

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



ESTUDIO DEL EFECTO DEL USO DE UN BIOFILM MICROBIANO (“MADRE DE VINAGRE”) EN EL PROCESO DE ACETIFICACIÓN DE VINO DE MANZANA A VINAGRE DE MANZANA SOBRE LOS POLIFENOLES TOTALES Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL SUSTRATO

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título profesional de Biotecnólogo.

MARCO ANTONIO RAIMIL CARVAJAL

TEMUCO – CHILE

2012

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



ESTUDIO DEL EFECTO DEL USO DE UN BIOFILM MICROBIANO (“MADRE DE VINAGRE”) EN EL PROCESO DE ACETIFICACIÓN DE VINO DE MANZANA A VINAGRE DE MANZANA SOBRE LOS POLIFENOLES TOTALES Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL SUSTRATO

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título profesional de Biotecnólogo.

MARCO ANTONIO RAIMIL CARVAJAL
PROFESOR GUÍA: DR. ERICK SCHEUERMANN SALINAS
PROFESOR COGUÍA: DRA. MARIBEL PARADA IBAÑEZ

TEMUCO – CHILE

2012

ESTUDIO DEL EFECTO DEL USO DE UN BIOFILM MICROBIANO (“MADRE DE VINAGRE”) EN EL PROCESO DE ACETIFICACIÓN DE VINO DE MANZANA A VINAGRE DE MANZANA SOBRE POLIFENOLES LOS TOTALES Y LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL SUSTRATO

PROFESOR GUIA

: ERICK SCHEUERMANN SALINAS

Dr. Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Departamento de Ingeniería Química
Universidad de La Frontera

PROFESOR COGUIA

: MARIBEL PARADA IBAÑEZ

Dra. En Biología Molecular y Celular
Departamento de Ciencias
Agropecuarias y Recurso Naturales
Universidad de La Frontera

Calificación PROMEDIO TESIS

ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1.	INTRODUCCION	1
2.	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1	El vinagre	3
2.1.1	Vinagre de manzana	3
2.1.2	Madre de Vinagre	4
2.2	Bacterias acéticas	4
2.3	Polifenoles y su acción antioxidante	8
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1	Materiales	11
3.1.1	Material vegetal	11
3.1.2	Reactivos y medios de cultivo	11
3.1.3	Material de laboratorio	11
3.1.4	Equipo e instrumentos	12
3.2	Metodología	13
3.2.1	Ubicación del lugar de trabajo	13
3.2.2	Diseño experimental	13
3.2.3	Métodos analíticos	14
3.2.3.1	Preparación del extracto	14
3.2.3.2	Determinación de contenido de polifenoles totales	15
3.2.3.3	Determinación de capacidad antioxidante	15
3.2.3.4	Análisis de acides titulable	16
3.2.3.5	Determinación de pH	16
3.2.4	Procedimientos microbiológicos	17
3.2.5.	Análisis estadístico	18

4.	PRESENTACION Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	19
4.1.	Polifenoles totales y capacidad antioxidante	18
4.2	Acidez titulable	22
4.3	pH	26
4.4	Análisis Microbiológico	28
4.4.1.	Caracterización del biofilm	28
4.5.	Identificación y determinación de pureza	30
5.	CONCLUSIONES	34
6.	RESUMEN	35
7.	SUMMARY	36
8.	BIBLIOGRAFIA	37
9.	ANEXOS	44

1. INTRODUCCIÓN

Diversos estudios han demostrado que los polifenoles presentan actividad antioxidante, molusquicidas, antihelmíntica, hepatoprotectora, antiinflamatorias, antidiarreicas, anti ulcerosas, antivirales, antialérgicas y vasodilatadoras (Proestos *et al.*, 2005). Junto con la capacidad de reducir las enfermedades cardiovasculares, el aumento del colesterol LDL, degradación del ADN, entre otros daños para el cuerpo, provocados por los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Callejón, 2006).

Por lo que las recomendaciones de incluir compuestos polifenólicos en la dieta han ido en aumento al igual que el consumo de estos. Existe una amplia variedad de productos ricos en estos compuestos y entre ellos se ha descrito que los vinagres (de manzana y balsámico) son ricos en antioxidantes (Gullo y Giudici, 2008).

El vinagre es un líquido apto para el consumo humano resultante de la doble fermentación, alcohólica y acética de productos de origen agrario que contienen azúcares o sustancias amiláceas, con una riqueza mínima de 50 g/L. Este proceso ocurre gracias a las bacterias de ácido acético (AAB) donde encontramos principalmente los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter* que son las encargadas de producir el proceso denominado acetificación (Gava, 1979).

Se ha demostrado que tanto el vino y el vinagre (de manzana principalmente) contienen una amplia gama de compuestos polifenólicos con una importante capacidad antioxidante, de ambos el vino posee una mayor capacidad antioxidante que el vinagre. En Chile la producción y los procesos asociados al vino están bien estudiados, pero no así los procesos involucrados en la producción de vinagres y menos en la de vinagre de manzana donde se cree que las AAB tienen un efecto positivo en su producción (Úbeda *et al.*, 2011).

Como hipótesis para este estudio se planteó, que el proceso de acetificación, del vino de manzana a vinagre de manzana afecta la concentración de los polifenólicos antioxidantes y estos cambios se podrían relacionar con la presencia de los microorganismos involucrados.

Como objetivo general se planteó:

- Estudiar el efecto del proceso de acetificación del vino de manzana a vinagre sobre los compuestos polifenólicos y la actividad antioxidante del sustrato y analizar la participación de los microorganismos en la transformación.

Y como objetivos específicos se planteó lo siguiente

- Establecer la relación entre la acetificación y la concentración de los compuestos polifenoles antioxidantes en el proceso de transformación de vino de manzana a vinagre.
- Caracterizar el proceso de acetificación de vino de manzana a vinagre en términos microbiológicos con el propósito de relacionarlos con los cambios de la concentración de los compuestos polifenólicos antioxidantes en el sustrato.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Vinagre

Según el Ministerio de Salud de Chile (2011), la designación de "vinagre" o "vinagre de vino" corresponde al producto de la fermentación acética del vino, y para que cumpla esa condición deberá cumplir con varias características tales como; líquido de color, olor y sabor propios de su naturaleza, puro, sin presentar hongos y levaduras, ni otras alteraciones; su contenido de alcohol no debe sobrepasar el 1% en volumen y su acidez total, expresada en ácido acético, debe ser como mínimo 5%; deberá contener como mínimo 10 g/L de extracto seco, una acidez fija expresada en tartrato ácido de potasio, de 5 g/L y cenizas totales de 1 g/L.

Para los vinagres que no procedan de vino (alcohol, azúcares, hidromiel, zumos de frutas, cerveza, malta, sidra, suero lácteo u otros) corresponderán a la composición normal de sus materias de origen y su acidez total, expresada en ácido acético, no será inferior a 4%. Por otra parte la FAO y la OMS, el vinagre es un líquido apto para el consumo humano, que es producido a partir de materias primas de origen agrícola, que contengan almidones y/o azúcares, por un doble proceso de fermentación, alcohólica y acética (FAO/OMS, 1982). Por ende cualquier sustrato azucarado o amiláceo puede ser utilizado en la elaboración de vinagres. Asimismo los métodos de elaboración serán diferentes. Por tanto, los vinagres se pueden clasificar en función del tipo de sustrato empleado o del método usado en su elaboración (Callejón, 2006).

2.1.1. Vinagre de manzana: Al vinagre de sidra se le denomina a veces como vinagre de manzana, es muy empleado en las cocinas de los países del norte de Europa. Su elaboración parte de la fermentación alcohólica de la manzana en sidra seguida de una acetificación. El empleo de este vinagre es muy adecuado para las ensaladas y las vinagretas (Hellmiss, 1998).

El vinagre de manzana posee cualidades tanto culinarias, como medicinales. Nishidai *et al.* (2000) y Nishino *et al.* (2005) quienes empíricamente observaron el efecto beneficioso sobre el cáncer. Leeman *et al.* (2005) estudiaron el efecto del vinagre de manzana sobre la diabetes.

Estudios más recientes de Úbeda *et al.*, (2011) muestran resultados interesantes sobre la capacidad antioxidante del vinagre de manzana que presenta 8.986 ORAC expresado en $\mu\text{mol TE/kg}$ y un índice de polifenoles totales (IPT) de 343 expresado como mg de ácido gálico/kg. Sakanaka e Ishihara (2008) utilizaron el vinagre de manzana para inhibir la oxidación lipídica eficazmente en los homogeneizados de atún.

2.1.2. Madre del vinagre: En el año 1864 Pasteur publicó una amplia memoria sobre la fermentación acética “Etudes sur le vinaigre, sa fabrication, ses maladies, mohines de les prevenir” que recoge la conferencia que pronunció en Orleans en 1867. Pasteur afirma que siempre que el vino se transforma en vinagre, es debido a la acción de un velo de *Micoderma aceti* desarrollado en su superficie que se le denomina madre de vinagre o biofilm (Callejón, 2006).

Los microorganismos procariontes y eucariontes, tienen una fuerte capacidad para unirse a las superficies. Una vez que la fijación microbiana se ha producido, la formación de una comunidad microbiana compleja, dinámica y adherente, llamada biofilms comienza a crecer (Brugnoni, *et al.*, 2006). En particular, los microorganismos cuando se encuentran formando un biofilm son mucho más resistentes a los agentes antimicrobianos, que los microorganismos cuando se encuentran aislados (Ramage *et al.*, 2002).

2.2. Bacterias acéticas

Las bacterias acéticas fueron observadas por primera vez al microscopio por Kützing en 1837. Estas bacterias constituyen un grupo ecológico que comprende bacterias Gram-negativas (Gram-positivas en cultivos viejos), aerobias estrictas y muy sensibles al SO_2 . Son catalasa positiva y

oxidasa negativa, pueden presentar pigmentación en cultivos sólidos y producir diferentes tipos de polisacáridos (de Ley *et al.*, 1984).

Al microscopio óptico las bacterias acéticas se presentan como pequeñas células cilíndricas, frecuentemente en parejas cocobacilares cortos y algo gruesos, alineados o en cadenas, y a menudo agrupadas en forma de ocho. Constituyen un grupo de morfología variable, que se presentan en forma elipsoidal o de bastoncillos (Suárez e Iñigo, 1990).

Las bacterias acéticas crecen en medios azucarados y alcoholizados, ligeramente ácidos como flores, frutas, cerveza, vino, sidra, vinagre, zumos de fruta agrios y miel. En estos sustratos, las bacterias acéticas oxidan los azúcares y los alcoholes, produciendo una acumulación de ácidos orgánicos como producto final. Cuando el sustrato es etanol, producen ácido acético, lo que ha originado el nombre que reciben. La oxidación del etanol tiene lugar en dos pasos. En el primero, el etanol es oxidado a acetaldehído y en el segundo el acetaldehído es oxidado a acetato. En ambas reacciones, los electrones son transferidos y el último aceptor es el oxígeno (Figura 1). Esta oxidación de etanol a ácido acético es la característica mejor conocida de las bacterias acéticas, pero estas también pueden oxidar la glucosa a ácido glucónico, entre otras. Algunas de estas transformaciones resultan interesantes desde el punto de vista de la biotecnología (Giudici *et al.*, 2006).

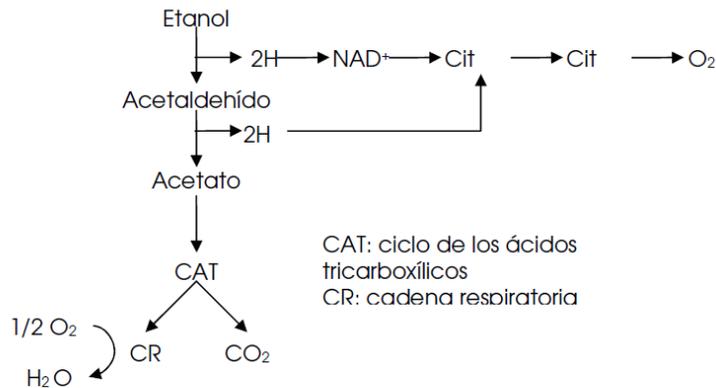


Figura 1. Proceso de oxidación del etanol (Callejón, 2006)

Hasta hace poco, la clasificación de las especies bacterianas se basaba en criterios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos. Estas características fenotípicas también se han utilizado para asignar los aislamientos de los géneros específicos y especies. Las características más generales utilizados para la clasificación fenotípica de las bacterias del ácido acético incluyen la morfología celular de las colonias, la tinción Gram, la catalasa y la actividad oxidasa entre otras. Como lo resume Cleenwerck y de Vos (2008), otras pruebas que han sido útiles para la identificación de las bacterias del ácido acético y hasta para la diferenciación de géneros y especies son los siguientes: (1) la producción de ácido acético a partir del etanol, (2) sobre oxidación de lactato y acetato a dióxido de carbono y agua, (3) el crecimiento en presencia de 0,35% de ácido acético, (4) el crecimiento en ácido nítrico al 1%, (5) la formación de 2-ketogluconic, 5-ketogluconic, y ácido 2, 5-ketogluconic de glucosa, (6) cetogénesis de glicerol, (7) el crecimiento de diferentes fuentes de carbono (por ejemplo, metanol), (8) formación de pigmentos marrones solubles en agua; (9) formación de g-pironas desde glucosa o fructosa (10) la producción de ácidos a partir de azúcares; (11) la producción de celulosa, (12) el crecimiento en glucosa al 30%, (13) presencia y posición de los flagelos, y motilidad (14). Estas características pueden ser utilizadas para discriminar entre los diferentes géneros y especies de bacterias del ácido acético. Muchas de las pruebas dan resultados variables entre diferentes especies e incluso entre diferentes cepas de la misma especie. Esto complica el proceso de identificación de manera significativa y hace necesario el uso de un mayor número de muestras.

Una buena alternativa a la identificación basada en características fenotípicas es el uso de criterios genotípicos y moleculares. Los avances en genética y biología molecular han permitido que el polimorfismo y la variabilidad de ciertas moléculas, principalmente de ADN, se utilice para la caracterización taxonómica e identificación. Como resultado, ha habido un marcado incremento en la identificación del número de géneros y especies de bacterias del ácido acético en los últimos años, a través del uso de técnicas moleculares como la hibridación DNA/DNA y la secuenciación de genes ribosomales. Sin embargo, a pesar de su eficacia para la clasificación de las especies bacterianas, estas técnicas no son apropiadas para el uso habitual y son demasiado complejas para ser aplicadas al tratamiento de un gran número de muestras (Guillamón y Mas, 2011)

Una de las primeras técnicas utilizadas en la taxonomía bacteriana fue el análisis del porcentaje de pares de bases GC. El contenido de GC ya se había incluido para las especies de Acetobacteraceae en el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática (de Ley *et al.*, 1984). Sin embargo, el contenido de GC no es suficiente para la identificación de un aislado, además, este criterio se utiliza junto con la hibridación DNA/DNA y diversas características morfológicas y fisiológicas para la clasificación de nuevas especies, estas constituyen la base de la denominada taxonomía polifásica (Cleenwerck y de Vos, 2008).

