



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA REPÚBLICA
(PROPAC)
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**SELECCIÓN DE LEVADURAS NATIVAS A PARTIR DE VARIEDADES DE
MANZANA PARA LA ELABORACIÓN DE SIDRAS ESPUMOSAS**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.A. Alma Karina León Teutli

Dirigido por:

Dr. Ramón Álar Martínez Peniche

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

SELECCIÓN DE LEVADURAS NATIVAS A PARTIR DE VARIETADES DE
MANZANA PARA LA ELABORACIÓN DE SIDRAS ESPUMOSAS

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Presenta:

I.A. Alma Karina León Teutli

Dirigido por:

Dr. Ramón Álar Martínez Peniche

Dr. Ramón Álar Martínez Peniche
Presidente


Firma

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Secretario


Firma

Dra. Lourdes Soto Muñoz
Vocal

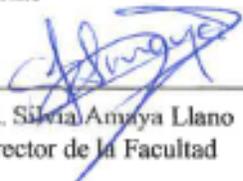
Lourdes Soto M.
Firma

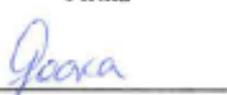
M. en C. Jesús Alejandro Aldrete Tapia
Suplente


Firma

M. en C. Dalia Elizabeth Miranda Castilleja
Suplente


Firma


Dra. Silvia Amaya Llano
Director de la Facultad


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Diciembre 2018

RESUMEN

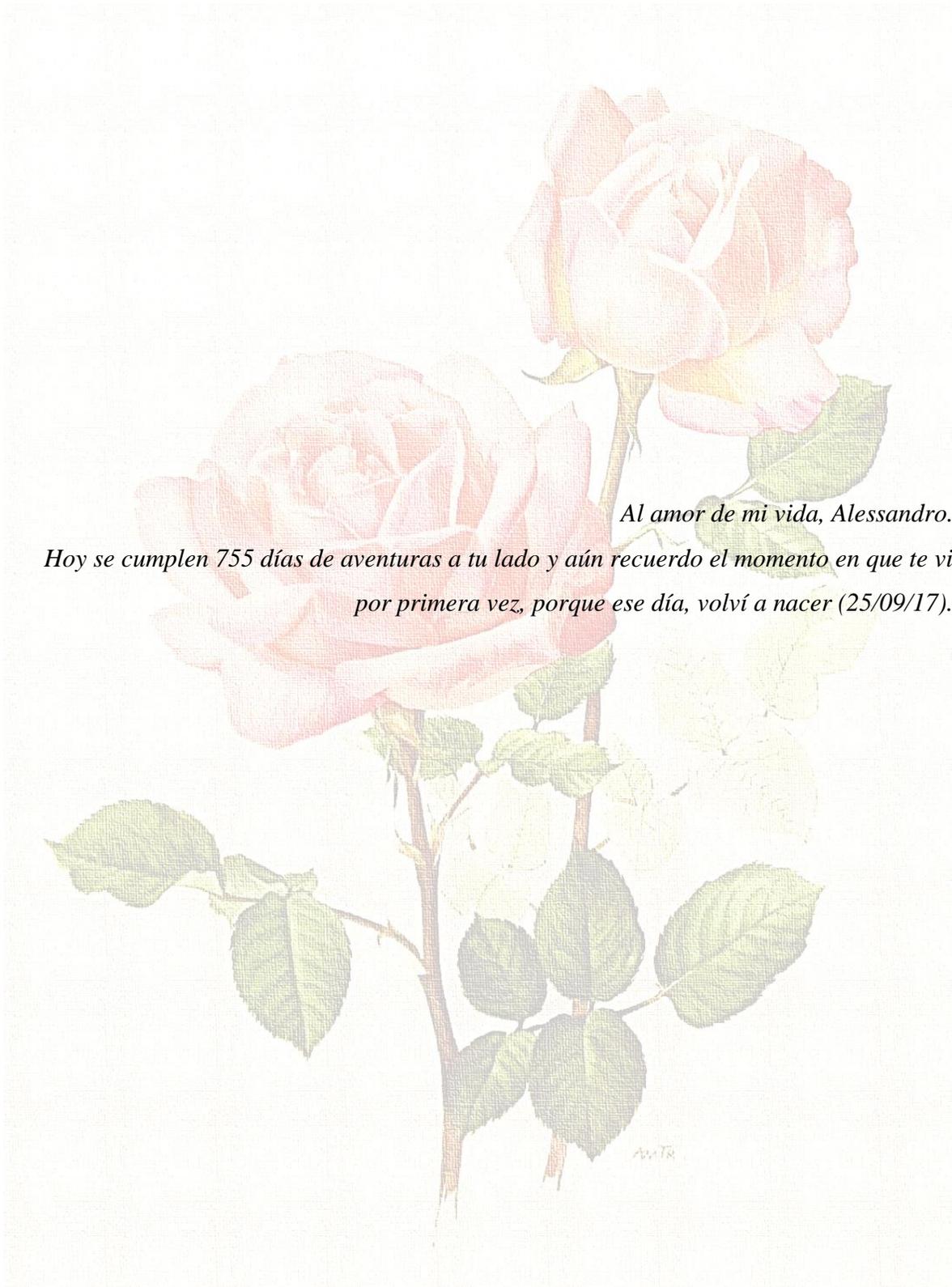
El estado de Querétaro cuenta con zonas aptas para el cultivo del manzano, sin embargo, la baja calidad de la manzana no permite su eficiente comercialización en fresco. Una alternativa es la producción de sidra espumosa, bebida que proviene de dos fermentaciones secuenciales, llevada a cabo por levaduras del género *Saccharomyces*. La selección de levaduras nativas de este género puede tener un impacto positivo en la calidad del producto. El objetivo de este trabajo fue seleccionar levaduras nativas de manzanas de la región para la elaboración de sidras espumosas. Se indujo la fermentación espontánea del mosto de 14 variedades de manzana, provenientes de Amealco, Querétaro, durante las cuales se aislaron 135 cepas, siendo 103 *Saccharomyces* y 32 no-*Saccharomyces*. De las primeras, se seleccionaron tres cepas (**MM7**, **436.4** y **RY5**) que mostraron tolerancia a 8 % de etanol, 50 mg/L de SO₂ y 3 atm de presión, que presentaron fenotipo *killer*, actividad β -glucosidasa y fueron altamente floculantes. Posteriormente, para determinar su potencial fermentativo, éstas se evaluaron en microfermentaciones. En la primera fermentación se comparó a una nativa (**MM7**) con una comercial (**K1**), desarrollándose ambas fermentaciones completas obteniendo sidras secas similares en relación al contenido de glucosa (1.70 a 1.78 g/L), pH (3.57 y 3.63), acidez total (4.03, y 4.19 g/L de ácido málico) y acidez volátil (0.27 y 0.35 g/L de ácido acético). Las sidras tranquilas de **MM7** se embotellaron y se les agregó el licor de tiraje ocupando tres cepas nativas seleccionadas **MM7**, **436.4**, **RY5** y **K1**; las cuales finalizaron la fermentación alcanzando 6 atm de presión a los 21 días. Las sidras espumosas realizadas a partir de las cepas **MM7** y **436.4**, fueron consideradas las de mejor calidad espumante y aspectos visual, olfativo y gustativo, mientras que para la prueba de preferencia de Kramer no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. La amplificación del dominio ITS1/ITS4 permitió la identificación de las cepas **MM7** y **436.4** pertenecientes a *Saccharomyces cerevisiae* y **RY5** a *Saccharomyces paradoxus*. El presente trabajo permitió la obtención de levaduras nativas que cuentan con características deseables para la elaboración de sidras espumosas de calidad y típicas de la región.

Palabras clave: manzana, sidra espumosa, *Saccharomyces*, segunda fermentación.

SUMMARY

Querétaro possesses suitable areas for apple farming, however the low quality of the fruit leads to deficient marketing. An alternative is the production of sparkling cider, a beverage that arises from a second fermentation, carried out by yeasts of the genus *Saccharomyces*. Selecting native strains will impact on the tipicity and quality of the cider. The objective of this work was to select native yeasts from Queretaro's apple orchards to produce sparkling ciders. From spontaneous fermentation of must of 14 apple varieties, 135 strains were isolated, 103 corresponded to *Saccharomyces* and 32 to non-*Saccharomyces*. From the former, three strains were selected (**MM7**, **436.4** and **RY5**) due to their tolerance to 8 % ethanol, 50 mg/L of SO₂ and 3 atm of pressure, as well as for their *killer* phenotype, β-glucosidase activity and high flocculation. Then, these strains were evaluated in microfermentations to determine their fermentative potential. In the alcoholic fermentation, the selected strain **MM7** and commercial strain **K1**, completed fermentations to obtain comparable dry ciders based on sucrose (1.70 to 1.78 g/L), pH (3.57 and 3.63), total acidity (4.03, and 4.19 g/L of malic acid) and volatile acidity (0.27 and 0.35 g/L of acetic acid). The still ciders of **MM7** were bottled and the *liqueur de tirage* was inoculated which included selected strains **MM7**, **436.4**, **RY5** and commercial **K1**; all finished the fermentation with approximately 6 atm of pressure at 21 days. The sparkling cider obtained from strains **MM7** and **436.4**, were considered the best for their foaming quality and visual, olfactory and gustatory aspects, while for the Kramer preference test there were no significant statistical differences between strains. The amplification of the ITS1/ITS4 domain allowed the identification of strains **MM7** and **436.4** belonging to *Saccharomyces cerevisiae* and **RY5** to *Saccharomyces paradoxus*. This research allowed to select native yeasts with desirable characteristics for the production of quality sparkling cider.

Key words: apple, sparkling cider, *Saccharomyces*, second fermentation.



*Al amor de mi vida, Alessandro.
Hoy se cumplen 755 días de aventuras a tu lado y aún recuerdo el momento en que te vi
por primera vez, porque ese día, volví a nacer (25/09/17).*

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo de esos grandes seres que tengo a mi lado. Uno de ellos, el motor de mi vida; mi hijo Ale que sin duda todo esto es por ti, el esfuerzo y dedicación a este trabajo se verá reflejado en un futuro que sin duda es sólo para ti. Deseo ser tu mayor orgullo y el mejor ejemplo a seguir para que te superes como hasta ahora que, siendo tan pequeño, me lo has demostrado. Te amo hijo, y no hay palabras para expresar la felicidad que me llena el caminar de tu mano ante cualquier obstáculo.

Otras personas que no por mencionarlas después impliquen menos renombre son Tere y Jaimito, mis abuelos que, gracias a ellos y su confianza depositada en mi he culminado este grado escolar y que sin duda desempeñaré para seguir superándome tanto profesional como personalmente.

A mis padres y mi hermano por el inmenso cariño y apoyo, por darme las herramientas necesarias para ser un gran ser humano.

A mi director de tesis, el Dr. Peniche porque me brindó la confianza y seguridad para cumplir con este proyecto, es mi mayor ejemplo de lucha, perseverancia y tenacidad.

