDALGO, C. 2008. Estudio Comparativo de la imposición de una cepa inoculada de *Acetobacter pasteurianus* para la elaboración de vinagre de vino por método superficial y sumergido. Trabajo de investigación para el Master en Enología. Universitat Rovira i Virgili. Departament de Bioquímica i Biotecnologia. Facultat d'Enologia. España. 26p.

HIDALGO, C.; VEGAS, C.; MATEO, E.; TEFAYE, W.; CEREZO, A.B.; CALLEJÓN, R.M.; POBLET, M.; GUILLAMÓN, J.M.; MAS, A.; TORIJA, M.J.2010. Effect of barrel desing and the inoculation of *Acetobacter pasteurianus* in wine vinegar production. International Journal of food Microbiology 141: 56-62.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J.; PRIOR, R. 2002. High-throughput assay of oxigen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate flourescence reader in 96-well format. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50: 4437-4444.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. 2005. The chemistry behing antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 1841-1856.

JAMPOL, L. M; FERRIS, F. L. 2001. Antioxidants and zinc to prevent progression of age-related macular degeneration. Journal American Medicine Association. 286(19): 2466-2468

JARA, C. 2009. Desarrollo de métodos de biología molecular para el análisis directo de bacterias acéticas e vinagre. Tesis Doctoral. Universitat Rovira i Virgili. Departament de Bioquímica i Biotecnologia. Facultat d'Enologia. España. 185p.

JENSEN, M. A.; GONZÁLES, N.; HIERRO, N.; RIZÉS,N.; MAS, A.; POBLET, M. 2003. Técnicas de identificación de bacterias acéticas: 9-15. In: Mas, A (ed). Primeras Jornadas de I+D+i en la elaboración de Vinagres de vino. Tarragona, España, Octubnre 2003. Edició de la Facultat d'Enologia de Tarragona. Universitat Rovira i Virgili. Tarragona, España.92p.

KERRY, N. L.; ABBEY, M. 1997. Red wine and fractionated phenolic compound prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis*, 135: 93-102.

LLAGUNO, C. y POLO, MC. 1991. El vinagre de vino. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España. 238p.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. 2003. Brock Biología de los Microorganismos. 10ª Edición, Madrid. 1011p.

MATSUDA, M.; OTSUDA, Y.; JIN, S.; WASAKY, J.; WATANABE, J.; WATANABE, T.; OSAKI, M. 2008 Biotransformation of (+)-catechin into taxifolin by a two –step oxidation: Primary stage of (+)-catechin metabolism by a novel (+)-catechin-degrading bacteria, *Burkholderia* sp. KTC-1, isolated from tropical peat. *Biochemical and Biophysical research Communications* 366: 414-419.

MAXWELL, S. R. J. 1997. Wine antioxidants and their impact on antioxidant function in vivo. *ACS Symposium Series*, 661: 150-165.

MESA, M.; MACIAS, M.; CANTERO, D. 2003. Diseño de acetificadores para producción de vinagres de calidad. Pp 77-85, *In: Mas, A. (Ed.). Primeras Jornadas de I+d+i en la Elaboración de Vinagres de Vino. Tarragona, España, Octubre 2003. Edición de la Facultat d'Enologia de Tarragona. España. 92p.*

MINAGRI, CHILE 1985 Ley N° 18.455, Fija normas sobre producción, elaboración, y comercialización de alcoholes etílicos, bebidas alcohólicas y vinagres. Diario oficial de la República de Chile N° 32.318. Disponible en: <http://www.sag.cl/common/asp/pagAtachadorVisualizador.asp?argCryptedData=GP1TkTXdhRJS2Wp3v88hBm9NI6W3Ajkml9EkwRPIU%3D&argModo=&argOrigen=BD&argFlagYaGrabados=&argArchivoId=27755>. Leído el 11 de Noviembre de 2011.

MONAGAS, M.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. 2005. Evolution of polyphenols in red wine from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. II Non-anthocyanin phenolic compounds. *European Food Research Technology*. 220: 331-340.

MONAGAS, M.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. 2006. Evolution of the phenolic content of red wine from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. *Food Chemistry*, 95: 405-412.

MORALES, M.; BENITEZ, B.; TRONCOSO, A. 2003. El vinagre de vino: Análisis de sus compuestos volátiles y su evolución durante la acetificación y el envejecimiento. Pp 31-38, *In: Mas, A. (Ed.). Primeras Jornadas de I + d + i en la Elaboración de Vinagres de Vino. Tarragona, España, Octubre 2003. Edició de la Facultat d'Enologia de Tarragona. España. 92p.*

OBREQUE, E. 2003. Efecto de la microoxigenación sobre las características de un vino Cabernet Sauvignon. Memoria Ing. Agro., Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 84p.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, R. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent. *Journal of Agricultural and food Chemistry* 49: 4619- 4626.

PAIXAO, N.; PERESTRELO, R.; MARQUES, J.C.; CAMARA, S. 2007. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines. *Food Chemistry*, 105: 204-214.

PEÑA, A. 1998. Contribución al conocimiento del origen de problemas sensoriales en vinos. Su relación con los compuestos fenólicos y la presencia de compuestos organoclorados. Tesis Dr. Ingeniero Agrónomo Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos , Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España. 345p.