La secuenciación es uno de los métodos propuestos para la identificación de bacterias de ácido acético y generalmente envuelve genes ribosomales o de la región entre 16S y 23S de los genes ribosomales (Yamada y Yukphan, 2008). Este último consiste en regiones intergénicas conocido como espaciadores internos transcritos (ITS), que luego son eliminados de la molécula final del ARN ribosomal (Cleenwerck y de Vos, 2008).

El primer método consiste en el análisis por restricción del gen ribosomal 16S seguida por una amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando un protocolo conocido como 16S-ARDRA (Poblet *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2000).

Del mismo modo, sondas específicas se han diseñado para el uso en PCR Real-Time (sondas TaqMan) para las especies más comunes que se encuentran en las uvas, el vino y el vinagre (Torija *et al.*, 2009).

Por último, la Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE) y el Gradiente de Temperatura de Electroforesis en Gel (TGGE) se pueden utilizar en combinación con la PCR para separar los fragmentos amplificados del gen 16S de acuerdo a diferencias en las secuencias pequeñas. Esta técnica se ha utilizado con éxito para la identificación de las bacterias del ácido acético en el vino (López *et al.*, 2002; Andorra *et al.*, 2008) y vinagres (de Vero *et al.*, 2006; Haruta *et al.*, 2006; Ilabaca *et al.*, 2008; Gullo *et al.*, 2009).

2.3. Polifenoles y su acción antioxidante

Los compuestos fenólicos (Figura 2) son sustancias orgánicas ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Se sintetizan como metabolitos secundarios con funciones de defensa, y son en gran medida responsables de las propiedades del color, la astringencia y el flavor (sabor y aroma) de los vegetales. Se encuentran en las verduras y frutas, y en productos derivados como el vino o la cerveza. Todos tienen en su estructura uno o más anillos aromáticos con al menos un sustituyente hidroxilo. Su estructura química es propicia para secuestrar radicales libres, debido a la facilidad con la que el átomo de hidrógeno desde el grupo hidroxilo aromático puede ser donado a la especie radical, y a la estabilidad de la estructura quinona resultante que soporta un electrón desapareado. La actividad antioxidante de los polifenoles depende del número y la localización de los grupos hidroxilo que contiene en su estructura (Pannala *et al.*, 2001).

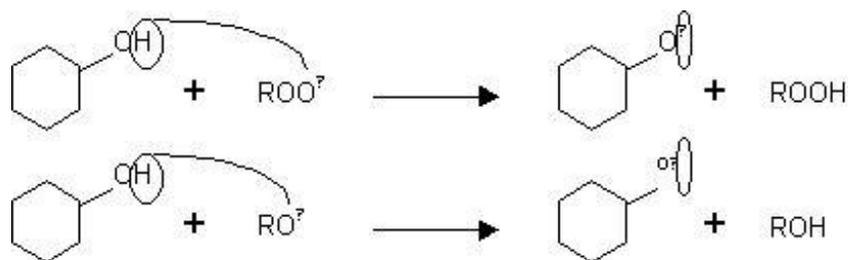


Figura 2. Estructura básica de fenoles y su acción antioxidante (Fernández-Pachón *et al.*, 2006)

Los polifenoles poseen acciones molusquicidas, antihelmínticas, antihepatotóxicas, antiinflamatorias, antidiarreicas, antiúlceras, antivirales, antialérgicas y vasodilatadoras. Se ha verificado que inhiben la replicación del virus de la inmunodeficiencia Humana (HIV) y del virus simplex humano (HSV), inhiben las glucosil transferasas del *Streptococcus mutans* (caries dental), inhiben la autoxidación del ascorbato, también inhiben efectos citotóxicos, la promoción del crecimiento tumoral y la enzima xantina mono-amina oxidasa. La actividad antioxidante de los fenoles es el origen de funciones biológicas tales como la antimutagénica, anticancerígena y antienvjecimiento (Velioglu *et al.*, 1998; Proestos *et al.*, 2005).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son especies químicas radicales y no radicales que debido a su inestabilidad se comportan como agentes oxidantes. Las ROS pueden tener en nuestro organismo un origen endógeno relacionado con el metabolismo del oxígeno y con distintas reacciones de defensa de nuestro sistema inmunológico. También pueden provenir de fuentes externas: el tabaco, la contaminación del aire, la radiación ultravioleta y la de alta energía, el ozono o ciertos medicamentos. El organismo dispone de mecanismos de defensa antioxidante frente a las especies reactivas de oxígeno, que comprenden sistemas enzimáticos y no enzimáticos. Ciertas enzimas como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa o glutatión reductasa, neutralizan las especies reactivas. Los sistemas defensivos no enzimáticos abarcan una serie de compuestos antioxidantes como albúmina, ceruloplasmina, transferrina, glutatión, bilirrubina, ácido úrico, ubiquinona o melatonina. En ciertas situaciones extremas, estas defensas no son suficientes y las especies reactivas producen daño oxidativo, tanto en biomoléculas como en componentes celulares (Fernández-Pachón *et al.*, 2006).

En sistemas biológicos, la oxidación de lípidos puede producir compuestos tóxicos e iniciar otras reacciones perjudiciales. Los compuestos fenólicos pueden actuar como antioxidantes potenciales por muchos vías, absorbiendo radicales libres, radicales de oxígeno y como quelante de iones metálicos (Halliwell *et al.*, 1995). Por lo tanto, el consumo de antioxidantes proveniente de origen natural, tales como frutas, verduras, té o vino, también atenúan el daño causado por agentes oxidativos. Los compuestos polifenólicos, abundantes en estas fuentes nutricionales, podría desempeñar un papel importante en la mejora del sistema antioxidante, ya que se comportan como carroñeros ROS, quelantes de metales y moduladores enzimáticos (Rodrigo y Bosco, 2005).

Un aumento en la ingesta de antioxidantes fenólicos naturales se correlaciona con una reducción de las enfermedades coronarias. Dietas ricas en compuestos fenólicos se asocian con mayores expectativas de vida. Estas propiedades incluyen actividad anti-cáncer, antiviral, antiinflamatoria, efectos sobre la fragilidad capilar, y habilidad para inhibir la agregación de las plaquetas humanas. Estos compuestos pueden moderar la peroxidación de los lípidos involucrados en la aterogénesis, en la trombosis y en la carcinogénesis. Entre sus propiedades

conocidas se incluyen la captura de radicales libres, fuerte actividad antioxidante, inhibición de las enzimas hidrolíticas y oxidativas (fosfolipasa A2, ci-cloxygenasa, lipoxigenasa) y acción antiinflamatoria (Paladino 2006).

Los flavonoides son la clase predominante de los fenoles presentes en los alimentos, porque son aproximadamente 2/3 de los fenoles consumidos en la dieta humana. Los taninos también son una fuente importante de antioxidantes. Debido a su presencia ubicua en los alimentos de origen vegetal, los humanos consumen compuestos fenólicos a diario. El rango de consumo es de 25 mg a 1g por día dependiendo del tipo de dieta (frutas, vegetales, granos, té, especias) (Paladino 2006).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Material vegetal

- Vino de manzana comercial
- Biofilm microbiano o “madre de vinagre” proporcionado por empresa regional

3.1.2. Reactivos y medios de cultivo

- Metanol, Merck
- Folin-Ciocalteu, Merck
- Agua destilada
- Peptona, Winkler
- Glucosa, Winkler
- Agar, Winkler
- Medio TY, Winkler
- Medio YMA, Winkler
- Medio PC, Winkler
- Ácido acético glacial, Merck
- Etanol absoluto, Merck
- Extracto de levadura, Winkler
- Carbonato de sodio; Merck
- 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH), Sigma Aldrich
- Trolox, Sigma Aldrich
- Fenoltaleina, Merck
- Oftalato de potasio, Merck

3.1.3 Material de laboratorio

- Tubos de ensayo

- Gradilla
- Espátulas
- Filtro de nylon estériles
- Jeringas
- Probetas
- Piseta
- Pipetas
- Matraz Erlenmeyer
- Matraz de aforo
- Micropipeta
- Vasos precipitados
- Cubetas
- Termómetro
- Embudo de decantación
- Papel filtro
- Papel parafilm
- Papel Kraft
- Placas Petri
- Porta objeto
- Asa de siembra tipo aguja
- Guantes

3.1.4. Equipos e instrumentos

- Estufa de incubación, Memmert 0-200
- Espectrofotómetro, Spectronic Genesys 5
- Balanza analítica, Kyoto Chyo MJ-500
- Estufa con agitación, GFL 3032
- Refrigerador
- Rotavapor, Buchi R-210, Cientec
- pH metro, Quimis Q-400MT

3.2. Metodología

3.2.1. Ubicación del lugar de trabajo: Los ensayos se realizaron en los Laboratorios de Ciencia de los Alimentos y Microbiología de Alimentos del Departamento de Ingeniería Química y en el Laboratorio de Microbiología y Rizobiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales.

3.2.2. Diseño experimental: Se evaluó el proceso de acetificación de vino de manzana durante un período de 30 días. Se consideraron como variables independientes, la presencia o ausencia de biofilm microbiano y la temperatura de fermentación (20 y 30 °C). Con lo anterior se contemplaron 4 tratamientos.



Figura 3. Biofilm microbiano o “madre de vinagre orgánico” utilizado en los ensayos y proveniente de una empresa regional.

Se utilizaron botellas que contenían 750 ml vino de manzana para llevar a cabo el proceso de acetificación. Cada botella fue considerada como una unidad de fermentación y por lo tanto una repetición. Para cada tratamiento se utilizaron 3 repeticiones (3 botellas).

Como variables dependientes, se utilizaron el contenido de polifenoles totales, actividad antioxidante, acidez titulable, pH y caracterización microbiana.

Todas las evaluaciones realizadas, se hicieron en duplicado para cada repetición (botella) y se denominaron M1 y M2. Las variables dependientes se midieron el día 0, 15 y 30.

Control 1 (C1): Corresponde a botellas de vino de manzana sin biofilm microbiano mantenidas a 20 °C durante el proceso de acetificación por 30 días.

Tratamiento 1 (T1): Corresponde a botellas de vino de manzana con adición de biofilm microbiano (65 gramos por botella) mantenidas a 20 °C durante el proceso de acetificación por 30 días.

Control 2 (C2): Corresponde a botellas de vino de manzana sin biofilm microbiano mantenidas a 30 °C durante el proceso de acetificación por 30 días.

Tratamiento 2 (T2): Corresponde a botellas de vino de manzana con adición de biofilm microbiano (65 gramos por botella) mantenidas a 30 °C durante el proceso de acetificación por 30 días.

Tabla 1. Resumen de los tratamientos utilizados en el estudio

Tratamientos		
20°C	C1	Vino
	T1	Vino + Biofilm
30°C	C2	Vino
	T2	Vino + Biofilm

3.2.3. Métodos analíticos: Para realizar la determinación del contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante, se preparó un extracto a partir del cual se realizaron los análisis.

3.2.3.1. Preparación del extracto: Para la preparación del extracto se utilizó el protocolo descrito por Ubeda *et al.* (2011) con algunas modificaciones. Se tomó 20 ml de la muestra (vino de manzana desde cada botella) y se le agregó 40 ml de metanol, luego se centrifugó por 15 min

a 4000 rpm y se recuperó el sobrenadante, después se concentró con rotavapor durante 1 hora hasta observar una gota en el centro del balón la que se redisolvió en 15 ml de metanol.

3.2.3.2. Determinación de contenido de polifenoles totales: La determinación de polifenoles totales se realizó para el vino de manzana (Día 0, inicio de acetificación) siguiendo el protocolo de Paladino (2006) donde en un matraz aforado de 25 ml, se introducen respetando el orden, 250 µL de muestra, 1250 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu, 5000 µl de la solución de carbonato de sodio al 20% y se enrasa a 25 ml con agua destilada. Se agita el matraz para homogeneizar, se espera 90 min para estabilizar la reacción y se mide la absorbancia a 765 nm, frente a un blanco preparado con agua destilada. Para el vino de manzana acetificado se utilizó el protocolo de Sakanaka y Ishihara (2008) que establece lo siguiente: en un tubo de ensayo se agregó 500 µl de agua destilada, 125 µl de muestra, 125 µl del reactivo Folin-Ciocalteu, y 1250 µl de carbonato de sodio al 7%, posteriormente se llevó a 3 ml con agua destilada (1 ml de agua destilada) y se deja por 90 min a temperatura ambiente y en oscuridad y se mide a 765 nm. Este procedimiento se realizó en triplicado cada 15 días, iniciando el día 0 y luego a los 15 y a los 30 días.

Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico equivalente por kg de vino de manzana (mg/Kg) por lo que se construyó una curva de ácido gálico en metanol, resultando la siguiente ecuación de regresión lineal $y = 873,54x$, con un $R = 0,9984$. Se utilizó la siguiente ecuación para calcular el contenido de polifenoles totales

$$CAGE = 873,54 * Ab$$

Donde Ab es la absorbancia de los polifenoles a 765 nm y $CAGE$ la concentración en mg de Ácido Gálico Equivalente (AGE) /kg.

3.2.3.3. Determinación de actividad antioxidante: Se determinó por el método de DPPH según lo descrito por Ubeda *et al.* (2011). Para la determinación de la actividad antioxidante se preparó una solución metanólica de DPPH, a una concentración de 0,025 g/l. En una cubeta de vidrio se depositan 1950 µl de la solución de DPPH y se ajusta en el espectrofotómetro a 0,695-0,705

±0,01. Posteriormente se añaden 50 µl del extracto, se agita y se deja reaccionar por 60 min y se mide. Las lecturas son realizadas utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm. Se realiza un blanco con metanol puro. Los resultados se expresaron en µmoles Trolox Equivalente /kg para lo cual se realizó un curva estándar de Trolox, obteniendo la siguiente ecuación $y = 0,329x + 0,069$.