A Dalia y Alejandro, por su amistad, cariño, comprensión y apoyo, porque durante mi estancia se convirtieron en mi familia y mi mejor guía.

A mi comité por las aportaciones a este trabajo y que sin ellos no hubiera sido posible llegar a cumplir este sueño.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero otorgado para la realización de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	3
SUMMARY	4
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABLAS	12
I. INTRODUCCIÓN	13
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Generalidades del manzano	15
2.1.1. Taxonomía y variedades	15
2.1.2. Morfología	16
2.2. Importancia y distribución del manzano	17
2.2.1. Origen	17
2.2.2. Situación internacional de la manzana	18
2.2.3. Nacional	18
2.2.4. Regional	19
2.3. La Sidra	20
2.3.1. Importancia Nacional	20
2.3.2. Tipos de sidra	20
2.3.3. Fermentación alcohólica de la sidra	21
2.3.4. Elaboración de sidras espumosas	22
2.4. Calidad sensorial de las sidras espumosas	25
2.4.1. Características visuales	25
2.4.1.1. Color	26
2.4.1.2. Efervescencia	26
2.4.2. Características gustativas	28
2.4.3. Características olfativas	28
2.5. Levaduras fermentativas	29
2.5.1. Clasificación	29
2.5.2. Levaduras en mostos de manzana y sidra	30
2.5.3. Levaduras <i>Saccharomyces</i>	30
2.6. Selección de levaduras autóctonas	31
2.6.1. Criterios de selección de levaduras	31

III.	OBJETIVOS	35
3.1.	Objetivo General	35
3.2.	Objetivos Específicos.....	35
IV.	Metodología.....	36
4.1.	Sitio experimental	36
4.2.	Material biológico.....	36
4.3.	Aislamiento de levaduras	37
4.4.	Caracterización de las cepas de levaduras	38
4.4.1.	Efecto <i>killer</i>	38
4.4.2.	Actividad β -glucosidasa	39
4.4.3.	Capacidad de floculación.....	39
4.4.4.	Velocidad de fermentación.....	39
4.4.5.	Tolerancia a etanol y anhídrido sulfuroso	39
4.4.6.	Tolerancia a la presión.....	40
4.5.	Elaboración de sidra espumosa.....	40
4.6.	Análisis físicos y químicos de las sidras.....	41
4.6.1.	Densidad	41
4.6.2.	Potencial de hidrógeno (pH).....	41
4.6.3.	Anhídrido sulfuroso libre, total y combinado.....	41
4.6.4.	Sólidos solubles totales ($^{\circ}$ Bx).....	42
4.6.5.	Grado alcohólico.....	42
4.6.6.	Acidez total titulable.....	42
4.6.7.	Acidez volátil.....	43
4.6.8.	Azúcares reductores totales	43
4.7.	Análisis sensoriales	44
4.8.	Identificación por PCR de las levaduras seleccionadas	45
4.9.	Diseños de los experimentos y análisis estadísticos	45
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
5.1.	Aislamiento de levaduras.....	47
5.2.	Caracterización de las cepas de levaduras aisladas.....	48
5.2.1.	Efecto <i>killer</i> y actividad β -glucosidasa	48
5.2.2.	Capacidad floculante	51
5.2.3.	Velocidad de fermentación.....	53

5.2.4. Tolerancia a etanol y SO ₂	54
5.2.5. Tolerancia a la presión	56
5.3. Microfermentaciones	59
5.3.1. Primera fermentación	59
5.3.2. Características físicas y químicas de las sidras tranquilas	63
5.3.3. Segunda fermentación.....	67
5.3.4. Características físicas y químicas de las sidras espumosas.....	70
5.4. Análisis sensorial	72
5.4.1. Calidad de la efervescencia.....	72
5.4.2. Evaluación de los aspectos visual, olfativo y gustativo.....	75
5.4.2.1. Prueba hedónica no estructurada.....	75
5.4.2.2. Prueba de rangos de Kramer	77
5.6. Identificación molecular de las levaduras.....	78
VI. CONCLUSIONES.....	81
VII. BIBLIOGRAFÍA	83
VIII. Anexos.....	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
2.1.	Anatomía del fruto de manzano.	17
2.2.	Pasos para la elaboración de un vino espumoso, mediante el método “ <i>Champenoise</i> ” (Lemonnier y Duteurtre, 1989).	23
2.3.	Pasos del removido.	24
5.1.	Evolución de la densidad del mosto de 14 variedades de manzana.	48
5.2.	Efecto <i>killer</i> de distintas cepas. Se observa un halo de inhibición en aquellas cepas consideradas <i>killer</i> .	49
5.3.	Actividad β -glucosidasa de algunas cepas. Se observa una coloración marrón en aquellas cepas que tienen la enzima degradadora, a).	50
5.4.	Evaluación visual de la capacidad floculante de la cepa 429a.1	51
5.5.	Índice de floculación de 64 levaduras seleccionadas.	52
5.6.	Evaluación visual de la velocidad de fermentación de la cepa 436.4 .	53
5.7.	Velocidad de fermentación de 43 cepas de levaduras seleccionadas.	54
5.8.	Evaluación de la turbidez de la cepa de referencia K1 y dos cepas seleccionadas, RY5 y RY9 .	55
5.9.	Levaduras seleccionadas sometidas a un proceso de 2ª fermentación en botella, para evaluar su tolerancia a 3 atm de presión.	57
5.10.	Tolerancia a presión (3 atm) de las 10 levaduras seleccionadas.	57
5.11.	Evolución de la densidad del mosto de manzana durante la primera fermentación en función de la cepa de levadura.	60
5.12.	Cinética de crecimiento de las cepas de levaduras K1 y MM7 durante la primera fermentación de sidra espumosa.	61
5.13.	Densidad en relación a la cinética de crecimiento en función de la cepa de levadura.	62
5.14.	Evolución de la presión en función de la levadura utilizada para la segunda fermentación de la sidra tranquila de base obtenida a partir de la levadura nativa seleccionada MM7 .	69

- 5.15. Productos de la amplificación ITS1/ITS4 de la subunidad 5.8S, de las tres cepas nativas *Saccharomyces*. En los carriles: marcador de peso molecular (1kb), control negativo, control positivo, **436.4**, **RY5** y **MM7**. 78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
2.1.	Clasificación taxonómica del manzano.	15
2.2.	Producción de manzana a nivel nacional.	18
2.3.	Producción de manzana en municipios del estado de Querétaro.	19
2.4.	Clasificación de la sidra según su contenido de azúcar.	21
2.5.	Tipos de vinos espumosos.	25
2.6.	Atributos sensoriales evaluados en sidras espumosas.	27
2.7.	Características deseables para la selección de levaduras fermentativas.	32
4.1.	Principales características de las variedades utilizadas.	36
5.1.	Efecto <i>killer</i> y actividad β -glucosidasa de 103 levaduras <i>Saccharomyces</i> seleccionadas.	51
5.2.	Resultados de la presión de las sidras espumosas elaboradas a partir de 10 levaduras seleccionadas, en el día 42 de fermentación.	58
5.3.	Características físicas y químicas de sidras tranquilas en función de la levadura utilizada.	64
5.4.	Características físicas y químicas de sidras espumosas en función de la levadura utilizada para la segunda fermentación.	70
5.5.	Evaluación sensorial mediante prueba hedónica no estructurada de la calidad de efervescencia de sidras espumosas elaboradas con distintas cepas de levaduras seleccionadas nativas.	73
5.6.	Evaluación sensorial por medio de prueba hedónica de sidras espumosas obtenidas con distintas cepas de levaduras.	76
5.7.	Prueba de preferencia de Kramer de sidras espumosas.	77
5.8.	Identificación y confiabilidad obtenida para las tres cepas de levaduras seleccionadas.	79

I. INTRODUCCIÓN

El manzano (*Malus domestica* Borkh) es una de las especies cultivadas más importantes en el mundo, lo cual se debe a que, además de consumirse en fresco se obtienen distintos derivados de su fruto, tales como: postres, jugos, sidra, néctares, yogurt, fruta deshidratada, refrescos, vinagre y licores (SAGARPA, 2012).

En México, el manzano ocupa el primer lugar en superficie entre los frutales caducifolios con 53,691 ha, siendo los principales estados productores: Chihuahua, Puebla, Durango y Coahuila (SIAP, 2017).

El estado de Querétaro cuenta con zonas climáticas adecuadas para el cultivo del manzano bajo condiciones de temporal, principalmente en los municipios de San Joaquín, Cadereyta de Montes, Amealco de Bonfil y Pinal de Amoles, habiendo 422 ha establecidas (SIAP, 2017). Las principales variedades cultivadas son: ‘Golden Delicious’ y ‘Red Delicious’ (Paz-Cuadra *et al.*, 2014). Además, el genetista Aroldo Rumayor Flores en el año 2001 introdujo nuevos materiales mutantes e híbridos de diversos orígenes para ampliar la oferta de mercado en fresco (Martínez, 2014).

Entre los factores que limitan la calidad de la manzana en la región podemos citar accidentes climáticos y la mala aplicación de técnicas de cultivo, que propician que la fruta no reúna las características para su comercialización en fresco (Paz, Cuadra *et al.*, 2014).

Como alternativas de solución, tenemos la producción de derivados con factibilidad de comercialización en cualquier época del año, que no demanden fuertes gastos de inversión y cuyo proceso de elaboración resulte viable en el contexto en el que se desarrolla la fruticultura regional. Uno de los productos que mejor se adecúa a estas necesidades es la sidra, que se define como el producto de la fermentación alcohólica del mosto de manzana a partir de levaduras (Nogueira y Wosiacki, 2012).

La sidra puede ser tranquila o espumosa, como la tipo champagne. La primera se obtiene a partir de una sola fermentación alcohólica realizada por levaduras del género *Saccharomyces* que pueden encontrarse de forma nativa en la manzana, mientras que la segunda se consigue a partir de una segunda fermentación al interior de la botella hermética en el seno de la sidra tranquila de base, también llamada “fermentación carbónica” (Herrero *et al.*, 2010).

Esta fermentación propicia un incremento en la presión interna de la botella y la aparición de efervescencia al momento del descorche (Alonso *et al.*, 2015). La efervescencia es fundamental en la calidad de la sidra y depende en gran medida del tipo de microorganismo involucrado en la segunda fermentación (Mangas, 2010).

El uso de cepas seleccionadas nativas de *Saccharomyces* puede tener un efecto sobre la calidad y tipicidad del producto. Entre las características que pueden considerarse deseables para la selección de levaduras en la elaboración de sidra espumosa se encuentran: la tolerancia a anhídrido sulfuroso y etanol, actividad β -glucosidasa, efecto *killer*, tolerancia a altas presiones de CO₂ y la capacidad de floculación (Suárez *et al.*, 2008).