PEÑA, A. 1999. Polifenoles del vino. P. 1-14. *In: Seminario internacional de Microbiología y Polifenoles del vino. Universidad de Chile. Departamento de Agroindustria y Enología. 59p.*

PRIETO, C.; JARA, C.; MAS, A.; ROMERO, J. 2007. Application of molecular methods for analysing the distribution and diversity of acetic bacteria in Chilean vineyards. *Food Microbiology*, 115: 348-345.



PUJOLÁ, M.; CARBÓ, R.; SANTOS, D.; SÁNCHEZ, S.; DE CASTRO, J. 2003. Estudio de la calidad de los vinagres vínicos comerciales. Pp 45-52, *In*: Mas, A. (Ed.). Primeras Jornadas de I + d + i en la Elaboración de Vinagres de Vino. Tarragona, España, Octubre 2003. Edició de la Facultat d'Enologia de Tarragona. España. 92p.

QUINTERO, Y.; POBLET, M.; GUILLAMÓN, J. M.; MAS, A. 2009. Quantification of the expression of reference and alcohol dehydrogenase genes of some acetic acid bacteria in different growth conditions. *Journal of Applied Microbiology* 106:666-674.

QUINTERO, Y. 2010. Análisis de la expresión génica del metabolismo oxidativo del etanol como indicador de la recuperación de cepas para la elaboración de vinagres. Tesis Doctoral. Universitat Rovira i Virgili. Departament de Bioquímica i Biotecnologia. Facultat d'Enologia. España. 185p.

RIBÉREAU- GAYON, P.; GLORIES, Y.; MAUJEAN, A.; DUBOURDIEU, D. 2000. Handbook of Enology. Volume 2: The chemistry of wine stabilization and treatments. England: John & Sons Ltda. P. 129-137; 353-385.

RIVAS-GONZALO, J.; SANTOS-BUELGA, C.; LOOK, O. 2003. Pp: 26-70. *In*: Muñoz, O. (ed). Antocianos y Betalaínas, Colorantes naturales de Aplicación Industrial. Santiago, Chile, Noviembre 2003. Santiago, Chile.

ROOPESH, K.; GUYOT, S.; SABU, A.; HARIDAS, M.; GAIME, P.; ROUSSOS, S.; AUGUR, C. 2010. Biotransformation of procyanidins by a purified fungal dioxygenase: Identification and characterization of the products using mass spectrometry. *Biochemistry* 45: 904-913

ROMERO, J.; GARCÍA-VARELA, M.; LACLETTE, J.; ESPEJO, R. 2002. Bacteria clustering with *Arcobacter* spp. Constitute an abundant and common component of the oyster microflora (*Tiostrea chilensis*). *Microbial Ecology* 44: 365-371.

RUIZ, A.; POBLETE, M.; MAS, A.; GUILLAMÓN, J. M. 2000. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1981-1987.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. 2002. LDL oxidizability indexes in measurement of antioxidant activity in selected Spanish wines. *Nutr. Res.* 22: 507-517.

SCHWARZ, M.; WABNITZ, T. C.; WINTERHALTER, P. 2003. Pathway leading to the formation of anthocyanin-vinylphenol adducts and related pigments in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51: 3682-3687.

SILVA, P. 2006. Elaboracion de Vinagre tipo Balsámico utilizando ecotipos de Tunas (*Opuntia ficus-indica* (L) Mill) de colores. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile.36p.

SOKOLLEK, S.J.; HERTEL, C.; HAMMES, W.P. 1998. Cultivation and preservation of vinegar bacteria. *Journal of Biotechnology* 60: 195-206.

TESTAFAYE, W.; MORALES, M.L.; GARCIA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. 2002. Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science and Technology*, 13: 12-21.

TESTAFAYE, W.; MORALES, M.L.; GARCIA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. 2003. Optimising wine vinegar production: fermentation and ageing. *Applied Biotechnology, Food Science and Policy*, 1(2).

URQUIAGA, I. 2002. Polifenoles del vino. *Medwave* 2002 Nov;2(10) doi: 10.5867/medwave.2002.10.3321.

VEGAS, C. 2007. Estudio de la dinámica poblacional de bacterias acéticas en la producción de vinagre por el método tradicional. Diploma de estudios Avanzados (DEA). Universitat Rovira i Virgili. Departament de Bioquímica i Biotecnologia. Facultat d'Enologia. España. 39.

VERZELLONI, E.; TAGLIAZUCCI, D.; CONTE, A. 2007. Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsamic vinegar. *Food Chemistry*, 105: 564-571.

VINSON, J. A.; HONTZ, B. A. 1995. Phenol Antioxidant Index: Comparative antioxidant effectiveness of red and White Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 401-403.

YAMADA, Y.; YUKPHAN, P. 2008. Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 125: 15-24.

ZOECKLEIN, B.; FUGELSANG, K.; GUMP, B.; NURY, F. 2001. *Análisis y producción de vino*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 613p.

ZAFRILLA, P.; MORILLAS, J.; MULERO, J.; CAYUELA, J.; MARTÍNEZ.CACHÁ, A.; PARDO, F.; LÓPEZ-NICOLÁS, J. M. 2003. Changes during storage in conventional and ecological wine: phenolic content and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4694-4700.

ZAMORA, F. 2003. *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.225p.