3.2.3.4. Análisis de acides titulable: Se realizó según Instituto Nacional de Normalización (INN, 1970) donde se neutraliza utilizando una solución de NaOH 0,1 N y fenolftaleina al 1% como indicador. Para estandarizar la solución de NaOH, se procedió a pesar 0,2 g de oftalato de potasio, sobre esta cantidad contenida en un matraz Erlenmeyer se agregó 20 ml de agua destilada y se agitó, luego se agregó 3 gotas de fenolftaleina al 1% y se tituló con NaOH hasta la aparición de color rosado permanente. Esto fue realizado en triplicado.

Una vez estandarizada la solución de NaOH la determinación de acidez se realiza de acuerdo a Gaviota (2004), para ello se tomó 4,5 ml de la muestra y se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 50 ml que contenía 20 ml de agua destilada. Se agregó 3 gotitas de fenolftaleína al 1% y se tituló con la solución de NaOH 0,1 N hasta obtener un cambio de color rosado claro, que persistió por más de 30 segundos.

La acidez titulable se expresó como contenido de ácido málico y se calculó mediante la siguiente formula:

$$\text{Formula (g/l)} = \frac{N \times V \times PE}{v}$$

Dónde:

N = normalidad de la solución NaOH usado para titular (eq/l)

V = volumen de la solución de NaOH gastado en la titulación (l)

v = volumen de la muestra de jugo (l)

PE= peso equivalente de ácido málico (134,09 g/eq)

3.2.3.5. Determinación de pH: A cada muestra obtenida de las botellas se le midió el pH con un pH metro Quimis Q-400MT.

3.2.4. Procedimientos microbiológicos: Para los aislamientos microbiológicos se utilizó el medio de cultivo específico Agar Etanol (AE) compuesto por 0,5% de glucosa, 0,3% extracto levadura, 0,4% peptona, 0,9% agar, 3 ml etanol absoluto y 3 ml de ácido acético glacial. Este medio tiene un pH 4 a 5, el cual es óptimo para el crecimiento de las bacterias de ácido acético (Gullo y Giudici, 2008).

Se tomaron muestras de las botellas inoculadas, y se procedió a sembrar en placas con medio AE e incubas por 72 horas a 30 °C, empezando con el biofilm del día cero antes de ser inoculado, y siguiendo las mediciones al día 15 y al día 30. Una vez crecidos los microorganismos, se aislaron por estrías hasta tener colonias aisladas completamente, una vez aisladas, se realizó la tinción de Gram para verificar la pureza de las bacterias aisladas del día 0, 15 y 30.

Se realizaron además siembras de los microorganismos obtenidos en diferentes medios de cultivo, con el propósito de observar el comportamiento de las colonias de acuerdo a los diferentes nutrientes presentes en los medios, es así como se consideró el uso de los medios de cultivo Triptona Levadura (TY) (Beringer, 1974), Plate Count (PC) y Agar Manitol Levadura (YMA) (Vincent, 1970).

Para la colecta de las muestras desde las botellas inoculadas con el biofilm se utilizó una pipeta tomando un trozo de biofilm a presión y posteriormente el uso de un asa de siembra para obtener un raspado de la película formada por el biofilm. Las placas sembradas o inoculadas fueron incubadas en estufa de cultivo por 72 horas a 30 °C y las diferentes colonias obtenidas fueron clasificadas morfológicamente de acuerdo a forma y color de las colonias

3.2.5. Análisis estadístico: Las diferencias estadísticas de los resultados se determinaron mediante la prueba de kruskal-wallis y la comparación de medias de los rangos, utilizando el programa computacional SXW, trabajando a un nivel de significancia del 5%.

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Polifenoles totales y actividad antioxidante.

Los resultados de la evolución del contenido de polifenoles totales en el proceso de acetificación por fermentación del vino de manzana, se muestran en la Tabla 2. Como para todos los tratamientos se parte del vino de manzana, la concentración de polifenoles totales es la misma para el día 0. En todos los tratamientos, se evidencia una tendencia a la disminución en la concentración de polifenoles totales entre el día 0 y al día 30.

Tabla 2. Evolución del contenido de polifenoles totales (Expresado mg de Ácido Gálico Equivalente / kg) en el proceso de acetificación por fermentación del vino de manzana.

Tratamiento	Día		
	0	15	30
C1	329,5 ± 11,0 aA	328,5 ± 14,3 aA	296,3 ± 11,8 bA
T1	329,5 ± 11,0 aA	321,3 ± 10,7 aA	283,2 ± 8,1 bB
C2	329,5 ± 11,0 aA	342,0 ± 44,9 aA	286,6 ± 7,8 bAB
T2	329,5 ± 11,0 aA	252,8 ± 8,9 cB	283,3 ± 9,3 bB

C1: Vino de manzana acetificado por fermentación a 20 °C, T1: Vino de manzana inoculado con biofilm y acetificado por fermentación a 20 °C, C2: Vino de manzana acetificado por fermentación a 30 °C, T2: Vino de manzana inoculado con biofilm y acetificado por fermentación a 30 °C.

En una misma línea, letras minúsculas iguales indican que no existe diferencia significativa ($p > 0,05$) entre promedios, según la prueba de comparación de medias de Kruskal-Wallis.

En una misma columna, letras mayúsculas iguales indican que no existe diferencia significativa ($p > 0,05$) entre promedios, según la prueba de comparación de medias de Kruskal-Wallis.

La disminución de los polifenoles en el proceso de acetificación del vinagre de manzana también fue reportada por Andlauer *et al.* (2000) con una reducción del 40% versus un 8% del vinagre de vino. Esto se atribuye a que el vinagre de vino posee polifenoles poliméricos que se oxidan más lento que los polifenoles monoméricos, abundantes en el vinagre de manzana.

Ubeda *et al.* (2011) reportaron resultados similares en el proceso de acetificación ocurriendo una disminución de los polifenoles en los ensayos de fermentación natural. Sin embargo, estos autores reportaron un aumento en los polifenoles para las muestras inoculadas con bacterias ácido acéticas (AAB), enzimas peptolíticas y dióxido de sulfuro (SO₂). En este trabajo, en los tratamientos T1 y T2 con presencia del biofilm microbiano ocurrió una disminución de los polifenoles. Al parecer los microorganismos presentes en la acetificación utilizan como medida de protección los polifenoles, ya que están expuestos a condiciones extremas de pH, acidez y la cantidad de etanol presente en el medio además de la oxidación que producen (Gullo y Giudici, 2006). Esto podría explicar la disminución en el contenido de polifenoles totales en los tratamientos evaluados.

Las AAB son sensibles al SO₂ (Bartowsky y Henschke, 2008) ya que disminuye su capacidad de transformar el etanol a ácido acético. Sin embargo el SO₂ igual afecta a las levaduras y en un mayor grado que a las AAB. Si comparamos entre levaduras y la aplicación de SO₂ el más perjudicial para la acetificación, es la presencia de levaduras, por lo que hubiera sido de utilidad el uso de SO₂ para eliminar estas.

Al día 30, el contenido de polifenoles totales en C1 es significativamente mayor comparado con los tratamientos T1 y T2, pero no difiere significativamente con C2. Esto ocurre principalmente por la ausencia del biofilm, dado que a 20 y 30 °C (C1 y C2) sin biofilm, se conservan mejor los polifenoles que en los tratamientos T1 y T2. Algo similar ocurre al día 15 del proceso de acetificación, donde T1 y T2 difieren significativamente, lo cual también puede ser atribuido a la diferencia en las temperaturas de ambos tratamientos como ha sido reportado por Andlauer *et al.* (2000).

Sin embargo, como se puede observar en la Tabla 1, T1 y T2 no difieren significativamente para el día 30, por lo que supondría que al llegar a ese tiempo, el desarrollo microbiano proveniente desde el biofilm es tal, que independiente de la temperatura a la que están sometidas, ésta variable no tiene mayor efecto sobre los polifenoles.

En la Tabla 3 se muestra la evolución de la actividad antioxidante en el proceso de acetificación por fermentación del vino de manzana. Como para todos los tratamientos se parte del vino de manzana, también la actividad antioxidante medida por el método DPPH es la misma para el día 0. En los 4 tratamientos la disminución en la actividad antioxidante es significativa con respecto al día 0.

Tabla 3. Evolución del contenido de la actividad antioxidante medida por el método de DPPH (expresada $\mu\text{moles Trolox Equivalente /kg}$) en el proceso de acetificación por fermentación del vino de manzana.

Tratamiento	Día		
	0	15	30
C1	1094,3 \pm 24,3 aA	855,6 \pm 19,5 cAB	960,7 \pm 15,1 bA
T1	1094,3 \pm 24,3 aA	814,5 \pm 11,4 bC	800,6 \pm 16,7 bB
C2	1094,3 \pm 24,3 aA	875,5 \pm 25,6 bA	849,9 \pm 18,5 bA
T2	1094,3 \pm 24,3 aA	835,1 \pm 31,9 bBC	771,6 \pm 12,6 cB

C1: Vino de manzana acetificado por fermentación a 20 °C, T1: Vino de manzana inoculado con biofilm y acetificado por fermentación a 20 °C, C2: Vino de manzana acetificado por fermentación a 30 °C, T2: Vino de manzana inoculado con biofilm y acetificado por fermentación a 30 °C.

En una misma línea, letras minúsculas iguales indican que no existe diferencia significativa ($p > 0,05$) entre promedios, según la prueba de comparación de medias de Kruskal-Wallis.

En una misma columna, letras mayúsculas iguales indican que no existe diferencia significativa ($p > 0,05$) entre promedios, según la prueba de comparación de medias de Kruskal-Wallis.

Al día 30, C1 y C2 presentan la mayor actividad antioxidante entre todos tratamientos, lo que es concordante con los resultados de polifenoles totales (Tabla 2). Lo anterior, significa que C1 y C2 producen la menor disminución en polifenoles totales y actividad antioxidante en el proceso de acetificación del vino de manzana evaluado al cabo de 30 días. Esto significaría que la presencia del biofilm microbiano y una temperatura mayor tienen un efecto adverso sobre la concentración de polifenoles y su actividad antioxidante.

En comparación a este estudio, Ubeda *et al.* (2011) obtuvieron mejores niveles de capacidad antioxidante para vinos (1838 $\mu\text{moles TE/kg}$) y para vinagre (1615 $\mu\text{moles TE/kg}$) ya que utilizaron otros tratamientos y diferente materia prima (caqui). Sin embargo, también

evidenciaron una tendencia de disminución de la actividad antioxidante a medida que avanzaba el proceso de acetificación.

Rice-Evans *et al.* (1996) plantean que no todos los vegetales, frutas y los derivados de estos tienen la misma composición y que no todos los fenoles tienen la misma capacidad antioxidante. Por lo tanto, la capacidad antioxidante del vinagre dependerá en gran medida de la materia prima utilizada y de la calidad de los polifenoles, no de la cantidad.

El tratamiento T2 fue el que más disminuyó (Tabla 3) en comparación a todos los demás tratamientos, lo que confirma el efecto negativo del biofilm microbiano y de la mayor temperatura (30 °C) sobre la actividad antioxidante (Su y Chien, 2007) medida por DPPH durante el proceso de acetificación del vino de manzana monitoreado en este estudio.

También las levaduras que crecieron en abundancia desde el día 15 en el proceso de acetificación podrían haber colaborado en la disminución de la actividad antioxidante de los polifenoles debido a dos motivos: capturando los polifenoles (Mazauric y Salmon, 2005) y/o liberando los compuestos anitoxidantes diferentemente de los polifenoles dentro de la célula o de la pared celular (Aredes-Fernández *et al.*, 2010).

4.2. Acidez titulable

En la Tabla 4 se muestra la evolución de acidez titulable expresada como gramos de ácido málico por litro en el proceso de acetificación por fermentación del vino de manzana.

La mayor parte de las frutas y hortalizas contienen ácidos orgánicos, que se traspasan a sus derivados, cuando se procesan, para el caso del vino de manzana el principal acido es el ácido málico y para el vinagre es el ácido acético (Wills *et al.*, 1985).

Tabla 4. Evolución de la acidez titulable (expresada en gramos de ácido málico por litro) en el proceso de acetificación por fermentación del vino de manzana.

Tratamiento	Día		
	0	15	30
C1	10,85 ± 0,20 aA	9,35 ± 0,94 bC	10,20 ± 0,20 abC
T1	10,75 ± 0,12 bA	12,65 ± 0,20 abA	16,15 ± 0,23 aA
C2	10,90 ± 0,20 aA	10,70 ± 0,00 bBC	10,55 ± 0,20 bBC
T2	10,90 ± 0,20 bA	12,10 ± 0,20 abAB	12,85 ± 0,23 aAB

C1: Vino de manzana acetificado por fermentación a 20 °C, T1: Vino de manzana inoculado con biofilm y acetificado por fermentación a 20 °C, C2: Vino de manzana acetificado por fermentación a 30 °C, T2: Vino de manzana inoculado con biofilm y acetificado por fermentación a 30 °C.

En una misma línea, letras minúsculas iguales indican que no existe diferencia significativa ($p > 0,05$) entre promedios, según la prueba de comparación de medias de Kruskal-Wallis.

En una misma columna, letras mayúsculas iguales indican que no existe diferencia significativa ($p > 0,05$) entre promedios, según la prueba de comparación de medias de Kruskal-Wallis.

En los tratamientos T1 y T2 hay un aumento en la acidez debido al proceso de acetificación que debiera provocar la presencia del biofilm microbiano. Inicialmente la acidez debiera ser proporcionada por la predominancia del ácido málico en el vino, para que luego, por acción de las bacterias acéticas, comience la producción de ácido acético. Contrariamente en C1 y C2 la acidez disminuye, lo que sustentaría la afirmación anterior sobre la acción del biofilm microbiano sobre el sustrato para la transformación del etanol en ácido acético (Giudici *et al.*, 2006).

En el tratamiento 1, donde la temperatura es de 20 °C, la acidez titulable tuvo el mayor aumento durante el proceso de acetificación, comenzando el día 0, con un promedio de 10,75 g de ácido málico /l, para finalizar al día 30 con 16,15 g/l. En el tratamiento 2 donde la temperatura era de 30 °C, la acidez al día 15 era de 12,10 g/l y al día 30 fue de 12,85 g/l, la cual es significativamente menor que para T1. Las bacterias ácido acéticas (AAB) son microorganismos mesófilos y su temperatura óptima de crecimiento está entre 25 y 30 °C. La reacción de oxidación que producen las AAB es exotérmica (Gullo y Giudici, 2008). En el caso de este estudio, las temperaturas de 20 y 30 °C se refieren a aquellas que rodeaban a las botellas y que

las proporcionan las estufas de incubación. Posiblemente, las temperaturas en el vino de manzana se vieron aumentadas por las reacciones de oxidación del etanol a ácido acético. Por esta razón, las bacterias se encontrarían en el sustrato a una temperatura superior a 20 y 30 °C para T1 y T2, respectivamente. Esta situación podría explicar el mayor aumento en la acidez que presentó el tratamiento T1 con respecto al T2, donde la temperatura posiblemente superaría el rango óptimo para las AAB.