Aunque existen múltiples trabajos relacionados con la selección de cepas de levaduras nativas en otras bebidas alcohólicas, como el vino, poco se ha investigado en sidras. Pando *et al.* (2010) aislaron levaduras durante la fermentación del mosto de manzana asturiana y caracterizaron su fenotipo *killer*, actividad β -glucosidasa y producción de ácido sulfhídrico (H₂S). Suárez *et al.* (2008) aislaron y determinaron la tolerancia a etanol, producción de ácido acético y H₂S, y su capacidad floculante de levaduras *Saccharomyces* spp., para la producción de sidra espumosa por el método *Champenoise* bajo condiciones industriales.

En estudios previos llevados a cabo en Querétaro por nuestro grupo de trabajo se evaluó el efecto del tipo de levadura comercial y el nivel de azúcar sobre la calidad del producto (Ramírez-Mora *et al.*, 2005) y la clarificación en la segunda fermentación sobre la calidad de efervescencia mediante análisis de imágenes (Soto-Herrera *et al.*, 2008). Sin embargo, hasta el momento no se ha caracterizado el potencial fermentativo de las levaduras nativas presentes en la manzana de la región.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue aislar cepas de levaduras *Saccharomyces* durante la fermentación espontánea del mosto de diversas variedades de manzana de la región, y seleccionarlas con base en sus características deseables para la elaboración de sidras espumosas.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Generalidades del manzano

2.1.1. Taxonomía y variedades

El manzano es un árbol de la familia *Rosaceae* (Tabla 2.1), cultivado por su fruto apreciado como alimento, del cual en la actualidad existen alrededor de 3000 especies que surgen como resultado de hibridaciones entre diversas especies silvestres. En 1984, Korban y Skirvin propusieron el nombre de *Malus domestica* para la manzana cultivada, ya que ésta no existe en el hábitat natural y, por lo tanto, debe ser un híbrido interespecífico, siendo esta denominación la que se ha conservado hasta el momento (Morán, 2014).

Tabla 2.1. Clasificación taxonómica del manzano.

Categoría taxonómica	Nombre
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Tracheopyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Rosales</i>
Familia	<i>Rosaceae</i>
Subfamilia	<i>Pomoideae</i>
Género	<i>Malus</i>

(Fuente: NCBI, 2017)

Las variedades de manzano (*Malus* spp.) suelen clasificarse como manzanas de consumo en fresco o de mesa y de cocina (*M. domestica*), manzanas de sidra (*M. pumila* y *M. domestica*) y manzanas silvestres (*M. pumila*, *M. sylvestris*, *M. mitis*, *M. baccata* y *M. manchurica*) (Bauchard, 1994). Otra clasificación está dada por el sabor de las manzanas: ácidas, amargas y dulces. En general, las manzanas de sidra son ácidas o amargas, las manzanas silvestres son amargas y las manzanas de consumo y de cocina son dulces. Existen unas 250 y 300 variedades de importancia cultivadas de manzana, dentro de las cuales las de sidra componen la mayor parte (Hubert, 1999).

Las variedades de mesa deben contar con características que condicionan su calidad como son: el tamaño, la apariencia y el sabor. Por su parte, en cada región los consumidores demandan manzanas que sean firmes, crujientes, de sabor dulce-acidulado y de color base más verde con tonalidades rojas (Coque *et al.*, 2012). Actualmente, se cuenta con aproximadamente 100 cultivares siendo los principales: ‘Fuji’, ‘Delicious’, ‘Golden Delicious’, ‘Gala’, ‘Granny Smith’, ‘Idared’, ‘Jonagold’, ‘Braeburn’, ‘Cripps Pink’, ‘Jonathan’, ‘Elstar’ y ‘McIntosh’ (Belrose, 2012).

En cuanto a las variedades para la elaboración de sidra, éstas deben tener un equilibrio entre la acidez y los compuestos fenólicos. Existen tres variedades que se agrupan en bloques tecnológicos: tipo ácido y ácido-amargo, tipo dulce y dulce-amargo y tipo amargo, esto es para obtener mostos que den origen a sidras de calidad (Gutiérrez *et al.*, 2016).

2.1.2. Morfología

El manzano es un árbol caducifolio (se defolia durante el invierno), el cual se adapta a las zonas templadas frías y se cultiva en menor medida en climas semiáridos, subtropicales y tropicales, donde se utilizan diversas estrategias para reducir las limitaciones climáticas (Rieger, 2006). Una planta silvestre de manzano llega a medir de 10-15 m de altura, mientras que los cultivados alcanzan de 2 a 5 m (CABI, 2012). Tiene una copa globosa, un tronco erecto, con corteza cubierta de lenticelas, lisa, adherida, de color ceniciento verdoso sobre los ramos, y escamosa y gris pardo sobre las partes viejas del árbol. La planta tiene una vida útil de 60 a 80 años (Gutiérrez, 2014).

El fruto es oblongo, cónico u oblicuo, con diámetro ecuatorial de 2 a 13 cm, presenta varias tonalidades: verdes, amarillas y rojas (Figura 2.1). Según el cultivar, algunos maduran en solo 70 días a partir de la floración, mientras otros necesitan 180 días o más (Cárdenas-Hernández y Fischer, 2013).

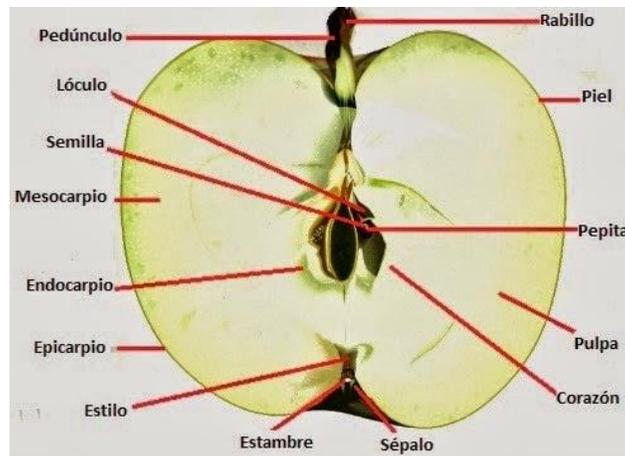


Figura 2.1. Anatomía del fruto de manzano.

2.2. Importancia y distribución del manzano

2.2.1. Origen

El manzano (*Malus domestica* Borkh), es una de las especies de fruta dulce de mayor difusión a escala mundial, debido fundamentalmente a su facilidad de adaptación a diferentes climas y suelos, su valor alimenticio y terapéutico, la calidad y diversidad de productos que se obtienen en la industria transformadora. Por proceder de climas muy fríos resiste las más bajas temperaturas, lo que ha permitido cultivarlo a gran escala en todos los países de clima relativamente fríos, y en particular en todos los de Europa (Infoagro, 2017).

Es un árbol originario de las zonas templadas de Europa, de las montañas del Cáucaso y del Asia Central, se encuentra en estado silvestre desde la prehistoria. Existen vestigios que se remontan a las edades Neolítica y de Bronce (Coque *et al.*, 2012). Aparece principalmente en regiones montañosas poco elevadas de Asia Media y podría ser el manzano del que se habría originado hace 15,000 o 20,000 años las primeras especies cultivadas de este árbol (SAGARPA, 2012a).

El manzano ha sido un cultivo de gran importancia y simbólico a lo largo de la historia y fue introducido en España por los pueblos del norte de África y durante el proceso de romanización de la península. En el siglo XVI, los conquistadores españoles extendieron el cultivo de la manzana al nuevo mundo y, 100 años después, desde Iberoamérica, el manzano emigró a América del Norte y posteriormente a África septentrional y Australia (SAGARPA, 2012a).

2.2.2. Situación internacional de la manzana

La producción de manzana en el mundo para el año 2016 se estimó en 76.2 millones de toneladas, con una mayor producción en China de 44.5 millones de toneladas compensado, en gran medida, por una menor producción en la Unión Europea (UE) de 10 millones de toneladas y 4.7 millones de toneladas en los Estados Unidos (EE.UU.), esto debido a las condiciones meteorológicas adversas. En cuanto al comercio mundial, hubo una disminución de demanda de Bielorrusia, México y Rusia (USDA, 2017).

2.2.3. Nacional

México ocupa el 13er lugar en producción a nivel mundial (SAGARPA, 2017).

Se dispone de una superficie cosechada de manzana de 53,691 ha (SIAP, 2017). La manzana es un cultivo perenne y la cosecha se realiza entre los meses de julio a noviembre, siendo el mes de septiembre donde se obtiene 45.57 % de la producción nacional (Velázquez, 2014).

Los principales estados productores de manzana en México son: Chihuahua, Durango, Puebla y Coahuila (SIAP, 2017). En la Tabla 2.2 se muestran los principales estados productores de manzana en México en superficie y rendimiento.

Tabla 2.2. Producción de manzana a nivel nacional.

Estado	Superficie plantada (ha)	Superficie cosechada (ha)	Producción obtenida (ton)	Rendimiento obtenido (ton/ha)
Chihuahua	28,711	27,833	589,281	21.172
Durango	8,056	7,800	32,645	4.185
Puebla	8,381	7,254	36,542	5.038
Coahuila	5,763	4,403	22,640	5.142
Veracruz	904	868	10,165	11.711
Querétaro	451	422	680	1.612

(Fuente: SIAP, 2017)

El Atlas Agroalimentario 2016 destaca que el consumo *per capita* anual de manzana en el país es de 8.8 kg y en otoño existe una mayor disponibilidad de frutos maduros

(SIAP, 2017). Por su parte, la producción de este fruto tiene como mercado principal la industria de jugos, cuyo precio pagado al productor es menor que el precio de venta del producto en fresco, debido a una menor calidad relativa del producto, por lo que nueva tecnología generaría una oferta que permitiría abastecer parte de la demanda de manzana en fresco (SAGARPA, 2012b).

2.2.4. Regional

En la serranía de Querétaro se cosechan alrededor de 422 ha (SIAP, 2017) de manzano en condiciones de temporal; en altitudes de 2200 a 2600 msnm, con precipitaciones mayores a 800 mm/año y en donde se acumulan alrededor de 600 horas frío durante el invierno de cada año; condiciones propicias para el cultivo de manzano (Fernández *et al.*, 2010). Los principales municipios productores son: San Joaquín, Cadereyta, Amealco y Pinal de Amoles; en la Tabla 2.3 se observa la producción de manzana en el año 2017 por municipio.

Tabla 2.3. Producción de manzana en municipios del estado de Querétaro.

Municipio	Superficie plantada (ha)	Superficie cosechada (ha)	Producción obtenida (ton)	Rendimiento obtenido (ton/ha)
<i>San Joaquín</i>	200	199	201	1.010
<i>Cadereyta de Montes</i>	154	139	264	1.900
<i>Pinal de Amoles</i>	60	60	150	2.500
<i>Amealco de Bonfil</i>	32	19	53	2.800

(Fuente: SIAP,2017)

Las principales variedades que se cultivan en estas regiones son ‘Golden Delicious’, ‘Red Delicious’ y ‘Rayada’, las cuales poseen buenos atributos de calidad pero presentan serias limitantes en la comercialización, debido a daños por granizo, roña (*Venturia inaequalis*), mosca de la manzana (*Rhagoletis pomonella*), heladas durante la floración o por maduración tardía (Fernández *et al.*, 2010).

2.3. La Sidra

La palabra sidra: proviene del latín, *sicera*, bebida fermentada. Es la bebida proveniente de la fermentación del mosto (del latín *mustum*, el jugo) de manzana o de una mezcla de manzanas y de peras, extraídos con o sin adición de agua; ésta es ligeramente alcohólica (de 4 a 8 °GL), de color ámbar y sabor agridulce (De Beaulieu y Ronné, 2000).

2.3.1. Importancia Nacional

La sidra mexicana se produce principalmente en el estado de Puebla en las regiones de Calpan, Cholula, San Martín Texmelucan, Iztacuixtla, Zacatlán y Huejotzingo, siendo este último el principal municipio productor. También se elabora en los estados de Tlaxcala, Aguascalientes y Toluca. En el estado de Querétaro, en la región de San Joaquín, se produce a nivel experimental sidra tranquila artesanal (Hernández, 2011). En estas regiones destaca la producción de sidra dulce y gasificada, la cual se elabora en dos presentaciones: la tradicional de jugo de manzana y la rosada, que es una combinación entre el jugo de manzana y vino tinto

2.3.2. Tipos de sidra

Algunas de las manzanas tradicionalmente cultivadas para sidras se caracterizan por tener altas concentraciones de compuestos fenólicos que brindan una sensación astringente o sabor amargo al fruto, haciéndolas desagradables para el consumo en fresco, pero que brindan a la sidra una complejidad gustativa deseable y cuerpo (Merwin y Pa-Zakour, 2008). Existen muchas variedades de manzana y, por ello, la composición del mosto puede diferir ampliamente de acuerdo con la variedad empleada; estas diferencias afectan principalmente la acidez, sobre todo en la concentración de ácido málico, azúcares y a la fracción fenólica.

Las sidras se clasifican principalmente en función de su contenido de azúcar (Tabla 2.4) y en función de su contenido de gas carbónico.

Tabla 2.4. Clasificación de la sidra según su contenido de azúcar.

Tipo de sidra	Concentración de azúcar (g/L)	Grado alcohólico (°GL)	Densidad (g/mL)
<i>Seca</i>	< 30	> 5	< 1.015
<i>Semiseca</i>	30-50	3-5	1.015
<i>Dulce</i>	> 50	< 3	1.05-1.035

(Fuente: Chandon, 2003; D.O.P. Sidra de Asturias, 2017)

Según su contenido de gas carbónico se clasifica en (Chandon, 2003): tranquila, si contiene bajo CO₂ y es puramente endógeno, y espumosa, puede ser elaborada mediante inyección de gas carbónico en la botella o mediante la inducción de una segunda fermentación, también en botella, obteniéndose una sidra tipo champaña.

2.3.3. Fermentación alcohólica de la sidra

La fermentación alcohólica es el proceso llevado a cabo principalmente por levaduras del género *Saccharomyces* mediante el cual los azúcares presentes en el mosto se transforman en etanol y CO₂ (Hidalgo, 2002).

Su importancia no radica únicamente en la obtención de etanol a partir de los azúcares, sino que también en la formación de una gran cantidad de productos secundarios (Zamora, 2006) como ésteres, responsables de las notas afrutadas y florales (un ejemplo, el acetato de isoamilo que da aroma a plátano), los alcoholes superiores que se derivan del metabolismo de la levadura y que aportan ‘sabores de fondo’ (isopentanoles, isobutanol, propanol, butanol y hexanol) y, los compuestos fenólicos que se derivan de la materia prima, influyen en el color, la dulzura, la acidez, el amargor y la astringencia (como procianidinas) que influyen en la calidad y tipicidad de la sidra (Cousin *et al.*, 2017).

De forma análoga a lo observado en vino, a lo largo del proceso de fermentación espontánea, y en función de las condiciones (cantidad de azúcar disponible, temperatura, oxígeno, etc.) cambiará el tipo de levadura que predomina distinguiéndose varias etapas (Navarre, 1998). Durante la etapa inicial de la fermentación alcohólica se desarrollan principalmente especies no-*Saccharomyces*, siendo mayoritarias las levaduras apiculadas del género *Hanseniapora/Kloeckera*, que se caracterizan por un bajo poder fermentativo y poca

tolerancia al etanol. Posteriormente, conforme avanza la fermentación, predominan las levaduras del género *Saccharomyces* que tienen una alta capacidad fermentativa (Irastorza y Dueñas, 2010).

La adición de levadura permite controlar el arranque de la fermentación alcohólica. De esta forma se reduce el periodo de latencia, periodo durante el cual la flora silvestre puede dar lugar a la aparición de malos sabores y de acidez volátil. Las cualidades que se desean en una cepa de levadura destinada a esta función son las siguientes: desarrollo rápido, buena actividad de fermentación, buen rendimiento azúcar/alcohol, débil producción de acidez volátil, ausencia de malos sabores, etc. (Flanzy, 2003).

2.3.4. Elaboración de sidras espumosas

La elaboración de sidra espumosa se asemeja a la de vinos espumosos, los cuales obtienen su sobrepresión de CO₂ ya sea a partir de la fermentación parcial de azúcares naturales de la manzana, o bien de la refermentación (segunda fermentación) de sacarosa añadida a un vino seco previamente elaborado (vino de base). Dentro de los métodos utilizados para la elaboración de vinos espumosos, se encuentran el método de transferencia o transfer, el método *Charmat* y uno de los métodos más conocidos, es el método clásico o tradicional “*Champenoise*” (Suárez, 2004).

La elaboración de las sidras espumosas por el método tradicional “*Champenoise*” se realiza en dos fermentaciones, la primera en cubas y la segunda dentro de las botellas como único envase; desarrollándose sucesivamente en las siguientes fases: tiraje, rima, pupitre, degüelle y vestido de las botellas (Hidalgo, 2002). En la Figura 2.2. se ilustra este método que es llevado a cabo de la siguiente manera:

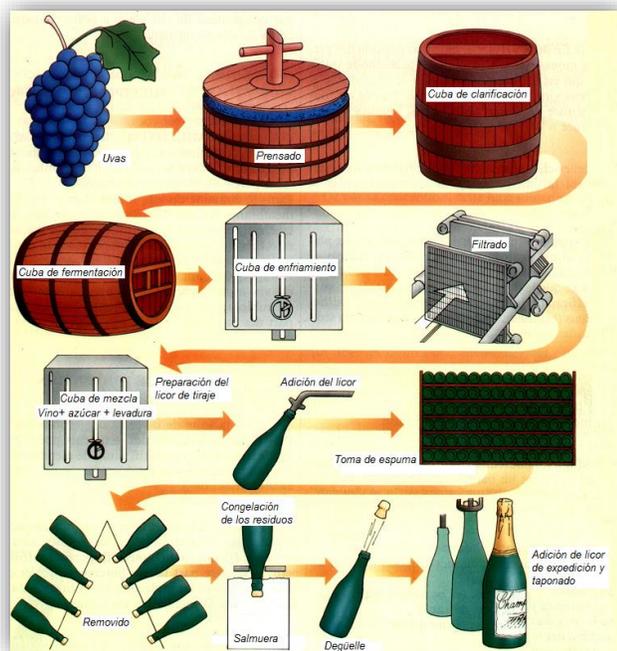


Figura 2.2. Pasos para la elaboración de un vino espumoso, mediante el método “champenoise” (Lemonnier y Duteurtre, 1989).

El procedimiento de elaboración consiste en la extracción del mosto de manzana, el cual se sulfita con metabisulfito de potasio para su conservación. Posteriormente, se desfanga y se inocula con la levadura seleccionada. El mosto se deja fermentar entre 15 °C y 18 °C hasta la disminución de azúcares y de la densidad. Finalizada la primera fermentación se llevan a cabo los trasiegos para lograr una preclarificación y se dispone a verter la sidra tranquila de base en botellas para después adicionar el licor de tiraje, sustancia que consiste en una mezcla de azúcar disuelto en una pequeña porción de sidra base, junto con un iniciador de levaduras *Saccharomyces*. Durante la segunda fermentación se libera gas carbónico propiciando el incremento de la presión interna (Mangas, 2010).

Llegando a término la segunda fermentación, se realiza una clarificación mediante la puesta en pupitre para el removido de lías, el cual consiste en desplazar los sedimentos de levadura en el cuello de la botella de manera que se pueda eliminar a continuación, Las botellas son colocadas sobre soportes de madera que permiten poner las botellas cabeza abajo en posición casi horizontal (25 a 20 grados) al principio del removido, progresivamente, la

botella es girada y levantada para acabar en posición casi vertical (60 a 75 grados) (Flanzy, 2003), como se muestra en la Figura 2.3.

La eliminación de los sedimentos acumulados en el gollete se hace mediante un degüelle, el cual consiste en sumergir el cuello de la botella 5 cm en una solución de agua y un anticongelante a una temperatura de $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$, formándose un tapón de hielo que engloba las lías; pudiendo entonces ponerse la botella en posición vertical, y abrir la botella de forma automática o manual, donde debido a la presión de la fermentación, las levaduras congeladas junto con algo de sidra son expulsadas fuera de la botella (Hidalgo, 2002).



Figura 2.3. Pasos del removido.

Al momento de la expulsión de las lías, se produce una pérdida de 0.6 atmósferas de presión y un 2 % de volumen, que debe ser rellenada con sidra espumosa de la misma partida, pudiendo introducirse previamente un “licor de expedición” azucarado, que permite equilibrar la acidez, enmascarar el sabor amargo y la astringencia (Mangas, 2010). La concentración de azúcar añadido define el tipo de sidra espumosa (Tabla 2.5) (Hidalgo, 2002):

Tabla 2.5. Tipos de vinos espumosos.

Tipo	Azúcares (g/L)
Extra brut	Hasta 6
Brut	Hasta 15
Extra seco	Entre 12 y 20
Seco	Entre 17 y 35
Semi-seco	Entre 33 y 50
Dulce	Más de 50

(Fuente: Hidalgo, 2002)

2.4. Calidad sensorial de las sidras espumosas

La calidad sensorial de la sidra está dada por el color, el aroma, el sabor y la apariencia y depende de la variedad usada, el origen, las prácticas de vinificación, fermentación y maduración. Por su parte, el aroma se rige por factores tecnológicos y la levadura empleada, mientras que el sabor está determinado por la composición de la manzana (Kosseva *et al.*, 2017).

2.4.1. Características visuales

Al conjunto de sensaciones visuales que produce un cuerpo se le denomina apariencia (González, 2010) y es el primer aspecto a evaluar en la sidra espumosa (Jackson, 2017). Ésta indica el origen, estilo, calidad y madurez, así como revela algunos defectos (Keith, 2009).