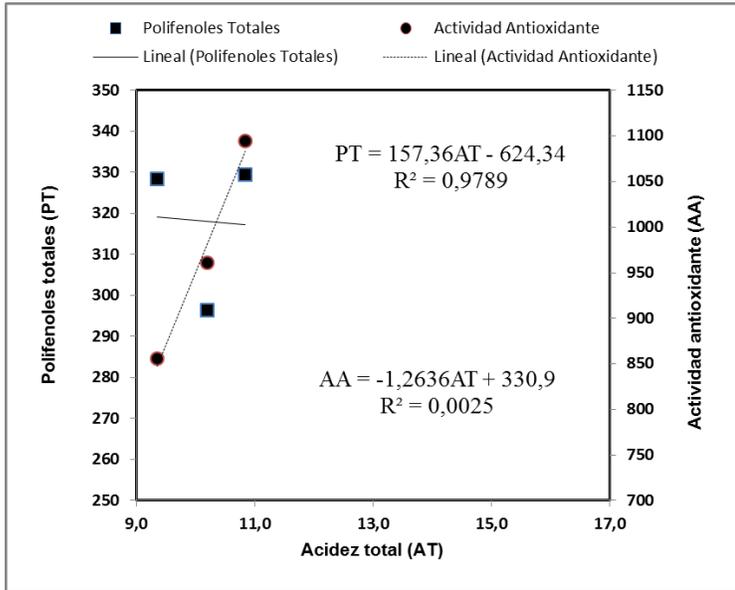
Como se mencionó anteriormente, para los controles C1 y C2 la acidez disminuyó en los días 15 y 30 con respecto al valor inicial que presentaba el vino de manzana. En estos dos tratamientos el proceso de acetificación fue más lento ya que la flora microbiana no tendría un gran número de bacterias ácido acético como en el caso de T1 y T2. Estas bacterias son las encargadas de convertir el alcohol a ácido acético, aumentando así su acidez y disminuyendo los grados alcohólicos (Aquarone *et al.*, 1986).

La acidez expresada como ácido acético (Anexo 1) muestra que al día 30, el tratamiento 2 alcanzó la mayor acidez cuyo valor fue de 7,22 g de ácido acético/l. Según el SAG (1999) para que el vino sea transformado en vinagre se debe alcanzar una riqueza mínima de 40 gramos de ácido acético por litro. El tiempo de duración de la acetificación es 8 a 30 días o un par de años dependiendo del modelo que se use y la especie de bacteria cuando se quiera hacer con un inóculo.

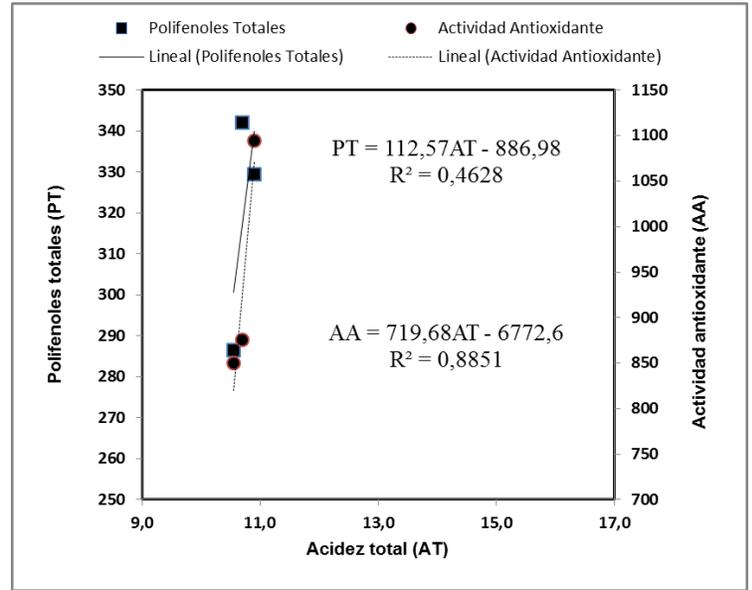
Estos antecedentes demuestran que en este trabajo el tiempo de fermentación correspondería a la etapa inicial de la transformación de vino en vinagre. Esto significaría que aún faltaría tiempo de fermentación para que se pudiera cumplir con la norma establecida para ser considerado al día 30 el producto como vinagre (SAG, 1999).

En la Figura 4 se presentan las relaciones entre la acidez titulable que caracteriza el proceso de fermentación acética junto con los contenidos de polifenoles totales y la actividad antioxidante.

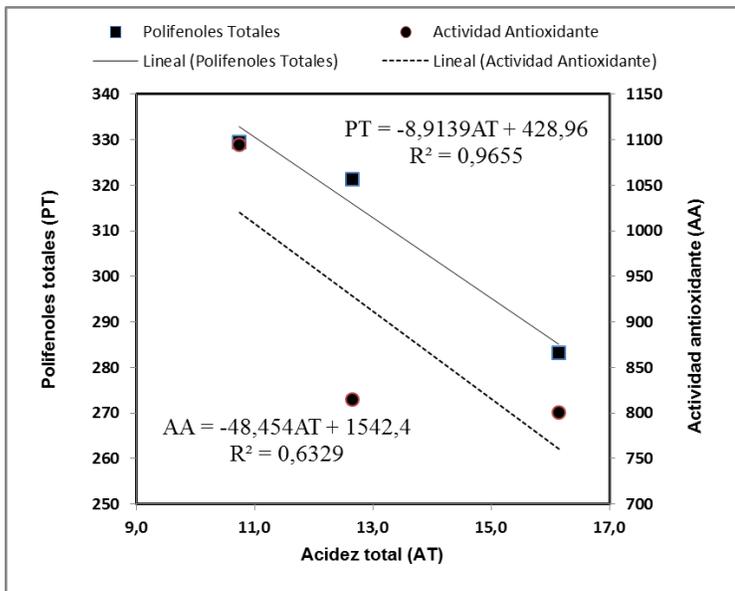
C1



C2



T1



T2

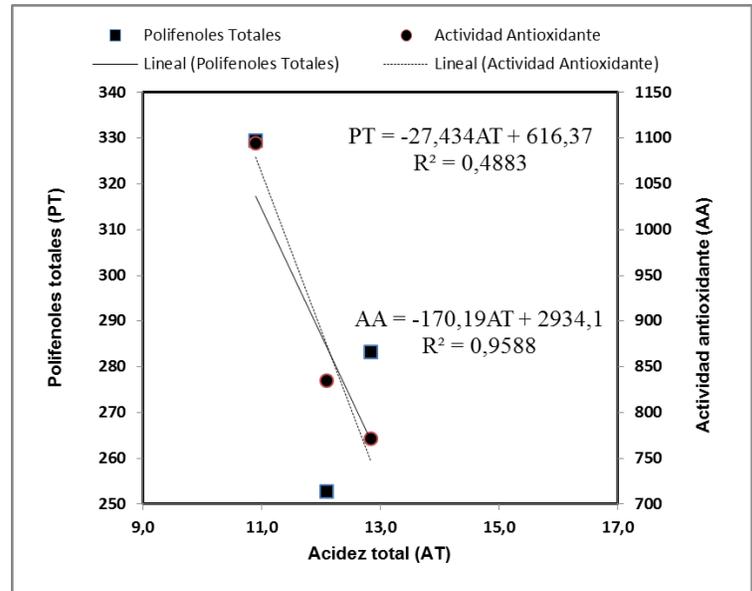


Figura 4. Relación entre acidez titulable con los polifenoles y actividad antioxidante, correspondientes a los tratamiento, C1 y C2 (parte superior) y T1 y T2 (parte inferior).

Se observa en C1 una fuerte relación AA/AT ($R^2= 0,98$) y en T1 la correlación AA/AT es de $R^2= 0,63$. Para PT/AT en C1 no existe casi correlación ya que su $R^2= 0,0025$, al contrario de T1 donde la correlación PT/AT es $R^2=0,97$. En cuanto a los tratamiento C2 y T2 tenemos que la mejor relación de AA/AT es en el tratamiento T2 ($R^2= 0,96$) mientras que C2 presenta una $R^2= 0,89$. Para la relación PT/AT el tratamiento T2 muestra la correlación más elevada ($R^2= 0,49$).

En T1 y T2 se evidencia que a medida que aumenta la AT disminuyen tanto los PT y AA con correlaciones que son iguales o superiores a $R^2= 0,48$ demostrando que la acidez titulable tiene una correlación negativa con la capacidad antioxidante y los polifenoles totales.

Las correlaciones más altas de todos los tratamientos para AA/AT es en C1 con un $R^2= 0,98$ con una relación directamente proporcional entre la capacidad antioxidante y la acidez titulable, lo cual podría ser debido a que el proceso de acetificación para C1 está recién iniciándose, lo que se fundamenta en los bajos valores de acidez titulable (Tabla 4). El tratamiento T1 posee la relación PT/AT de un $R^2= 0,97$ y es inversamente proporcional, es decir que a medida que aumenta la acidez titulable disminuyen los polifenoles totales. Esto último concuerda con los resultados obtenidos por Andlauer *et al.* (2000) quienes encontraron que durante la acetificación hay una gran pérdida de polifenoles totales, principalmente para los vinagres de manzana.

4.3. pH

En la Tabla 5 se muestra la evolución del pH en el proceso de acetificación por fermentación del vino de manzana.

La concentración de iones de hidrogeno en vino de manzana varía entre 3 a 4 dependiendo del tipo de manzana y la forma de fermentación (Hellmiss, 1998). Para el vinagre varia de 2,46 a 3,20 (Aquarone *et al.*, 1986).

Tabla 5: Evolución del pH en el proceso de acetificación por fermentación del vino de manzana.

Tratamiento	Día		
	0	15	30
C1	3,20 ± 0,02 bA	3,21 ± 0,01 abAB	3,29 ± 0,01 aBC
T1	3,20 ± 0,02 bA	3,28 ± 0,01 abA	3,34 ± 0,01 aA
C2	3,19 ± 0,01 bA	3,19 ± 0,01 bB	3,27 ± 0,01 aC
T2	3,19 ± 0,02 bA	3,22 ± 0,02 abAB	3,32 ± 0,01 aAB

C1: Vino de manzana acetificado por fermentación a 20 °C, T1: Vino de manzana inoculado con biofilm y acetificado por fermentación a 20 °C, C2: Vino de manzana acetificado por fermentación a 30 °C, T2: Vino de manzana inoculado con biofilm y acetificado por fermentación a 30 °C.

En una misma línea, letras minúsculas iguales indican que no existe diferencia significativa ($p > 0,05$) entre promedios, según la prueba de comparación de medias de Tukey HSD.

En una misma columna, letras mayúsculas iguales indican que no existe diferencia significativa ($p > 0,05$) entre promedios, según la prueba de comparación de medias de Tukey HSD.

Se puede observar en la Tabla 5, para todos los tratamientos el pH es significativamente mayor en el día 30 con respecto a la condición inicial del vino de manzana (Día 0). Este comportamiento no sería concordante con el proceso de acetificación donde el pH se reduce entre un rango de 2,46 a 3,2, cuando el vino se transforma en vinagre (Aquarone *et al.*, 1986).

La disminución en el pH debiera ir de la mano con el aumento de la acidez titulable debido a la formación de ácidos a partir del etanol (Aquarone *et al.*, 1986). El vino de manzana tiene normalmente 1,5 gramos de acidez volátil y una acidez titulable de 4 a 8,7 gramos de ácido málico/l (Tarko *et al.*, 2010), mientras el vinagre de 50 gramos de ácido acético/l según el Ministerio de Salud (2011).

En los tratamientos control C1 y C2 la acidez titulable disminuye del día 0 al 30 por lo cual se podría considerar un aumento en el pH. En T1 y T2 la acidez titulable aumenta del día 0 al 30, por lo cual el pH debiera disminuir, pero al contrario aumenta. Es probable que las levaduras presentes en la acetificación estén aumentando el pH. Como en los ensayos realizados no se aplicó ningún tipo de tratamiento ya sea SO₂, algún tipo de enzima o gas inerte para eliminar microorganismos indeseados, es posible que hayan crecido levaduras que pueden provenir del

vino o del mismo biofilm. Chen *et al* (2011) reportan que en el proceso de producción del vinagre, durante la fermentación del vino, el pH y el azúcar disminuyen, al contrario de la concentración de etanol y poder reductor que van aumentando y durante el proceso de acetificación el pH, continuo disminuyendo junto con el etanol, mientras que la acidez, que es el parámetro importante en la acetificación del vinagre, va en aumento, obteniendo un vinagre en 28 días. En base a lo anterior, podríamos pensar que otros microorganismos indeseados retrasaron enormemente el proceso de acetificación. Este estudio duró 30 días y la acidez titulable aumentó de 4,8 hasta 7,5 gramos de ácido acético /l (Anexo 1) en el tratamiento 1, ya que posiblemente carecían de la cantidad de bacterias de ácido acético para que conviertan el etanol. También se podría considerar que otros microorganismos, haya interferido en el proceso.

4.4. Análisis microbiológico

Los resultados de la siembra del biofilm microbiano realizados el día cero en medio de cultivo AE, muestran el desarrollo de un grupo de colonias con características muy similares. En este análisis fue posible visualizar la presencia de al menos 5 grupos de colonias diferentes (Daros no mostrados).

Los resultados obtenido de los tratamientos T1 y T2 aislados desde la superficie del vino y la parte superior del biofilm, nos indican que a partir del día 15 todos los microorganismos presentes aislados son levadura, debido a que en todas las siembras realizadas durante el tiempo que duro el ensayo, se obtuvo la misma colonia, la cual corresponde a una colonia con márgenes definidos, elevada, muy blanca de consistencia seca y algo dura.

La abundante presencia de levaduras que se constató en este estudio se podría deber a que no se aplicó ningún tipo de tratamiento para disminuir estos microorganismos indeseados.

4.4.1. Caracterización del biofilm. En la Figura 5 se observa el crecimiento de cinco cepas bacterianas aisladas a partir del biofilm microbiano en los medio de cultivo Agar AE, Agar TY, Agar YMA y Agar PC con el propósito de seleccionar el más adecuado de acuerdo a los

requerimientos nutricionales de estos microorganismos. Estas cinco cepas aisladas representan las colonias típicas en términos de forma y tamaño que crecieron en las placas sembradas en la etapa inicial del ensayo.