La apariencia comprende la claridad, el color, la viscosidad y la capacidad espumante (Jackson, 2017). Ésta última es una característica que indica calidad, la cual está definida por la cantidad y persistencia de la espuma. Una espuma de calidad se define como aquella que causa una liberación lenta de CO₂ desde el fondo del líquido con la formación de rosarios, con pequeñas burbujas que forman una corona parcial o total en la superficie de la sidra. Además, el CO₂ disuelto no sólo influye en los atributos visuales ligados a la belleza, sino que también influye de manera significativa sobre el aroma, sabor y color (Martínez-Rodríguez y Pueyo, 2009). La capacidad espumante, así como también la espuma y la efervescencia de la sidra espumosa dependen de factores intrínsecos (variedad de la manzana,

estado de maduración y sanitario) y de factores extrínsecos (forma de servir el vino, limpieza de la copa) (Andrés-Lacueva *et al.*, 1996).

2.4.1.1. Color

El color de la sidra es claro (ámbar), esto debido a la presencia de pigmentos presentes en la manzana como clorofilas, carotenoides y compuestos fenólicos. Estos últimos, se oxidan fácilmente dando tonos amarillos, dorados o marrones según avanza el grado de oxidación (González, 2010).

2.4.1.2. Efervescencia

Durante la segunda fermentación, las levaduras transforman los azúcares presentes en el mosto en etanol y CO₂, este último es responsable de la efervescencia al servir un vino espumoso en la copa (Perret *et al.*, 2014).

La presencia de CO₂ disuelto en la fase líquida es un factor que influye en las propiedades sensoriales como son la frecuencia de formación y el tamaño de las burbujas en la copa, la sensación del colapso en la boca, la excitación quimiosensorial de papilas gustativas, la percepción aromática, ya que al colapsar las burbujas liberan su contenido de CO₂ gaseoso y compuestos volátiles (Dunkel y Hofmann, 2010).

Asimismo, la efervescencia debe estar formada por múltiples trenes de burbujas que se elevan en líneas en distintas partes de la copa, y que al llegar a la superficie forman un anillo, denominado collar. Por otro lado, aunque no se correlaciona la calidad con la finura de las burbujas, para el consumidor resulta agradable una bebida espumosa con burbujas pequeñas (Liger-Belair, 2015).

Las variables que se toman en cuenta para evaluar la efervescencia se muestran en la Tabla 2.6 y se describen a continuación (González, 2010):

Tabla 2.6. Atributos sensoriales evaluados en sidras espumosas.

Atributos sensoriales	Descripción	Puntuación
Espuma inicial	Se forma inmediatamente después de servir la sidra.	Abundante Normal Pobre
Persistencia de la espuma	El tiempo que tarda en desaparecer la espuma después del servido de la sidra.	Rápido Normal Lento
Número de sitios de nucleación	Número de trenes de burbujas.	Más de cinco Menos de cinco Nulo
Tamaño de la burbuja	Se observa desde el origen de nucleación hasta la superficie de la sidra.	Pequeña Mediana Grande
Collar de espuma	Encaje de burbujas formado alrededor de la superficie de la sidra.	Total y delgado Total y gruesa Parcial Superficial Nula
Calidad de la espuma en general	Evaluación de la calidad general de la espuma	Excelente Muy buena Buena Regular Mala Muy mala Deficiente

(Fuente: Picinelli *et al.*, 2005)

- a) *Corona*. Es la espuma formada en la superficie de la copa. Se dice que es abundante si llena toda la copa y persiste un tiempo superior al de su formación, es considerada normal cuando llena toda la copa y se reduce con la misma velocidad con la que se ha formado; y se denomina escasa cuando la espuma formada no llena la copa y desaparece en pocos segundos.
- b) *Collar*. Al desaparecer la corona queda un círculo de burbujas en la superficie del líquido, el cual debe permanecer por lo menos 20 segundos. Este círculo puede ocupar toda la superficie, denominándose total o pueden quedar burbujas cubriendo una parte del mismo (encajes) o bien las burbujas se disponen formando una circunferencia anexa a las paredes de la copa, que puede ser completa o parcial. Además, éstos pueden estar formados por dos o más capas de burbujas superpuestas, conocidas como densas o por una capa, definiéndose como formaciones finas.

c) *Burbujas*. En la formación de burbujas se evalúan tres parámetros; el primero es la formación de trenes, se llaman así a las líneas de burbujas que se forman en el seno del líquido y ascienden a la superficie. Otro aspecto, es el tamaño de las burbujas, las cuales pueden ser grandes, medianas o pequeñas. Y por último se observa la velocidad con la que las burbujas ascienden desde el fondo de la copa a la superficie, que puede ser rápida, media o lenta. Para que se considere un vino espumoso de calidad, debe tener más de cinco trenes, burbujas pequeñas y una velocidad de ascenso rápida (Liger-Belair, 2015).

2.4.2. Características gustativas

Se evalúan las sensaciones táctiles y el sabor detectados por las papilas gustativas en la boca, como resultado de los compuestos volátiles de la sidra espumosa que se respiran por la vía retronasal. Esto se clasifica por etapas: la impresión inicial al degustar la sidra, seguido del desarrollo en el paladar donde se percibe la intensidad del sabor y finalmente el tiempo que se conservan los sabores en el paladar después de escupir (Keith, 2009).

Los sabores característicos de la sidra son el dulce, el cual se debe al azúcar residual y el alcohol, el ácido, que es consecuencia de los ácidos málico, quínico, láctico, dihidrosiquímico, citramálico, succínico y acético, y finalmente el amargo, siendo responsables las proantocianidinas (González, 2010).

2.4.3. Características olfativas

Los aromas se perciben mediante vía nasal directa, es decir, se realiza una breve inhalación, verificando que la bebida no está defectuosa, también se pueden detectar algunos aromas delicados; y por vía retronasal, (de la cavidad bucal a las fosas nasales). Posteriormente, la bebida se airea para liberar los compuestos volátiles (Keith, 2009).

Los aromas que se perciben en la sidra son frutales y se deben a la presencia de acetatos de isoamilo y hexilo, y florales que se asocian a compuestos volátiles como 2-feniletanol o acetato de 2-feniletilo. El aroma típico a “sidra” ha sido vinculado a diferentes compuestos, entre los que se encuentra el hemiacetal 1-etoxi-5-octen-1-ol y los 1,3-dioxanos derivados de la acetalización de diversos alcoholes como el octano-1,3-diol, el 5-octen-1,3-diol o la glicerina; que son típicos de la manzana y están tanto en forma glicosilada en el

fruto, transformándose en acetales en el transcurso de la fermentación. La presencia de aldehídos procedentes del fruto y del metabolismo de las levaduras, como el acetaldehído, el propanal, el butanal, el 2-metilpropanal, el hexanal, el 3-metilbutanal y el 2-metilbutanal, así como de polialcoholes, da lugar a la formación de los denominados aromas “verdes” (González, 2010).

El aroma se forma por diversas reacciones químicas y enzimáticas que ocurren en la elaboración de la sidra espumosa. Los compuestos responsables del aroma son alcoholes, aldehídos, acetonas, ésteres, ácidos volátiles, terpenos, piracinas, entre otros. Éstos se clasifican según su procedencia: el aroma primario o varietal lo otorga el fruto utilizado, el aroma secundario se genera durante la etapa fermentativa y el terciario o *bouquet* durante la crianza sobre lías (Caliari *et al.*, 2015).

2.5. Levaduras fermentativas

Las levaduras son microorganismos unicelulares eucariontes pertenecientes al reino *Fungi* con una forma esférica u apiculada. Su ciclo vegetativo se produce normalmente por bipartición o fisión binaria (casi siempre asimétrica) o por gemación (Montoya, 2008).

2.5.1. Clasificación

Las levaduras son un grupo diverso filogenéticamente de hongos. Sus estados sexuales (telemorfos) pueden ser clasificados principalmente en dos clases, los *Ascomycetes* y los *Basidiomycetes* (Hidalgo, 2010).

Las principales especies de levaduras asociadas a la fermentación de la sidra pertenecen al grupo de los ascomicetos. Algunos estudios sobre las levaduras de la sidra han demostrado que la composición de la microbiota puede variar según las condiciones climáticas, variedades de manzana, ubicación geográfica y la tecnología empleada. Las levaduras autóctonas *no-Saccharomyces* con una baja capacidad de fermentación se desarrollan habitualmente durante las primeras etapas del proceso, mientras que las cepas con mayor tolerancia al etanol (*Saccharomyces* spp.) completan la fermentación, ya que tienen un alto poder fermentativo, son vigorosas y resistentes al dióxido de azufre (Pando *et al.*, 2010).

2.5.2. Levaduras en mostos de manzana y sidra

En cuanto a la microbiota encontrada en manzana madura, hay que destacar la presencia de *Rhodotorula*, *Candida*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Kloeckera/Hanseniaspora*. Las especies de *Saccharomyces* y otras levaduras esporulantes se encuentran escasamente en la manzana. El número y diversidad de levaduras se incrementa en cada etapa de la recolección, transporte y almacenamiento de la manzana, especialmente de *K. apiculata* (Irastorza y Dueñas, 2010).

Con respecto a las levaduras implicadas en la fermentación alcohólica y su dinámica de poblaciones, se observa una gran similitud entre los procesos de fermentación de sidras y vinos (Irastorza y Dueñas, 2010).

Tradicionalmente, las especies *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, dentro del denominado complejo *Saccharomyces sensu stricto*, son consideradas como las más importantes del proceso fermentativo. Se han encontrado, también especies híbridas resultantes del cruce entre especies diferentes de *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* x *S. bayanus*; *S. bayanus* x *S. uvarum*) (Irastorza y Dueñas, 2010).

2.5.3. Levaduras *Saccharomyces*

Saccharomyces spp es un hongo unicelular de forma elipsoidal con un diámetro de 5 a 10 μm , y es la levadura predominante en la producción de bebidas fermentadas, siendo *S. cerevisiae* la especie más estudiada y predominante (Walker, 2011).

El metabolismo de *Saccharomyces* permite que crezca en ambientes tanto aerobios como anaerobios, en la fase aerobia se caracteriza por la producción de biomasa y en la fase anaerobia por la producción de etanol. Por otro lado, se desarrolla en temperaturas de entre 20 y 30 $^{\circ}\text{C}$ y pH de 4.5 a 6.5.

Asimismo, la composición nutricional del medio fermentativo es de vital importancia para el crecimiento de la levadura y la calidad del producto final. Éste debe contar con glucosa, sales de amonio, iones inorgánicos y algunos factores de crecimiento. Los macronutrientes se suministran a concentraciones milimolares, comprendiendo fuentes de carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, potasio y magnesio. Los micronutrientes son necesarios en concentraciones micromolares, como el calcio, cobre, hierro, manganeso y zinc (Walker y Setewart, 2016).

Cuando las levaduras se incuban en medios fermentativos favorables, se produce una curva típica de crecimiento que comprende: la 1) fase de latencia, periodo de adaptación fisiológica, 2) fase exponencial, donde las células se reproducen sin limitaciones nutritivas, 3) fase estacionaria, lapso donde el crecimiento celular desciende ya que se metabolizaron los sustratos disponibles y finalmente, la 4) fase de muerte, etapa en la que las células mueren debido a que la reserva energética se terminó (Ingledeew, 1999).