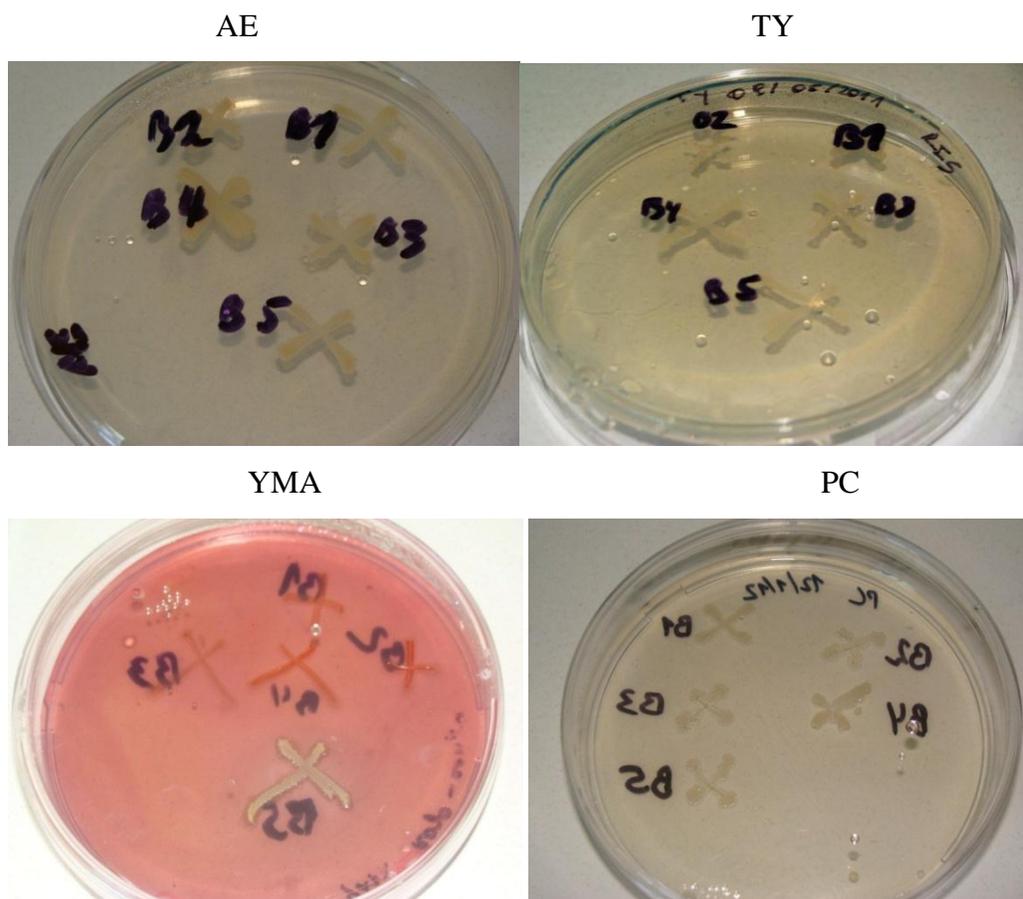


Figura 5. Crecimiento en los medio de cultivo Agar AE, Agar TY, Agar Manitol Levadura YMA y Agar PC de cinco cepas bacterianas aisladas a partir del biofilm microbiano (Figura 3).

Considerando la intensidad del crecimiento, lo que se evaluó visualmente, por el área ocupada por las colonias de las cinco cepas aisladas del biofilm, se pudo establecer que el medio AE es el más adecuado para el crecimiento de bacterias típicas del biofilm. Este comportamiento concuerda con lo reportado por Gullo y Giudici (2008) y Sengun y Karabiyikli (2011) quienes recomiendan el uso de este medio de cultivo para la siembra de bacterias de ácido acético. Este

medio es adecuado, ya que tiene en su composición, ácido acético glacial y etanol absoluto que aumenta el tiempo de almacenamiento de las AAB y las estabiliza.

En cuanto a los otros medios testeados en el Agar TY también se observa el crecimiento de las cinco cepas de bacterias aisladas del biofilm, sin embargo no es tan pronunciado como en el caso del medio AE. Además se observa que en el Agar Manitol Levadura (YMA), 4 de las cepas bacterianas absorbieron el rojo metilo y una no lo hizo. Esto significa que hay diferencias metabólicas entre las bacterias presentes en el biofilm microbiano y de la biodiversidad que hay en él.

4.5. Identificación y determinación de pureza

En la Figura 6, se muestran las bacterias aisladas para el día 0, antes de ser inoculadas, y junto a esta imagen tenemos el resultado de la tinción de Gram, donde se aprecia, que pertenecen al grupo de las Gram negativas, en forma de bacilos cortos, característica de las bacterias de ácido acético (AAB) tal como lo describen Guillamón y Mas (2011).

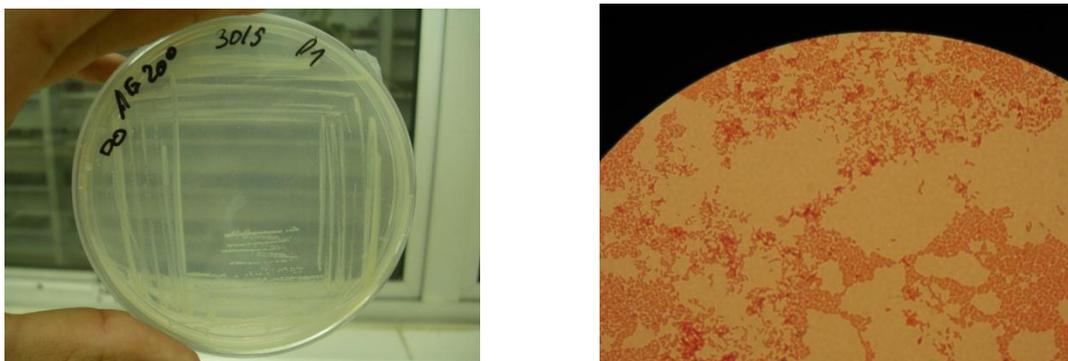


Figura 6. Crecimiento de bacterias aisladas desde el biofilm al día 0, siembra por estrías (imagen izquierda) y tinción de Gram (imagen derecha).

Según las imágenes presentadas y lo reportado por autores, el biofilm utilizado para la inoculación en el presente trabajo, sí posee antecedentes de que contiene AAB.

En cuanto a la Figura 7, en el día 15 los tratamientos T1 y T2, presentan diferencias en cuanto al crecimiento de microorganismo. En el tratamiento 2 hay un reducido número de bacterias que

son de gran tamaño, y con forma de huevo, en cambio para el tratamiento 1, tiene varios microorganismo aislados, distribuyéndose en el centro de la placa los microorganismos más pequeños y por alrededor los más grandes y tienen la misma forma que las del tratamiento 2 (forma de huevo).

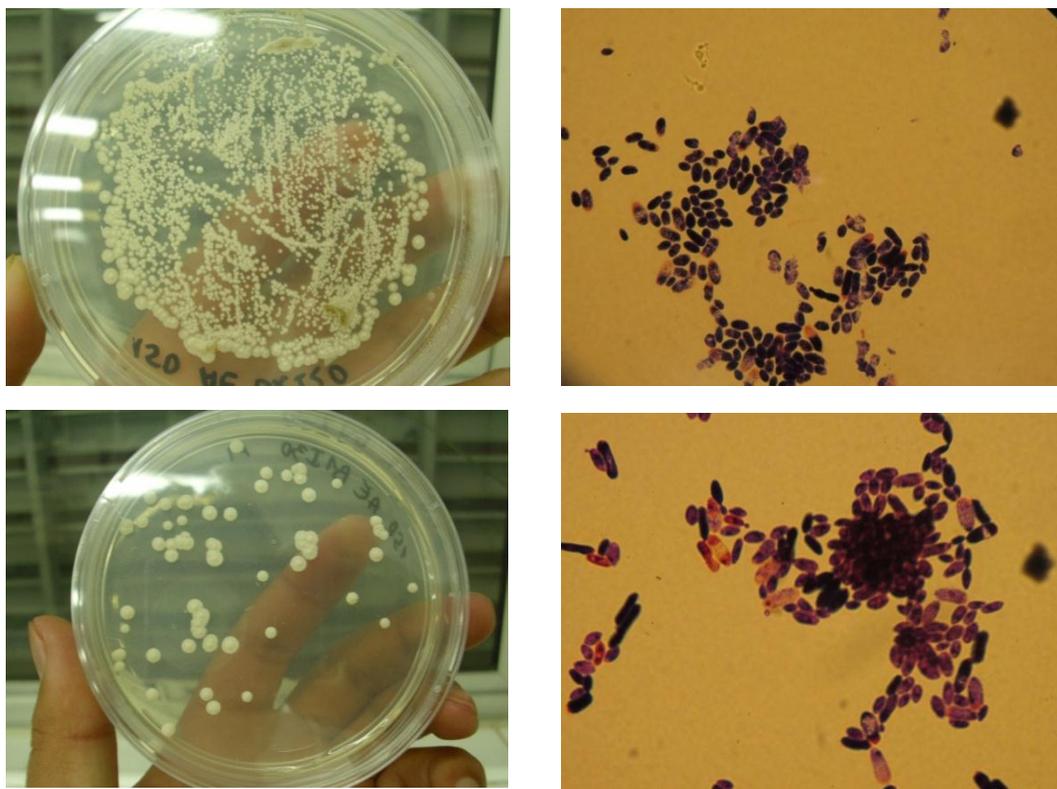


Figura 7. Crecimiento de bacterias aisladas del biofilms al día 15 del proceso de acetificación, las imágenes corresponden a siembra por estrías (foto izquierda) y tinción de Gram (foto derecha), En la parte superior el Tratamiento T1 y en la parte inferior el tratamiento T2.

De acuerdo a las tinciones de Gram (Figura 7), se observan la presencia de levaduras no muy desarrolladas en los tratamientos T1 y T2 al día 15 del proceso de acetificación. Se esperaba encontrar bacterias ácido acéticas que son las encargadas de la acetificación y que están presentes en el biofilm al inicio de la acetificación (día 0). Aunque las levaduras también participan en la acetificación, lo hacen en menor medida, ya que su función principal es en la

fermentación del mosto a vino, donde convierten los azúcares a etanol que es uno de los principales componentes del vino (Ramón y Gonzales, 2011).

También estas levaduras podrían estar retrasando la acetificación, convirtiendo los azúcares presentes en el vino a etanol impidiendo o retrasando el crecimiento y la acción de las AAB, por estos motivos, hay viñas que aplican diferentes sustancias y compuestos tales como, un gas inerte o dióxido de carbono, para así eliminar microorganismos indeseables en el vino, incluidas las AAB, que no tienen mucho beneficio para el vino, sino que al contrario, bajan la calidad de estos (Bartowsky y Henschke, 2008).

Al día 30, (Figura 8) se observa un patrón similar al del día 15, con una diferencia, los microorganismos que crecieron, están cubriendo a la porción del biofilm que está en la placa ubicándose encima de éste. Situación similar ocurrió en las botellas, donde los microorganismos empezaron a apegarse al biofilm siendo en el tratamiento T1 donde más se notó este comportamiento.

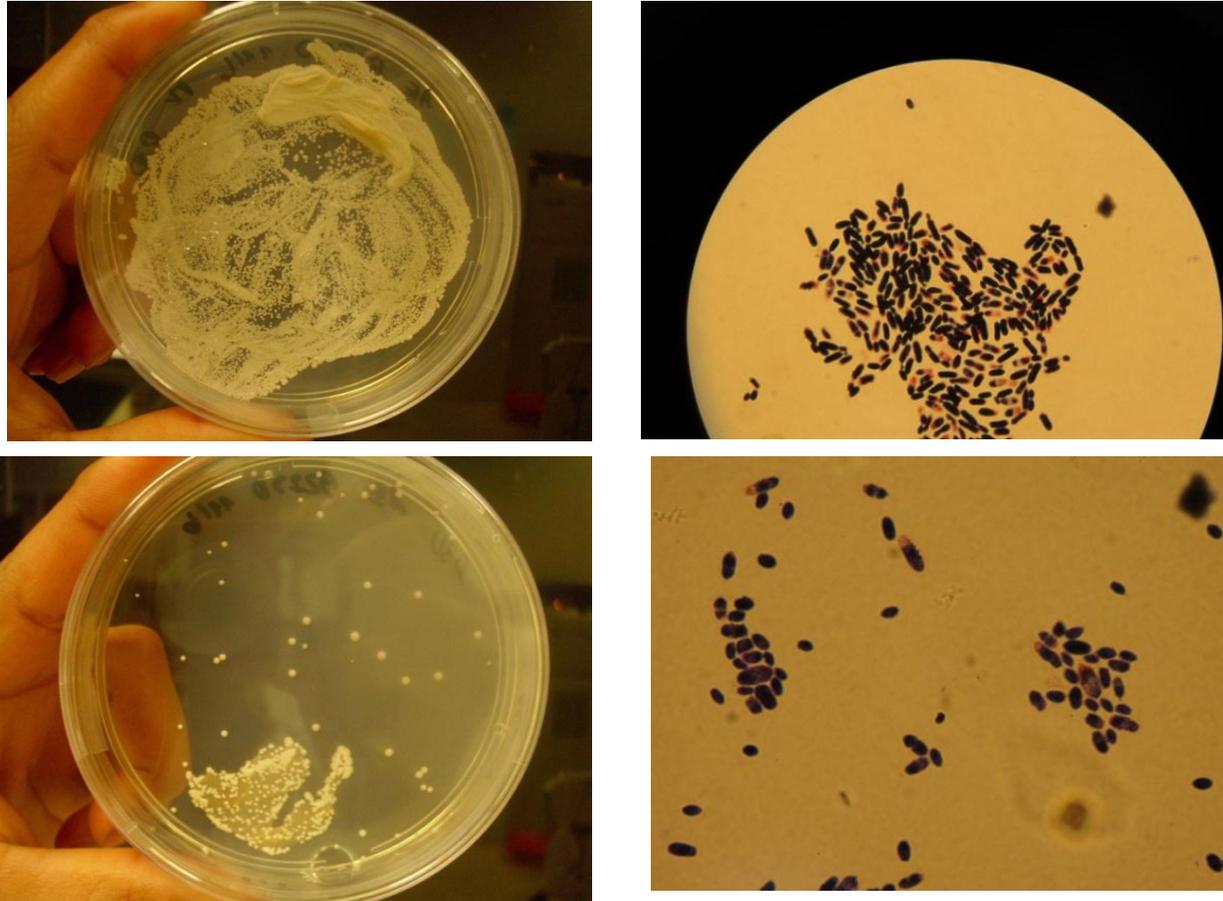


Figura 8. Crecimiento de bacterias aisladas del biofilm al día 30 del proceso de acetificación, siembra por estrías (imágenes izquierdas) y tinción de Gram (imágenes derechas), Tratamiento T1 en la parte superior y T2 en la parte inferior.

En la tinción de Gram se observan levaduras más definidas, dejando en claro su presencia y la ausencia de las AAB. Estos análisis respaldan lo discutido en los puntos 4.2 para la acidez titulable (Tabla 4) y el punto 4.3 para el pH (Tabla 5), sobre la presencia de otros microorganismo (levaduras) y no de bacterias ácido acético durante la acetificación. La producción de ácido acético llegado al día 30, estuvo muy alejado del mínimo para ser considerado vinagre que es de 5 % de acidez, expresada en ácido acético (50g/L) por lo que no se llegó a producir vinagre durante el tiempo que se realizó el ensayo. La presencia de levaduras también podría explicar el raro comportamiento del pH durante la acetificación, que para los tratamiento T1 y T2 aumenta, al contrario de lo que debiera haber ocurrido en una acetificación normal (a medida que la acetificación avanza la acidez aumenta y el pH disminuye).

5. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta todos los parámetros evaluados se puede concluir lo siguiente

- Según los resultados presentados se concluye que el proceso de acetificación del vino de manzana a vinagre de manzana, tienen un efecto negativo sobre los compuestos polifenólicos antioxidantes de estos, ya que a medida que los días y el proceso de acetificación avanzaba, los compuestos polifenólicos antioxidantes van disminuyendo.
- Los tratamientos utilizados T1 y T2, demostraron que al incorporar un biofilm o “madre de vinagre” hay una aceleración en el proceso de acetificación, lo cual se demuestra en los valores requeridos para alcanzar la acidez mínima del vinagre expresada como ácido acético.
- Al caracterizar el proceso de acetificación se encontró que el biofilms estudiado, efectivamente poseía AAB, pero una vez que se inocularon, y comenzó el proceso de acetificación, no se encontraron mas AAB, tomando su lugar en los tratamientos inoculados, cepas de levaduras, en mayor o menor proporción dependiendo de la temperatura, ya que a 20 °C, la cantidad de levaduras observadas eran mucho mayor a las observas a 30 °C, pero las mismas en los dos tratamientos. Además los tratamientos en donde se usó el biofilm (T1 y T2), la capacidad antioxidante y los polifenoles disminuyeron en comparación a los tratamientos que no tenían biofilm (C1 y C2).
- El tiempo que dura el proceso de acetificación es un factor determinante, en cuanto a la variación y contenido de los parámetros evaluados, como el pH, la acidez titulable, los microorganismos encontrados, así como en la concentración de polifenoles y su actividad antioxidante.

6. RESUMEN

El vinagre de manzana, se ha caracterizado y atribuido propiedades curativas y antioxidantes. En el proceso de acetificación del vino de manzana a vinagre de manzana, ocurren cambios en cuanto a la actividad de los antioxidantes y polifenoles, teniendo un rol importante los microorganismos presentes en el medio. Para estudiar este fenómeno se utilizaron 4 tratamientos T1 y T2 son inoculados con un biofilms orgánico y estudiado a diferentes temperaturas, T1 a 20 °C y T2 a 30 °C, para cada uno se agregó un control, que estaban sin biofilms. Se realizó el ensayo durante 30 días, tomándose mediciones de acidez titulable, pH y de polifenoles antioxidantes, además del aislamiento de microorganismos y la verificación de su pureza por tinción de Gram, en los días 0, 15 y 30. De todas estas mediciones se obtuvo que al día 0 la capacidad antioxidante fue de 1094,3 μ moles Trolox Equivalente / kg y 334 mg de Ácido Gálico Equivalente / kg, un ph de 3,2 y una acidez titulable de 12 g/L, mientras que para los días 15 y 30 estas concentraciones bajaron para los polifenoles antioxidantes y subieron para el pH y la acidez titulable. Según los resultados presentados se concluye que el proceso de acetificación del vino de manzana a vinagre de manzana, tienen un efecto negativo sobre los compuestos polifenólicos antioxidantes de estos, ya que a medida que los días y el proceso de acetificación aumentaba, los compuestos polifenólicos antioxidantes iban en decadencia. Se encontró que el biofilms estudiado, efectivamente poseía AAB, pero una vez inoculado y el proceso de acetificación avanza, las AAB se pierden a partir del día 15, tomando su lugar levaduras, en mayor o menor proporción dependiendo de la temperatura, ya que a 20°C, la cantidad de levaduras observadas eran mucho mayor a las observadas a 30°C, sin embargo eran la misma levadura que apareció en los dos tratamientos.

7. SUMMARY

Apple cider vinegar has been characterized and attributed healing properties and antioxidants. In the process of acidification of the wine of apple cider vinegar, changes occur regarding the activity of antioxidants and polyphenols, have an important role of microorganisms in the environment. To study this phenomenon is used 4 T1 and T2 are inoculated with an organic biofilms and studied at different temperatures T1 and T2 20 ° C to 30 ° C, was added to each control, which were without biofilms. Test conducted for 30 days, taking measurements of titratable acidity, pH and polyphenol antioxidants, in addition to the isolation of microorganisms and verification of its purity by Gram staining on days 0, 15 and 30. Of all these measurements were obtained at day 0 the antioxidant capacity was 1094.3 $\mu\text{mol Trolox equivalent / kg}$ and 334 mg of gallic acid equivalent / kg, a pH of 3.2 and a titratable acidity of 12 g / L, while for 15 and 30 these concentrations dropped to polyphenol antioxidants and went for pH and titratable acidity. According to the results presented it is concluded that the acidification process of the wine of apple cider vinegar have a negative effect on the antioxidant polyphenolic compounds of these, because as the days and the process of acidification increased, antioxidant polyphenolic compounds were in decline. We found that the biofilms studied indeed had AAB, but once inoculated and the acidification process progresses, the AAB are lost from day 15, taking place yeasts to a greater or lesser extent depending on the temperature, since 20 ° C, the amount of yeast observed were much higher than those observed at 30 ° C, however, were the same yeast which appeared in the two treatments.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Andlauer W, Stumpf C, Fu P, (2000). Influence of the Acetification Process on Phenolic Compounds J. Agric. Food Chem. 48, 3533-3536
- Andorrá, I., Landi, S., Mas, A., Guillamo N, J. M., y Esteve Zarzoso, B. (2008). Effect of oenological practices on microbial populations using culture independent techniques. Food Microbiol., 25, 849-856.
- Aquarone E, Almeida U, Borzani W. (1986). Alimentos y bebidas producidos por fermentación. Volumen 5
- Aredes Fernandez, P. A., Farias, M. E., Nadra, M. C. (2010). Interaction between *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii* isolated from wine. Modification of available nitrogen and biogenic amine production. Biotechnology Letters, 32, 1095-1102.
- Beringer, J.E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 84: 188-198.
- Bartowsky, E. J., y Henschke, P. A. (2008). Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine e a review. International Journal of Food Microbiology, 125, 60-70.
- Brugnoli L.I, Lozano J.E, Cubitto M.A. (2006). Potential of yeast isolated from apple juice to adhere to stainless steel surfaces in the apple juice processing industry. Food research international, 40, 332-340.
- Callejón R. (2006.) “Desarrollo de un método de HPLC para la determinación de aminoácidos en vinagre y su validación en muestras reales” Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia, Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina legal. España.

- Cleenwerck, I., y De Vos, P. (2008). Polyfasic taxonomy of acetic acid bacteria: An overview of the currently applied methodology. *Int. J. Food Microbiol.*, 125, 2-14.
- Chen Y, Hsieh P, Maub J, Sheu S, (2011). Antioxidant properties and mutagenicity of *Pinus morrisonicola* and its vinegar preparation *Food Science and Technology* 44 1477-1481
- De Ley, J.; Gillis, M.; Swings, J. (1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9a edicion, pp 267-278. The Williams and Wilkins co., Baltimore.
- De Vero, L., Gala, E., Gullo, M., Solieri, L., Landi, S., Y Giudici, P. (2006). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Food Microbiol.*, 23, 809-813.
- FAO/OMS. (1982). Codex Alimentarius Comision Draft European regional Standard for Vinegar. *Alinorm* 83/19, Appendix II.
- Fernández-Pachón M, Villaño D, Troncoso A, Carmen García-Parrilla M. (2006) Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. Sevilla. España.
- Gava J, A. (1979). *Principios de Tecnología de Alimentos*. Segunda edición. Pág. 247.
- Gaviota IES, (2004). Departamento de Fisica y Quimica, España <<http://www.juntadeandalucia.es/averroes/~04000134/fisiqui/practicassq/node10.html>>
- Giudici, P., Gullo, M., Solieri, L., De Vero, L., Landi, S., Pulvirenti, A., Rainieri, S., (2006). Gli aceti del mondo. In: Diabasis (Ed.), *Le fermentazioni dell'aceto balsamico tradizionale*. Reggio Emilia, Italy, pp. 7–13.

- Guillamón J. y Mas A, (2011). Molecular wine microbiology chapter 9 Acetic Acid Bacteria. Universitat Rovira i Virgili Tarragona, España.
- Gullo M. y Giudici P. (2008). “Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection” International Journal of Food Microbiology Vol. 125; 46-53.
- Gullo, M., De Vero, L., & Giudici, P. (2009). Succession of selected strains of *Acetobacter pasteurianus* and other acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 2585-2589.
- Halliwell B, Gutteridge Jmc. (1990). The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.*; 280: 1-8.
- Haruta, S., Ueno, S., Egawa, I., Hashiguchi, K., Fujii, A., Nagano, M., (2006). Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.*, 109, 79-89.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J., y Aruoma, O. I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food Chemical Toxicity*, 33, 601–617.
- Hellmiss M, (1998). El libro práctico del vinagre de manzana, Robinbook.
- Ilabaca, C., Navarrete, P., Mardones, P., Romero, J., y Mas, A. (2008). Application of culture culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. *Int. J. Food Microbiol.*, 126, 245-249.

- Instituto nacional de normalización, (1970). “Bebidas alcohólicas” - Determinación de acidez volátil NCh672.EOf1970 Chile.
- Leeman, M., Ostman, E. & Bjorck, I. (2005). Vinegar dressing and cold storage of potatoes lowers postprandial glycaemic and insulinaemic responses in healthy subjects. *Eur J Clin Nutr* 59 , 1266 – 1271.
- López, V., Fernández-Espinar, M. T., Barrio, E., Ramón, D., y Querol, A. (2002). A new PCR-based method for monitoring inoculated wine fermentations. *Int. J. Food Microbiol.*,81, 63-71.
- Llaguno, C. (1991). Antecedentes históricos. En: *El Vinagre de Vino*. Llaguno, C.; Polo, M.C. Eds., pp. 1-23. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.
- Mazaauric, J. P., y Salmon, J. M. (2005). Interactions between yeast lees and wine polyphenols during simulation of wine aging: I. Analysis of remnant polyphenolic compounds in the resulting wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5647-5653.
- Ministerio De Salud (2011). Reglamento Sanitario de los Alimentos, Decreto Supremo N° 977/96.
- Nishidai , S. , Nakamura , Y. , Torikai , K. , Yamamoto , M. , Ishihara , N. , Mori , H. & Ohigashi, H. (2000). Kurosu, a traditional vinegar produced from unpolished rice, suppresses lipid peroxidation in vitro and in mouse skin . *Biosci Biotechnol Biochem* 64 , 1909 – 1914.
- Nishino , H. , Murakoshi , M. , Mou , X. Y. , Wada , S. , Masuda , M. , Ohsaka , Y. , Satomi, Y. & Jinno, K. (2005). Cancer prevention by phytochemicals. *Oncology* 69 (Suppl 1) , 38 – 40 .

- Paladino S, (2006). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinifera* L.). Magister en Alimentos, Universidad de Cuyo. Argentina, pág 100
- Pannala As, Chan Ts, O'brien P, Rice-Evans. (2001). Flavonoid Binding chemistry and antioxidant activity: fast-reaction kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Com.*; 282: 1161-1168.
- Pasteur, L. (Ed.). (1868). *Etudes sur le vinaigre*. Paris, France: V. Masson.
- Poblet, M., Roze`S, N., Guillamo`N, J. M., y Mas, A. (2000). Identification of acetic acid bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR-amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. *Lett. Appl. Microbiol.*, 31, 63-67.
- Proestos, C.; N. Choriantopoulos; G. J. E. Nychas y M. Komaitis. (2005). "RP- HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity". *J. Agric. Food Chem.* Vol. 53; 1190-1195.
- Ramage, G., Saville, S. P., Wickes, B. L., & Lopez-Ribot, J. L. (2002). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5459–5463.
- Ramón D. y González R. (2011). Improvement of Wine Yeasts by Genetic Engineering. *Molecular Wine Microbiology*, Chapter 7, Logroño, Spain
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933–956.

- Rodrigo R, Bosco C. (2005) Oxidative stress and protective effects of polyphenols: Comparative studies in human and rodent kidney. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* Volume 142, Issues 3–4, Pages 317–327. Chile
- Ruiz, A., Poblet, M., Mas, A., y Guillamon, J. M. (2000). Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 50, 1981-1987.
- SAG, (1999). *MANUAL DE BEBIDAS ALCOHOLICAS Y VINAGRES*.
- Sakanaka, S., y Ishihara, Y. (2008). Comparison of antioxidant properties of persimmon vinegar and some other commercial vinegars in radical-scavenging assays and on lipid oxidation in tuna homogenates. *Food Chemistry*, 107, 739-744.
- Sengun I, y Karabiyikli S, (2011). Importance of acetic acid bacteria in food industry, *Food Control*, 22, 647-656
- Suarez L, J. A.; Iñigo L, B. (1990). *Microbiología Enológica. Fundamentos de Vinificación*. Mundi-Prensa, Madrid.
- Su M, Chien Y, (2007). Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. *Food Chemistry* 104, 182–187.
- Tarko T, Duda-Chodak A, Sroka P, Satora P, Jurasz E, (2010). Polish wines: Characteristics of cool-climate wines. *Journal of Food Composition and Analysis* 23, 463–468

- Torija, M. J., Mateo, E., Guillamo´ N, J. M., y Mas, A. (2009). Design and optimisation of TaqMan-MGB probes for the identification and quantification of acetic acid bacteria species. *Food Microbiol.*
- Ubeda C, Hidalgo C, M.J Torija, A. Mas, A.M. Troncoso y M.L. Morales (2011). “Evaluation of antioxidant activity and total phenols index in persimmon vinegars produced by different processes” *LWT - Food Science and Technology* Vol. 44; 1591-1596.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G.; Gao, L. And B.D. Oomah. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 46, 4113-4117.
- Vincent, J.M. (1970). *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria.* Blacwell Scientific Publication. Oxford, Great Britain.
- Wills, R., Lee, T., McGlasson, B., Graham, D., Joyce, D. (1985). “Introducción a la Fisiología y Manipulación Poscosecha de Frutas, Hortalizas y Plantas Ornamentales”. Primera Edición, Editorial Acribia, S.A., Zaragoza.
- Yamada, Y., y Yukphan, P. (2008). Genera and species in acetic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 125, 15-24.