2.6. Selección de levaduras autóctonas

Las levaduras autóctonas como cultivos iniciadores permiten la obtención de un producto más diferenciado y característico de la zona; las cuales están totalmente adaptadas a las condiciones climatológicas, materia prima y son responsables, parcialmente, de las características únicas de las bebidas fermentadas (Martín *et al.*, 2015).

2.6.1. Criterios de selección de levaduras

La sidra base generalmente se caracteriza por una concentración de etanol (6 a 8 % v/v), azúcares reductores (90 g/L), acidez total (3.5-7.5 g de ácido málico/L), dióxido de azufre total (300 mg/L) y CO₂ (6 atm), según la NOM-199-SCFI-2017. Es por ello que se debe realizar una selección rigurosa de los cultivos iniciadores de levadura que toleren dichas condiciones. En la Tabla 2.7 se mencionan las características generales que una cepa de levadura debe presentar para ser seleccionada para la producción de sidras espumosas.

Tabla 2.7. Características deseables para la selección de levaduras fermentativas.

Primera fermentación	Segunda fermentación
Resistencia a bajas temperaturas (10-15 °C), SO ₂ (80-200 mg/L), pH (2.9-3.2) y etanol (10-12 % v/v)	Fenotipo <i>killer</i>
Baja producción de acidez volátil	Ausencia de aromas desagradables
Baja producción de compuestos azufrados	Floculación
Alta eficiencia fermentativa	Propiedades espumosas
Actividades enzimáticas deseadas (β -glucosidasa, β -xilosidasa, proteasa, poligalacturonasa, pectinasa, glucanasa, xilanasa, descarboxilasa)	Autólisis
Producción de metabolitos deseados (glicerol, ácido succínico, acetaldehído, n-propanol, iso-butanol, alcohol isoamílico y β -feniletanol)	Producción de CO ₂ (6 atm)

(Fuente: Garofalo *et al.*, 2012)

El etanol en la sidra afecta el crecimiento de la levadura, la viabilidad y la capacidad de llevar a cabo la segunda fermentación. Ésta prueba implica la exposición de las levaduras a diferentes concentraciones de etanol y el control de su crecimiento (Martí-Raga *et al.*, 2016).

El dióxido de azufre (SO₂) es un agente antimicrobiano y antioxidante que se utiliza para evitar la oxidación de la sidra, estabilizar el medio microbiológico y permite una acción diferencial sobre las poblaciones de levaduras, si bien esta actividad va a depender de la concentración empleada, del pH del mosto y de la presencia de compuestos que se unen al SO₂. Se considera en general, que las poblaciones de levaduras no-*Saccharomyces* son más sensibles a la acción inhibitoria de este compuesto (Irastorza y Dueñas, 2010). Las cepas que garantizan una fermentación completa cuando la concentración de dióxido de azufre libre y total son superiores a 30 y 50 mg/L, respectivamente, son adecuadas para la elaboración de sidra (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

Otra característica tecnológica de interés es la presencia del fenotipo *killer*, una levadura “asesina” es aquella capaz de secretar una o más proteínas tóxicas de bajo peso molecular, que resultan letales para levaduras sensibles (Todd *et al.*, 2000). La actividad *killer* fue descubierta inicialmente en *S. cerevisiae*, pero ha sido descrita en otros géneros de levaduras como *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kloeckera/Hanseniaspora*, *Pichia*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Torulopsis*, *Williopsis* y *Zygosaccharomyces* (Schmitt y Breinig, 2002).

La enzima β -glucosidasa tiene la capacidad de catalizar reacciones de transglucosilación (Jatinder *et al.*, 2007). Muchos compuestos aromáticos potenciales presentes en las manzanas como los terpenos (linalool, geraniol, nerol, citronelol, α -terpineol, óxido de linalool, entre otros) (Palmeri y Spagna, 2007) están en forma de glucósidos no volátiles, que al conjugarse dan los precursores de aroma y sabor en la sidra (Ibarz *et al.*, 2006). Estos compuestos están usualmente presentes en dos fracciones: 1) una fracción libre, que contribuye directamente al aroma del mosto; y 2) una fracción ligada, que forma glucósidos no aromáticos (estos glucósidos pueden liberar posteriormente su carga aromática). La fracción ligada es cuantitativamente más significativa que la fracción libre en la hidrólisis catalizada por la enzima β -glucosidasa que libera los terpenos responsables del aroma afrutado (Arévalo-Villena *et al.*, 2006).

Otra característica biológica que debe tomarse en cuenta para la selección de cultivos iniciadores, es la capacidad floculante, debido a que facilita la eliminación del sedimento al momento del degüelle y evita la adherencia a la botella impidiendo la turbidez del producto final (Carrascosa *et al.*, 2011).

Finalmente, una de las características más importantes en una sidra espumosa, es la calidad de su espuma. Por esta razón resulta importante seleccionar una levadura que confiera una buena calidad espumante. Una espuma de calidad se define como aquella que causa una liberación lenta de CO₂ desde el fondo del líquido; esto no sólo influye en las características visuales sino también en su aroma y color (Martínez-Rodríguez y Pueyo, 2009).

La presencia de presión al interior de la botella y de compuestos tensoactivos en la sidra son capaces de formar una interfase líquido-gas para la formación y estabilidad de la espuma (Buxaderas y López-Tamames, 2010). Para que una burbuja de CO₂ pueda formarse debe separar a las moléculas que la rodean, por lo que se necesita de un proceso conocido

como nucleación. La acumulación de burbujas es lo que conduce a la formación de espuma (Liger-Belair *et al.*, 2012).

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Aislar cepas de levaduras *Saccharomyces* nativas durante la fermentación del mosto de diversas variedades de manzana con potencial para la elaboración de sidras espumosas de calidad.

3.2. Objetivos Específicos

- Aislar levaduras *Saccharomyces* a partir de la fermentación del mosto de diversas variedades de manzana establecidas en la región de Amealco, Querétaro.
- Seleccionar levaduras *Saccharomyces* con base en características deseables para la primera y segunda fermentación de sidra espumosa.
- Determinar el efecto de las levaduras seleccionadas sobre la calidad de la sidra espumosa.
- Identificar molecularmente a nivel especie las levaduras seleccionadas.

IV. METODOLOGÍA

4.1. Sitio experimental

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fermentaciones y Fisiología de Frutas de la UAQ, así como en huertos experimentales establecidos en la comunidad de San José Itho. Amealco, Querétaro.

4.2. Material biológico

Por una parte, además de las levaduras aisladas se utilizó la cepa de referencia K1-V1116 (Lallemand®) y una cepa sensible a *killer* AH22 (ATCC38626).

Además se utilizaron 14 variedades de manzanas enlistadas junto con sus características en la Tabla 4.1, las cuales se encuentran establecidas en un huerto fenológico en Amealco, Querétaro.

Tabla 4.1. Principales características de las variedades utilizadas.

Variedad	Origen	Descripción
‘429a’	‘Anna’ x CLR9T10	Maduración: intermedia. Color: rojo liso. Destino: fruto de mesa.
‘Joya’	Desconocido, posiblemente ‘Anna’ x ‘Gala’	Maduración: temprana. Color: rojo estriado. Destino: fruto de mesa. Fruto de tamaño medio, muy aromático, crujiente y jugoso en madurez fisiológica.
‘424’	‘Anna’ x ‘Princesa’	Maduración: temprana. Color: amarillo. Destino: fruto de mesa.
‘429b’	‘Anna’ x CLR9T10	Maduración: intermedia. Color: rojo. Destino: fruto de mesa. Posiblemente se trate del genotipo 429a aunque es de mayor tamaño.
‘467’	‘Anna’ x ‘Liberty’	Maduración: temprana. Color: amarillo. Destino: fruto de mesa.
‘Golden Delicious’	‘Golden Reineta’ x ‘Grimes Golden’	Maduración: intermedia. Color: amarillo liso, a veces ligeramente chapeado. Destino: fruto de mesa e industria, buenas cualidades para elaboración de sidra. Cultivar más conocido en el mundo.

‘Red Delicious’	Selección de Madison.	Maduración: intermedia. Color: rojo estriado. Destino: fruto de mesa y de industria. Cultivar más difundido en el mundo.
‘Rayada’	Desconocido. Importada de EE.UU. en la década de los 60’s.	Maduración: temprana. Color: rojo estriado. Destino: fruto de mesa. Manzana de calidad y tamaño chico.
‘436’	‘Anna’ x ‘Gala’	Maduración: temprana a intermedia. Color: rojo, chapeada y estriada. Destino: fruto de mesa. Genotipo con mayor aceptación. Gran rendimiento y vigor.
‘Royal Gala’	Aparentemente mutante de ‘Gala’, cuyo origen es Nueva Zelanda.	Maduración: intermedia. Color: rojo. Destino: fruto de mesa.
‘Aguanueva’	Mutante de ‘Golden Delicious’ obtenida en el poblado de Agua Nueva, Coahuila por el Ing. Aroldo Rumayor.	Maduración: intermedia. Color: amarillo. Destino: fruto de mesa. Es uno de los grandes mutantes obtenidos en México, su principal cualidad es su bajo requerimiento de frío, su productividad y vigor.
‘428’	‘Anna’ x ‘Gala’	Maduración: temprana. Color: rojo estriado, no colorea muy bien. Destino: fruto de mesa. Variedad de calidad.
‘Malus x Micromalus’	China, híbrido natural entre dos especies de la familia Rosaceae ‘Malus baccata’ x ‘Malus spectabilis’	Maduración: intermedia. Color: rojo liso. Destino: industria. Fuerte vigor y frutos pequeños y agridulces, muestra capacidad prometedora para la elaboración de conservas.
‘Rosada tintorera’	Desconocido, criollo de Amealco.	Maduración: intermedia. Color: rojo, pulpa rosada. Destino: fruto de mesa e industria, posiblemente para la elaboración de sidras dado su carácter tintorero y su gusto agridulce.

(Fuente: Martínez, 2014)

4.3. Aislamiento de levaduras

Se obtuvo el mosto de las distintas variedades por separado con un extractor estándar (Turmix), midiendo la acidez total titulable, sólidos solubles totales, densidad y pH (OIV, 2017). Los mostos se ajustaron a 20 °Bx con sacarosa, se sulfitaron a razón de 50 mg/L

de SO₂ utilizando metabisulfito de potasio y se colocaron a 3 °C por 24 h para su desfangado, para realizar una preselección de los microorganismos de interés.