9. ANEXOS

ANEXO 1, Tabla Acidez titulable expresada en ácido acético

Tratamiento	Día		
	0	15	30
C1	4,87 ± 0,07	4,20 ± 0,42	4,58 ± 0,07
T1	4,82 ± 0,05	5,657 ± 0,07	7,22 ± 0,10
C2	4,89 ± 0,07	4,80 ± 0,00	4,73 ± 0,07
T2	4,89 ± 0,20	5,42 ± 0,07	5,76 ± 0,10

ANEXO 2. Imágenes utilizadas en el trabajo

Figura 1.

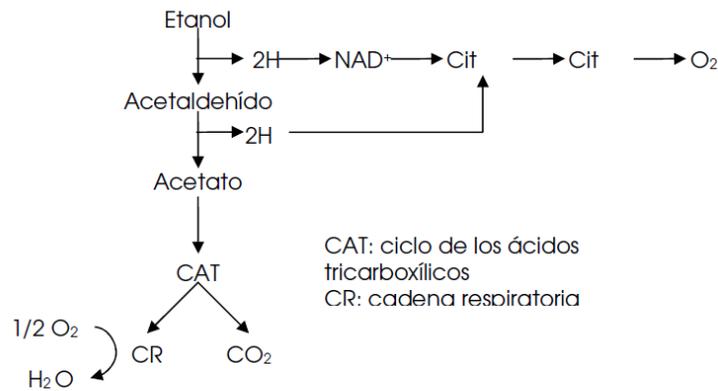
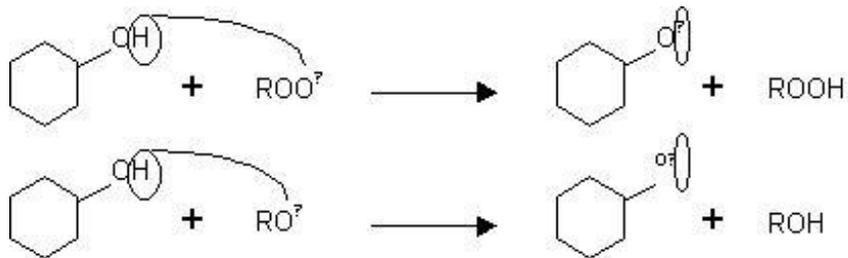


Figura 2.



ANEXO 3. Mediciones de pH

		Dia 0	Dia 15	Dia 30
Tratamiento 1	B1I20°R1	3,23	3,28	3,33
	B1I20°R2	3,21	3,27	3,33
	B2I20°R1	3,2	3,27	3,35
	B2I20°R2	3,2	3,27	3,34
	B3I20°R1	3,19	3,3	3,35
	B3I20°R2	3,18	3,28	3,33
Control 1	B1E20°R1	3,2	3,22	3,3
	B1E20°R2	3,22	3,22	3,29
	B2E20°R1	3,18	3,22	3,28
	B2E20°R2	3,2	3,21	3,29
	B3E20°R1	3,18	3,21	3,3
	B3E20°R2	3,2	3,2	3,29
Tratamiento 2	B1I30°R1	3,23	3,2	3,3
	B1I30°R2	3,17	3,2	3,31
	B2I30°R1	3,18	3,24	3,32
	B2I30°R2	3,18	3,22	3,31
	B3I30°R1	3,21	3,22	3,33
	B3I30°R2	3,19	3,22	3,32
Control 2	B1E30°R1	3,2	3,18	3,26
	B1E30°R2	3,19	3,19	3,27
	B2E30°R1	3,19	3,19	3,27
	B2E30°R2	3,19	3,18	3,26
	B3E30°R1	3,2	3,21	3,27
	B3E30°R2	3,19	3,2	3,27

ANEXO 4. Mediciones Acidez titulable

		Acidez titulable		
		Dia 0 ^a	Dia 15 ^a	Dia 30 ^a
Tratamiento 1	B1I20°R1	3,7	4,3	5,4
	B1I20°R2	3,6	4,2	5,3
	B2I20°R1	3,6	4,3	5,5
	B2I20°R2	3,6	4,2	5,4
	B3I20°R1	3,6	4,3	5,5
	B3I20°R2	3,6	4,2	5,4
Control 1	B1E20°R1	3,7	2,8	3,4
	B1E20°R2	3,7	2,7	3,4
	B2E20°R1	3,7	3,4	3,5
	B2E20°R2	3,6	3,3	3,4
	B3E20°R1	3,5	3,4	3,5
	B3E20°R2	3,5	3,3	3,4
Tratamiento 2	B1I30°R1	3,7	4,1	4,4
	B1I30°R2	3,7	4	4,3
	B2I30°R1	3,7	4	4,2
	B2I30°R2	3,7	4,1	4,3
	B3I30°R1	3,6	4,1	4,3
	B3I30°R2	3,6	4,1	4,4
Control 2	B1E30°R1	3,7	3,6	3,5
	B1E30°R2	3,7	3,6	3,6
	B2E30°R1	3,7	3,6	3,6
	B2E30°R2	3,7	3,6	3,6
	B3E30°R1	3,6	3,6	3,5
	B3E30°R2	3,6	3,6	3,5

^a Volumen de NaOH en ml gastado en la titulacion

Se utilizó la siguiente fórmula para calcular la acidez expresada en g/L de ácido málico

$$\text{Figura 3} \quad \text{AT (g/L)} = \frac{N \times V \times \text{PE}}{v}$$

Dónde:

N = normalidad de la solución NaOH usado para titular (eq/L)

V = volumen de la solución de NaOH gastado en la titulación (L)

v = volumen de la muestra de jugo (L)

PE= peso equivalente de ácido málico (134,09 g/eq)

ANEXO 5. Acidez titulable expresada como ácido málico

	Dia 0	Dia 15	Dia 30
T1	11,026	12,814	16,092
	10,728	12,516	15,794
	10,728	12,814	16,39
	10,728	12,516	16,092
	10,728	12,814	16,39
	10,728	12,516	16,092
C1	11,026	8,344	10,132
	11,026	8,046	10,132
	11,026	10,132	10,43
	10,728	9,834	10,132
	10,728	10,132	10,43
	10,728	9,834	10,132
T2	11,026	12,218	13,112
	11,026	11,92	12,814
	11,026	11,92	12,516
	11,026	12,218	12,814
	10,728	12,218	12,814
	10,728	12,218	13,112
C2	11,026	10,728	10,43
	11,026	10,728	10,728
	11,026	10,728	10,728
	11,026	10,728	10,728
	10,728	10,728	10,43
	10,728	10,728	10,43

ANEXO 6. Valores DPPH y PT para el día 0

Dia 0		
	DPPH ^a	PT ^b
Vino de manzana M1	1094,5	330,8
Vino de manzana M2	1094,1	328,2

(^a) Expresado en $\mu\text{mol TE}/1000\text{ g}$

(^b) Expresado mg de acido galico/1000g vinagre

ANEXO 7. Valores DPPH e IPT para el día 15

Dia 15			
		DPPH ^a	PT ^b
Tratamiento 1	B1I20°R1	795,8	323,0
	B1I20°R2	800,89	326,8
	B2I20°R1	816,0	325,6
	B2I20°R2	817	322
	B3I20°R1	816,0	314,6
	B3I20°R2	815,0	320,45
Control 1	B1E20°R1	872,3	320,9
	B1E20°R2	853,4	325,9
	B2E20°R1	846,2	346,8
	B2E20°R2	840,2	343,4
	B3E20°R1	869,3	313,9
	B3E20°R2	851,9	320,5
Tratamiento 2	B1I30°R1	790,0	241,2
	B1I30°R2	838,7	257,8

	B2I30°R1	810,7	252,7
	B2I30°R2	811,5	246,1
	B3I30°R1	866,6	260,4
	B3I30°R2	859,8	258,4
Control 2	B1E30°R1	854,9	310,3
	B1E30°R2	875,7	301,4
	B2E30°R1	891,6	389,4
	B2E30°R2	876,5	363,4
	B3E30°R1	875,0	316,8
	B3E30°R2	879,1	370,9

(^a) Expresado en $\mu\text{mol TE}/1000 \text{ g}$

(^b) Expresado mg de ácido galico/1000g
vinagre

ANEXO 8. Valores DPPH y PT para el día 30

		Dia 30	
		DPPH ^a	PT ^b
Tratamiento 1	B1I20°R1	790,0	275,9
	B1I20°R2	799,0	280,8
	B2I20°R1	809,7	287,4
	B2I20°R2	807,0	284,2
	B3I20°R1	804,3	285,4
	B3I20°R2	805,6	289,1
Control 1	B1E20°R1	949,0	286,1
	B1E20°R2	958,0	295,1
	B2E20°R1	970,2	306,7

	B2E20°R2	968,4	304,8
	B3E20°R1	969,4	301,9
	B3E20°R2	960,0	302,0
Tratamiento 2	B1I30°R1	774,8	284,7
	B1I30°R2	773,1	282,5
	B2I30°R1	780,5	286,1
	B2I30°R2	777,3	280,0
	B3I30°R1	770,7	288,8
	B3I30°R2	775,1	289,9
Control 2	B1E30°R1	854,9	288,2
	B1E30°R2	853,7	287,3
	B2E30°R1	850,8	289,9
	B2E30°R2	850,1	289,1
	B3E30°R1	849,3	289,6
	B3E30°R2	850,6	295,0

Anexo 9. Datos usados para el análisis estadísticos

		Concentracion de polifenoles mg AGE /1Kg	Actividad antioxidante µmoles TE/1Kg
Dia 15 B3E20 M1	R1	315,9	851,9
	R2	318,5	874,6
	R3	307,2	881,4
	\bar{x}	313,9	869,3
	s	5,9	15,4
Dia 15 B3E20 M2	R1	320,6	833,8
	R2	317,4	863,2
	R3	323,6	858,7
	\bar{x}	320,5	851,9
	s	3,1	15,9

		Concentracion de polifenoles mg AGE /1Kg	Actividad antioxidante µmoles TE/1Kg
Dia 15 B1I20 M1	R1	336,3	810,4
	R2	305,4	802,8
	R3	327,2	818,6
	\bar{x}	323,0	810,6
	s	15,9	7,9
Dia 15 B1I20 M2	R1	330,1	814,6
	R2	305,8	801,6
	R3	320,3	819,9
	\bar{x}	318,7	812,0
	s	12,2	9,4

		Concentracion de polifenoles mg AGE /1Kg	Actividad antioxidante μmoles TE/1Kg
Dia 15 B2I20 M1	R1	322,8	790,7
	R2	323,2	832,6
	R3	330,8	824,7
	\bar{x}	325,6	816,0
	s	4,5	22,3
Dia 15 B2I20 M2	R1	325,1	793,7
	R2	333,5	830,4
	R3	339,9	824,5
	\bar{x}	332,8	816,2
	s	7,4	19,7

		Concentracion de polifenoles mg AGE /1Kg	Actividad antioxidante μmoles TE/1Kg
Dia 15 B3I20 M1	R1	309,7	821,3
	R2	321,4	814,5
	R3	312,7	812,2
	\bar{x}	314,6	816,0
	s	6,1	4,7
Dia 15 B3I20 M2	R1	310,4	819,1
	R2	320,6	816,3
	R3	307,4	813,2
	\bar{x}	312,8	816,2
	s	6,9	3,0

		Concentracion de polifenoles mg AGE /1Kg	Actividad antioxidante μ moles TE/1Kg
Dia 15 B1E30 M1	R1	285,7	878,0
	R2	329,0	891,6
	R3	316,3	795,2
	\bar{x}	310,3	854,9
	s	22,2	52,1
Dia 15 B1E30 M2	R1	281,7	876,9
	R2	324,3	891,6
	R3	298,1	858,7
	\bar{x}	301,4	875,7
	s	21,5	16,5

		Concentracion de polifenoles mg AGE /1Kg	Actividad antioxidante μ moles TE/1Kg
Dia 15 B2I30 M1	R1	243,6	769,2
	R2	254,1	816,8
	R3	260,3	846,2
	\bar{x}	252,7	810,7
	s	8,5	38,9
Dia 15 B2I30 M2	R1	240,3	774,8
	R2	243,6	802,0
	R3	254,5	857,6
	\bar{x}	246,1	811,5
	s	7,4	42,2

		Concentración de polifenoles mg AGE /1Kg	Actividad antioxidante μmoles TE/1Kg
Dia 15 B3I30 M1	R1	261,8	858,7
	R2	261,4	871,2
	R3	258,1	870,0
	\bar{x}	260,4	866,6
	s	2,0	6,9
Dia 15 B3I30 M2	R1	258,1	856,4
	R2	259,2	868,9
	R3	257,8	854,2
	\bar{x}	258,4	859,8
	s	0,8	7,9

		Concentración de polifenoles mg AGE /1Kg	Actividad antioxidante μmoles TE/1Kg
Dia 30 B3I30 M1	R1	278,5	760,1
	R2	297,4	761,2
	R3	290,5	790,7
	\bar{x}	288,8	770,7
	s	9,6	17,4
Dia 30 B3I30 M2	R1	288,1	766,4
	R2	279,2	768,9
	R3	277,8	754,2
	\bar{x}	281,7	763,2
	s	5,6	7,9

		Concentración de polifenoles mg AGE /1Kg	Actividad antioxidante µmoles TE/1Kg
Dia 30 B2I30 M1	R1	272,7	768,0
	R2	294,5	786,2
	R3	291,2	787,3
	\bar{x}	286,1	780,5
	s	11,8	10,8
Dia 30 B2I30 M2	R1	280,3	774,8
	R2	273,6	762,0
	R3	264,5	787,6
	\bar{x}	272,8	774,8
	s	7,9	12,8

		Concentración de polifenoles mg AGE /1Kg	Actividad antioxidante µmoles TE/1Kg
Dia 30 B1I30 M1	R1	272,7	757,8
	R2	290,8	774,8
	R3	290,5	791,8
	\bar{x}	284,7	774,8
	s	10,4	17,0
Dia 30 B1I30 M2	R1	285,6	777,4
	R2	278,1	759,6
	R3	293,6	760,0
	\bar{x}	285,8	765,7
	s	7,7	10,1