Posteriormente, los mostos se fermentaron a 19 ± 1 °C y, tanto durante la fermentación ($\rho = 1,03$ g/mL) como a su término ($\rho = 0,99$ o 1,00 g/mL), se tomaron alícuotas de 1 mL con las cuales se realizaron diluciones decimales, se sembraron 100 μ L de cada una por extensión en placa con Agar Nutritivo-Dextrosa para levaduras (NYDA: 8 g/L de caldo nutritivo, 20 g/L de agar, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de dextrosa en 1 L de agua destilada) suplementado con cloranfenicol (100 mg/L) y rosa de bengala (60 mg/L), incubándose 2 d a 28 °C. De las placas se aislaron cinco colonias con morfología contrastante y fueron purificadas mediante su siembra en medio NYDA.

Las cepas aisladas fueron diferenciadas mediante tres pases consecutivos en medio agar Lisina selectivo para no- *Saccharomyces*, incubándolas a 25 °C durante 2 d. Aquellas cepas no crecidas en el medio, fueron consideradas como *Saccharomyces* (Medina *et al.*, 2007).

4.4. Caracterización de las cepas de levaduras

Se realizó la selección de aquellas levaduras nativas que presentaron fenotipo *killer*. actividad β -glucosidasa, fueron mediana y altamente floculantes, altamente fermentativas, tolerantes a 8 % de etanol, 50 mg/L de SO₂ y a 3 atm de presión.

4.4.1. Efecto *killer*

Se preparó un inóculo de la cepa de referencia sensible a *killer* AH22 a una concentración de 1×10^7 UFC/mL en 50 mL de Caldo Nutritivo-Dextrosa (NYDB: 8 g/L de caldo nutritivo, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de dextrosa en 1 L de agua destilada). Posteriormente, el inóculo se adicionó en medio NYDA con azul de metileno (0.2 %) y NaCl (1 %), ajustado a pH entre 4,6 y 4,8 con solución amortiguadora de fosfato-citrato. Una vez solidificado el medio se inocularon 5 μ L de las levaduras aisladas a una concentración de 5×10^6 UFC/mL de las cepas a evaluar y el control positivo (K1-V1116), y se incubaron durante 72 h a 25 °C. La cepa evaluada fue considerada *killer* cuando alrededor de ella se observó un halo de inhibición delimitado por un borde azul (Lopes y Sangorrin, 2010).

4.4.2. Actividad β -glucosidasa

Primeramente, cada cepa previamente cultivada en caldo NYDB (48 h a 28 °C), se estrió sobre medio agar esculina-glicerol (EGA: esculina 1 g/L, cloruro férrico 0,3 g/L, hidrolizado de caseína 1 g/L, extracto de levadura 25 g/L, glicerol 8 mL/L y agar 20 g/L) con pH ajustado a 6,0 con ácido clorhídrico y las placas se incubaron a 25 °C por 2 d. Si las cepas tenían actividad β -glucosidasa, la esculina β -glucosido del medio, se hidrolizaba en esculetina (6,7-dihidroxycumarina) y glucosa, posteriormente, la esculetina libre reaccionaba con los iones férricos presentes en el medio dando una coloración marrón (Pérez *et al.*, 2011).

4.4.3. Capacidad de floculación

La capacidad de floculación de las levaduras aisladas se determinó según lo propuesto por Suárez *et al.* (2008) con ligeras modificaciones. Las cepas se inocularon en 5 mL de caldo NYDB y se incubaron a 30 °C durante 72 h. Después de la incubación, los cultivos se centrifugaron a 4000 rpm por 2 min, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 5 mL de solución amortiguadora de Helm (3 mmol/L de cloruro de calcio, 50 mmol/L de solución amortiguadora de acetato-acético, pH 4,5). El grado de floculación se determinó mediante la relación entre la densidad óptica a 620 nm de la suspensión de cultivo y la obtenida 120 min después de añadir la solución amortiguadora de Helm ($OD_{10}/OD_0 \times 100$), expresada en porcentaje. Se consideró una floculación media cuando la relación se encontraba entre 30 % y 70 % y una floculación alta cuando la relación fue inferior a 30 %.

4.4.4. Velocidad de fermentación

Para la velocidad de fermentación, cada cepa se inoculó a una concentración de 1×10^6 UFC/mL en tubos con 15 mL de mosto estéril, los cuales se incubaron a 25 °C durante 8 d, midiendo la pérdida de peso por día, la cual se graficó obteniendo la pendiente negativa. A mayor pendiente negativa, se consideró que la levadura era mayormente fermentativa.

4.4.5. Tolerancia a etanol y anhídrido sulfuroso

La tolerancia a etanol y a anhídrido sulfuroso de las cepas de levaduras se determinó mediante la observación de turbidez en el medio. Las cepas fueron activadas previamente en

medio NYDB y se incubaron a 28 °C por 48 h. Finalizado el tiempo de incubación, los cultivos se centrifugaron a 3000 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante y se lavó con solución salina a 0,85 %, y nuevamente se realizó una separación del precipitado y el sobrenadante. Las cepas resuspendidas en solución salina se inocularon a una concentración de 5 Log₁₀ UFC en fosas individuales de placas que contenían medio NYDB ajustado a un pH de 3,8 con ácido clorhídrico, adicionado con etanol (8 %) y metabisulfito de potasio (50 mg/L), incubándose a 25 °C durante 48 h, al término de este tiempo se consideraron como tolerantes a aquellas cepas que generaron turbidez, es decir, que desarrollaron en la condición evaluada (Miranda *et al.*, 2017).

4.4.6. Tolerancia a la presión

Ésta se evaluó realizando microfermentaciones utilizando mosto estéril. El mosto se ajustó a 20 °Bx con sacarosa y se indujo a una primera fermentación en matraces estériles utilizando la cepa de referencia (K1-V1116) a una concentración de 10⁸ UFC/mL. Posteriormente, se colocaron 300 mL de sidra tranquila de base en botellas de tereftalato de polietileno (PET), se les agregó 30 g/L de azúcar y se inoculó la cepa de levadura a evaluar a una concentración de 1x10⁸ UFC/mL. Se midió la presión mediante un manómetro (AUTOTEC) cada siete días.

4.5. Elaboración de sidra espumosa

Se seleccionó manzana ‘Golden Delicious’ eliminando los frutos dañados, se lavó, se descorazonó y se extrajo su jugo. El jugo extraído se filtró con una manta estéril, se sulfitó con metabisulfito de potasio a razón de 5 g/HL de SO₂, se desfangó a 3 °C por 24 h y se inoculó (1x10⁵ UFC/mL) con la cepa que resultó más sobresaliente y con una cepa de referencia.

El jugo se fermentó a 19 ± 1 °C (Soto-Herrera *et al.*, 2008) y, al término del proceso, se midió el grado alcohólico, acidez volátil, acidez total titulable, azúcares residuales, anhídrido sulfuroso libre, combinado y total (OIV, 2017).

La sidra tranquila obtenida se trasegó y clarificó con albúmina. Posteriormente, se dividió en lotes correspondientes a las cepas a evaluar. En cada lote se aplicó el licor de tiraje (1x10⁵ UFC/mL de la cepa de levadura y 15 g/L de sacarosa). Cada lote se distribuyó en

botellas de PET de 300 mL y se dejó fermentar a 16 ± 1 °C durante 28 d. La evolución de la presión interna de la botella se midió cada semana con un manómetro (AUTOTEC).

Finalmente, se determinaron los análisis físicos y químicos ya mencionados anteriormente a la sidra espumosa obtenida (OIV, 2017).

4.6. Análisis físicos y químicos de las sidras

Previo a las mediciones, la sidra se agitó durante 10 min para eliminar el gas carbónico presente en éstas.

4.6.1. Densidad

Se determinó mediante un picnómetro Pyrex de 25 mL capacidad, haciendo uso de la siguiente ecuación (OIV, 2017):

$$\rho = \frac{W_M - W_v}{V}$$

Donde:

ρ = densidad g/mL

W_M = peso del picnómetro con muestra (g)

W_v = Peso del picnómetro vacío (g)

V = volumen del picnómetro (mL)

4.6.2. Potencial de hidrógeno (pH)

Se midió el pH mediante un potenciómetro calibrado con soluciones amortiguadoras de 4 y 7 (OIV, 2017).

4.6.3. Anhídrido sulfuroso libre, total y combinado

SO₂ Libre. Se colocaron 50 mL de sidra en un matraz Erlenmeyer al cual se agregaron 5 mL de una solución de almidón (5 g/L), 30 mg de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y 3 mL de H₂SO₄ a 10 %. Se tituló inmediatamente con una solución de yodo a 0,25 M, hasta que el color azul durara de 10 a 15 segundos. El volumen de yodo utilizado se denomina *n*.

SO₂ Combinado. Se agregaron 8 mL de solución de NaOH al 4 M, se agitó la mezcla y se dejó reposar por 5 min. Posteriormente, se agregaron 10 mL de H₂SO₄. Se tituló nuevamente con yodo, en esta ocasión el volumen gastado se tomó como *n'*.

Se agregaron 20 mL de NaOH, la mezcla se agitó y se dejó reposar por 5 min. Se diluyó con 200 mL de agua destilada fría y se agregaron 30 mL de H₂SO₄. Finalmente se tituló con yodo y el volumen gastado se determinó como *n''*.

Los resultados fueron expresados en mg/L y se obtuvieron mediante las siguientes ecuaciones (OIV, 2017):

$$SO_2 \text{ Libre} = 32 \times n$$

$$SO_2 \text{ Total} = 32 \times (n + n' + n'')$$

$$SO_2 \text{ Combinado} = SO_2 \text{ Total} - SO_2 \text{ libre}$$

4.6.4. Sólidos solubles totales (°Bx)

Las mediciones se realizaron diariamente con un refractómetro manual (Atago, N-1E, con escala de °Brix de 0 a 32), a partir de tres gotas de sidra extraída (OIV, 2017).

4.6.5. Grado alcohólico

El porcentaje de alcohol se determinó por el método de destilación directa. Una muestra de 50 mL de sidra, medida con un matraz aforado, fue vertida en un matraz de destilación con 2,5 mL de CaO al 2 M para eliminar la acidez y se destiló 3/4 partes de ésta. La mezcla hidroalcohólica a 20 °C se aforó a 50 mL con agua destilada en el mismo matraz aforado y se evaluó la densidad con un picnómetro de 25 mL. La densidad obtenida se comparó en las tablas de la OIV (2017) de correspondencia con el grado alcohólico.

4.6.6. Acidez total titulable

Se titularon 10 mL de sidra con una solución de NaOH (0,088 M). Con un potenciómetro, se determinó el pH de la solución y se consideró el volumen necesario para neutralizarla, a un pH de 8,2. El volumen empleado de la solución de sosa permitió obtener la acidez total según el algoritmo siguiente (OIV, 2017):

$$ATT = (V_{NaOH} \times M_{NaOH} \times F_{ma} \times 1000) / V_m$$

En donde:

ATT = Acidez total expresada en gramos de ácido málico por litro de sidra.

V_{NaOH} = Volumen de la solución de sosa utilizada.

M_{NaOH} = Molaridad de la solución de sosa utilizada.

Fma = Factor del ácido málico = 0,067

V_m = Volumen de la muestra.