		Concentración de polifenoles mg AGE /1Kg	Actividad antioxidante µmoles TE/1Kg
Dia 30 B3E30 M1	R1	288,7	811,1
	R2	293,0	871,2
	R3	287,2	865,5
	\bar{x}	289,6	849,3
	s	3,0	33,2
Dia 30 B3E30 M2	R1	287,9	823,9
	R2	278,3	861,6
	R3	266,6	851,9
	\bar{x}	277,6	845,8
	s	10,6	19,6

		Concentración de polifenoles mg AGE /1Kg	Actividad antioxidante µmoles TE/1Kg
Dia 30 B2E30 M1	R1	287,2	827,0
	R2	291,2	861,0
	R3	291,2	864,4
	\bar{x}	289,9	850,8
	s	2,3	20,7
Dia 30 B2E30 M2	R1	298,1	861,4
	R2	275,0	841,6
	R3	280,3	856,4
	\bar{x}	284,5	853,1
	s	12,1	10,3

		Concentración de polifenoles mg AGE /1Kg	Actividad antioxidante µmoles TE/1Kg
Dia 30 B1E30 M1	R1	287,2	827,0
	R2	289,7	873,4
	R3	287,6	864,4
	\bar{x}	288,2	854,9
	s	1,4	24,6
Dia 30 B1E30 M2	R1	281,7	846,9
	R2	290,3	831,6
	R3	298,1	858,7
	\bar{x}	290,0	845,7
	s	8,2	13,6

		Concentración de polifenoles mg AGE /1Kg	Actividad antioxidante µmoles TE/1Kg
Dia 30 B3I20 M1	R1	282,5	799,8
	R2	281,7	786,2
	R3	291,9	827,0
	\bar{x}	285,4	804,3
	s	5,7	20,8
Dia 30 B3I20 M2	R1	288,4	800,1
	R2	277,6	796,3
	R3	291,4	813,2
	\bar{x}	285,8	803,2
	s	7,3	8,9

		Concentración de polifenoles mg AGE /1Kg	Actividad antioxidante µmoles TE/1Kg
Dia 30 B2I20 M1	R1	279,9	816,8
	R2	290,1	806,6
	R3	292,3	805,8
	\bar{x}	287,4	809,7
	s	6,6	6,1
Dia 30 B2I20 M2	R1	275,1	793,7
	R2	293,5	800,4
	R3	279,9	808,5
	\bar{x}	282,8	800,9
	s	9,5	7,4

		Concentración de polifenoles mg AGE /1Kg	Actividad antioxidante µmoles TE/1Kg
Dia 30 B1I20 M1	R1	289,0	805,4
	R2	274,8	749,9
	R3	263,9	814,5
	\bar{x}	275,9	790,0
	s	12,6	35,0
Dia 30 B1I20 M2	R1	280,1	800,6
	R2	275,8	780,6
	R3	290,3	804,9
	\bar{x}	282,1	795,4
	s	7,4	13,0

		Concentración de polifenoles mg AGE /1Kg	Actividad antioxidante µmoles TE/1Kg
Dia 30 B3E20 M1	R1	313,7	958,5
	R2	298,1	968,7
	R3	293,7	981,1
	\bar{x}	301,9	969,4
	s	10,5	11,4
Dia 30 B3E20 M2	R1	300,6	983,8
	R2	287,4	963,2
	R3	313,6	958,7
	\bar{x}	300,5	968,6
	s	13,1	13,4

		Concentración de polifenoles mg AGE /1Kg	Actividad antioxidante µmoles TE/1Kg
Dia 30 B2E20 M1	R1	316,3	942,6
	R2	306,8	974,3
	R3	297,0	993,6
	\bar{x}	306,7	970,2
	s	9,6	25,8
Dia 30 B2E20 M2	R1	301,0	964,7
	R2	299,7	940,6
	R3	285,6	955,3
	\bar{x}	295,4	953,5
	s	8,6	12,2

		Concentración de polifenoles mg AGE /1Kg	Actividad antioxidante μmoles TE/1Kg
Dia 30 B1E20 M1	R1	272,7	949,4
	R2	287,9	957,3
	R3	297,7	940,3
	\bar{x}	286,1	949,0
	s	12,6	8,5
Dia 30 B1E20 M2	R1	280,9	950,7
	R2	285,6	948,6
	R3	295,0	961,0
	\bar{x}	287,2	953,4
	s	7,2	6,6

ANEXO 10. Curva de calibración Absorbancia (765 nm) versus concentración de ácido gálico en metanol a partir de 4 repeticiones

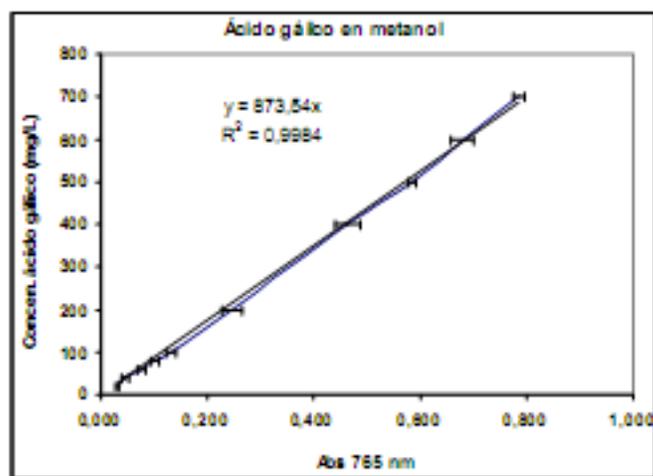


Figura 10 – 1. Curvas de calibración absorbancia (765 nm) versus concentración de ácido gálico en agua (A) y metanol (B) determinadas a partir de 4 repeticiones.

ANEXO 11. Supuestos de normalidad

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
antioxi dantes	,085	144	,013	,945	144	,000

a Corrección de la significación de Lilliefors

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Concentracion de Polifenoles	,109	150	,000	,943	150	,000

a Corrección de la significación de Lilliefors

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Acidez Titulable (g/L)	,279	72	,000	,813	72	,000

a Corrección de la significación de Lilliefors

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
pH	,199	72	,000	,897	72	,000

a Corrección de la significación de Lilliefors

ANEXO 12. Kruskal Wallis Polifenoles

KRUSKAL-WALLIS ONE-WAY NONPARAMETRIC AOV FOR CP BY TRAT DAY 30

TRAT	MEAN RANK	SAMPLE SIZE
1	52.1	18
2	29.1	18
3	35.5	18
4	29.3	18
TOTAL	36.5	72

KRUSKAL-WALLIS STATISTIC 14.3976

P-VALUE, USING CHI-SQUARED APPROXIMATION 0.0024
 COMPARISONS OF MEAN RANKS OF CP BY TRAT

TRAT	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
1	52.083	I
3	35.500	II
4	29.306	.. I
2	29.111	.. I

KRUSKAL-WALLIS ONE-WAY NONPARAMETRIC AOV FOR CP BY TRAT DAY 15

TRAT	MEAN RANK	SAMPLE SIZE
1	46.1	18
2	40.1	18
3	50.3	18
4	9.5	18
TOTAL	36.5	72

KRUSKAL-WALLIS STATISTIC 42.1353
 P-VALUE, USING CHI-SQUARED APPROXIMATION 0.0000
 COMPARISONS OF MEAN RANKS OF CP BY TRAT

TRAT	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
3	50.306	I
1	46.139	I
2	40.056	I
4	9.5000	.. I
REJECTION LEVEL		0.050

C1. COMPARISONS OF MEAN RANKS OF CP BY DIA		
DIA	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
0	37.250	I
15	35.361	I
30	9.888	.. I
REJECTION LEVEL		0.050

T1. COMPARISONS OF MEAN RANKS OF CP BY DIA		
DIA	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
0	39.583	I
15	33.417	I
30	9.500	.. I
REJECTION LEVEL		0.050

C2. COMPARISONS OF MEAN RANKS OF CP BY DIA		
DIA	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
15	35.750	I
0	35.000	I
30	11.750	.. I
REJECTION LEVEL		0.050

T2. COMPARISONS OF MEAN RANKS OF CP BY DIA		
DIA	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
0	45.500	I
30	27.500	.. I
15	9.500 I
REJECTION LEVEL		0.050

Anexo 13. Kruskal Wallis anitoxidantes

KRUSKAL-WALLIS ONE-WAY NONPARAMETRIC AOV FOR CA BY TRAT DAY 15

	MEAN	SAMPLE	
TRAT	RANK	SIZE	
1	43.4	18	
2	16.0	18	
3	56.7	18	
4	29.9	18	
TOTAL	36.5	72	
KRUSKAL-WALLIS STATISTIC			37.6862
P-VALUE, USING CHI-SQUARED APPROXIMATION			0.0000
COMPARISONS OF MEAN RANKS OF CA BY TRAT			
TRAT	MEAN RANK	HOMOGENEOUS	GROUPS
3	56.667		I
1	43.389		II
4	29.917		.. II
2	16.028	 I
REJECTION LEVEL			0.050

KRUSKAL-WALLIS ONE-WAY NONPARAMETRIC AOV FOR CA BY TRAT DAY 30

	MEAN	SAMPLE	
TRAT	RANK	SIZE	
1	63.5	18	
2	26.3	18	
3	45.2	18	
4	11.0	18	
TOTAL	36.5	72	
KRUSKAL-WALLIS STATISTIC			63.9882
P-VALUE, USING CHI-SQUARED APPROXIMATION			0.0000
CASES INCLUDED 72 MISSING CASES 0			
COMPARISONS OF MEAN RANKS OF CA BY TRAT			
TRAT	MEAN RANK	HOMOGENEOUS	GROUPS
1	63.500		I
3	45.167		I
2	26.306		.. I
4	11.028		.. I
REJECTION LEVEL			0.050

C1. COMPARISONS OF MEAN RANKS OF CA BY DIA		
DIA	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
0	45.500	I
30	27.500	.. I
15	9.500	... I
REJECTION LEVEL		0.050

T1. COMPARISONS OF MEAN RANKS OF CA BY DIA		
DIA	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
0	45.500	I
15	23.528	.. I
30	13.472	.. I
REJECTION LEVEL		0.050

C2. COMPARISONS OF MEAN RANKS OF CA BY DIA		
DIA	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
0	45.500	I
15	24.389	.. I
30	12.611	.. I
REJECTION LEVEL		0.050

T2. COMPARISONS OF MEAN RANKS OF CA BY DIA		
DIA	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
0	45.500	I
15	26.667	.. I
30	10.333	... I
REJECTION LEVEL		0.050

ANEXO 14. Kruskal Wallis Acidez titulable

KRUSKAL-WALLIS ONE-WAY NONPARAMETRIC AOV FOR AT2 BY TRAT DAY 15

TRAT	MEAN RANK	SAMPLE SIZE
1	3.5	6
2	21.5	6
3	9.5	6
4	15.5	6
TOTAL	12.5	24

KRUSKAL-WALLIS STATISTIC 22.1390
P-VALUE, USING CHI-SQUARED APPROXIMATION 0.0001

COMPARISONS OF MEAN RANKS OF AT2 BY TRAT

TRAT	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
2	21.500	I
4	15.500	II
3	9.500	.. II
1	3.500	... I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.
REJECTION LEVEL 0.050

KRUSKAL-WALLIS ONE-WAY NONPARAMETRIC AOV FOR AT2 BY TRAT Day 30

TRAT	MEAN RANK	SAMPLE SIZE
1	4.0	6
2	21.5	6
3	9.0	6
4	15.5	6
TOTAL	12.5	24

KRUSKAL-WALLIS STATISTIC 21.3484
P-VALUE, USING CHI-SQUARED APPROXIMATION 0.0001

COMPARISONS OF MEAN RANKS OF AT2 BY TRAT

TRAT	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
2	21.500	I
4	15.500	II
3	9.000	.. II
1	4.000	... I
REJECTION LEVEL		0.050

DIA	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
0	15.500	I
30	8.833	II
15	4.166	..I
REJECTION LEVEL		0.050

DIA	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
30	15.500	I
15	9.500	II
0	3.500	.. I
REJECTION LEVEL		0.050

DIA	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
0	14.000	I
15	9.000	II
30	5.500	.. I
REJECTION LEVEL		0.050

DIA	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
30	15.500	I
15	9.500	II
0	3.500	.. I
REJECTION LEVEL		0.050

ANEXO 15. Kruskal Wallis pH

KRUSKAL-WALLIS ONE-WAY NONPARAMETRIC AOV FOR PH BY TRAT DAY 30

TRAT	MEAN RANK	SAMPLE SIZE
1	9.7	6
2	21.3	6
3	3.5	6
4	15.6	6
TOTAL	12.5	24

KRUSKAL-WALLIS STATISTIC 21.3081
P-VALUE, USING CHI-SQUARED APPROXIMATION 0.0001

COMPARISONS OF MEAN RANKS OF PH BY TRAT

TRAT	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
2	21.250	I
4	15.583	II
1	9.666	.. I I
3	3.500 I
REJECTION LEVEL		0.050

KRUSKAL-WALLIS ONE-WAY NONPARAMETRIC AOV FOR PH BY TRAT DAY 15

TRAT	MEAN RANK	SAMPLE SIZE
1	11.7	6
2	21.5	6
3	4.4	6
4	12.4	6
TOTAL	12.5	24
KRUSKAL-WALLIS STATISTIC		18.0853
P-VALUE, USING CHI-SQUARED APPROXIMATION		0.0004

COMPARISONS OF MEAN RANKS OF PH BY TRAT

TRAT	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
2	21.500	I
4	12.417	II
1	11.667	II
3	4.416	.. I
REJECTION LEVEL		0.050

C1. COMPARISONS OF MEAN RANKS OF PH BY DIA		
DIA	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
30	15.500	I
15	8.500	II
0	4.500	.. I
REJECTION LEVEL		0.050

T1. COMPARISONS OF MEAN RANKS OF PH BY DIA		
DIA	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
30	15.500	I
15	9.500	II
0	3.500	.. I
REJECTION LEVEL		0.050

C2. COMPARISONS OF MEAN RANKS OF PH BY DIA		
DIA	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
30	15.500	I
0	7.000	.. I
15	6.000	.. I
REJECTION LEVEL		0.050

T2. COMPARISONS OF MEAN RANKS OF PH BY DIA		
DIA	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
30	15.500	I
15	8.333	II
0	4.666	.. I
REJECTION LEVEL		0.050