4.6.7. Acidez volátil

Se utilizó el método de García Tena (OIV, 2017). Se destilaron 11 mL de la muestra de sidra con perlas de ebullición. Los primeros 5,1 mL del destilado se recogieron en una probeta y enseguida se colocó otra probeta para recoger 3,2 mL. Ambos destilados fueron titulados con una solución de NaOH a 0,02 N y gotas de fenolftaleína como indicador, hasta un vire al color rosa. Al primer volumen gastado se le denominó N y al segundo N'. Los mililitros gastados para valorar los 3,2 mL, son la acidez volátil real y que se obtuvo mediante la ecuación: Ácido acético = $N' \times 0,366$ en g/L y para la acidez volátil aparente, se suma a la real, el valor hallado al multiplicar N x 0,122.

4.6.8. Azúcares reductores totales

Se utilizó el método de Fehling Causse Bonnans. A 45 mL de sidra se añadieron 5 mL de acetato básico de plomo a 20 % y 0.5 g de carbón activado para defecar, es decir, eliminar la coloración. Se preparó la solución de Fehling Causse Bonnans (FCB: 130 g de tartrato de sodio y potasio, 110 g de NaOH, 24 g de sulfato de cobre pentahidratado y 16,8 g de ferrocianuro de potasio en 1 L de agua destilada), la cual fue valorada colocando 5 mL de FCB más 15 mL de agua destilada, la mezcla se calentó hasta la ebullición, se tituló con una solución patrón de glucosa (5 g/L) hasta obtener un vire verdoso. Se interrumpe el agregado de solución, añadiendo azul de metileno a 1 %; se continuó el goteo hasta que viró a amarillo. La misma metodología se usó para las muestras de sidra, y los resultados se expresan en g/L de azúcares reductores.

El factor del licor se calculó como sigue:

$$Fl = (Cg \times n) / (1000 \times V_{FL})$$

En donde:

Fl = Factor del licor = Gramos de azúcares reductores por ml de licor de Fehling.

Cg = Concentración en gramos de la solución de glucosa.

n = mL de solución de glucosa requerida para titular el licor de Fehling.

La concentración de azúcares reductores por litro en la muestra se calculó como sigue:

$$Ca = (Vf \times Fl \times Fd) / n'$$

En donde:

Ca = Concentración de azúcar.

Vf = Volumen usado de licor de Fehling.

Fl = Factor del licor = Gramos de azúcares reductores por ml de licor de Fehling.

Fd = Factor de dilución de la muestra.

n' = Volumen de muestra usado.

4.7. Análisis sensoriales

Se realizó una prueba dirigida a panelistas entrenados basada en una escala hedónica lineal no estructurada (Anexo 1). Se aplicó de igual manera la prueba de Kramer (Anexo 2), donde los consumidores clasificaron las muestras por orden de preferencia decreciente. Asimismo, se llevó a cabo el análisis sensorial de efervescencia de las sidras, tomando en cuenta la corona, el collar y la burbuja (Soto-Herrera *et al.*, 2008), los cuales se muestran en el Anexo 4.

Se tomó una botella de cada muestra y las sidras se evaluaron al azar con un código de letras, las botellas se abrieron en presencia de los panelistas y se vertieron 100 mL de la sidra en copas tipo flauta para que los panelistas pudieran apreciar la efervescencia, color, olor y finalmente, se evaluó gustativamente y el nivel de agrado general. Antes de la evaluación se dio un curso a los consumidores sobre los atributos a evaluar. La evaluación de la sidra se realizó a media mañana.

4.8. Identificación por PCR de las levaduras seleccionadas

Para la extracción del ADN se tomaron las colonias por separado y se resuspendieron en tubos Eppendorf conteniendo 300 μ L de TNES (Tris-HCl 200 mM pH 8,5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0,5%). Se añadieron balines metálicos y la suspensión se colocó en un disruptor durante 10 min para favorecer la lisis celular. Los tubos se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min, se recuperó el sobrenadante y se vació en 150 μ L de solución de acetato de sodio 3 M incubándose a -20 °C por 30 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron y al sobrenadante se le añadieron 400 μ L de isopropanol y se volvieron a centrifugar. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol. Se dejaron secar los tubos y finalmente se les adicionó 25 μ L de agua (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999).

Para la reacción en cadena de la polimerasa, 2 μ L de ADN de levaduras se resuspendieron en 48 μ l de reacción de PCR que contenía: 10 μ M ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'), 10 μ M ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC3'), 2mM de desoxinucleótidos, solución amortiguadora, agua y DNA polimerasa. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Veriti bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 2 min; 35 ciclos a 94 °C por 15 s, 55 °C por 30 s y 72 °C por 30 s y extensión final a 72 °C por 5 min (White *et al.*, 1990). Los productos de PCR se mezclaron con colorante Gelred 10 X y se separaron por electroforesis en gel de agarosa a 1,3 % y solución amortiguadora TAE 1 X a 100 V durante 30 min. El gel se visualizó en luz ultravioleta en un transiluminador.

Los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (IPYCIT) y se compararon con los establecidos en el banco de datos GenBank mediante el programa Blast, buscando homología con las secuencias de levaduras reportadas en la base de datos del *Centro Nacional para Información Biotecnológica* (NCBI, por sus siglas en inglés).

4.9. Diseños de los experimentos y análisis estadísticos

Para variables cinéticas relacionadas con la tolerancia a etanol y SO₂, el índice de floculación, velocidad de fermentación, tolerancia a presión y para la evaluación de las cepas en sidra, se utilizó un diseño experimental unifactorial completamente al azar con distinto

número de repeticiones, siendo el factor de estudio las cepas de levaduras. Los datos de las variables obtenidas fueron sometidos a análisis de varianza de Fisher y la prueba de medias de Tukey, utilizando el programa estadístico JMP versión 11.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Aislamiento de levaduras

A partir de las fermentaciones espontáneas producidas por 14 variedades de manzanas, se aislaron 135 levaduras, las cuales fueron diferenciadas mediante el medio lisina, donde 103 pertenecieron al género *Saccharomyces* (76.3 %) y 32 a no-*Saccharomyces* (23.7 %). El total de levaduras aisladas se muestra en el Anexo 5, donde se señala el género *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, la variedad de manzana de donde se aislaron y la nomenclatura utilizada para su reconocimiento.

Suárez *et al.* (2008) observaron, al igual que en nuestros experimentos, mayor porcentaje de levaduras *Saccharomyces* (70 %) en aislamientos realizados a través de diferentes etapas de fermentación. La mayor proporción de levaduras *Saccharomyces* encontrada en este estudio probablemente se debió a que existe una sucesión secuencial de especies de levaduras a lo largo de la fermentación; en una primera fase suelen predominar levaduras *Hanseniaspora uvarum/Kloeckera apiculata*, que se caracterizan por ser ligeramente fermentativas y poco tolerantes a etanol. En la segunda fase, se sustituyen esas levaduras oxidantes por aquellas que cuentan con un alto potencial fermentativo, como *S. bayanus* y *S. cerevisiae* (Cousin *et al.*, 2017).

En la Figura 5.1 se muestra el comportamiento fermentativo de las 14 variedades, el cual resultó muy variable, resaltando que la variedad '436' finalizó la fermentación a los cinco días, contrastando con las variedades '467' y 'Golden Delicious' que finalizaron la fermentación en 24 días; además se observó que '*Malus x Micromalus*', 'Rosada', '429b' y 'Joya' no finalizaron el proceso fermentativo. Son muchos los factores que intervienen en el éxito de la fermentación, como son: la concentración de nutrientes, el contenido de oxígeno disuelto en los mostos y la temperatura; la producción de ácidos grasos de cadena corta puede resultar inhibitorio, el sulfitado y la clarificación (Irastorza y Dueñas, 2010).

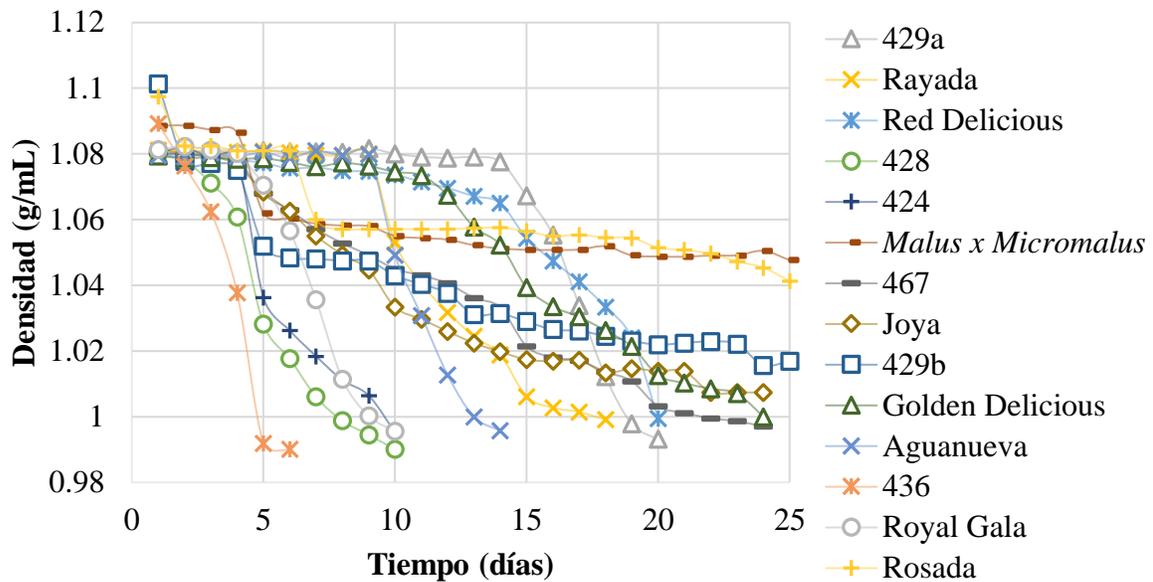


Figura 5.2. Evolución de la densidad del mosto de 14 variedades de manzana.

5.2. Caracterización de las cepas de levaduras aisladas

5.2.1. Efecto *killer* y actividad β -glucosidasa

Un mecanismo biológico para la regulación de la dinámica poblacional en los ecosistemas microbianos es la secreción de toxinas proteicas o glicoproteicas que inhiben el desarrollo de células susceptibles del mismo o diferentes géneros y/o especies, dicha acción está regulada por receptores en la pared celular del microorganismo sensible (García *et al.*, 2016).

Los primeros criterios para seleccionar las cepas de levadura *Saccharomyces* con potencial para la elaboración de sidra espumosa incluyeron la eliminación de aquellas cepas que no producían toxina *killer* y/o actividad β -glucosidasa.

En la Figura 5.2 se aprecian algunas de las placas obtenidas en este ensayo, donde se puede apreciar el desarrollo de la cepa “sensible” que fue inhibida parcialmente y el halo de inhibición en diferentes intensidades, de algunas levaduras seleccionadas como **RD3**, **RD4**, **428.2**, **428.3**, **MM7** y **467.2**.

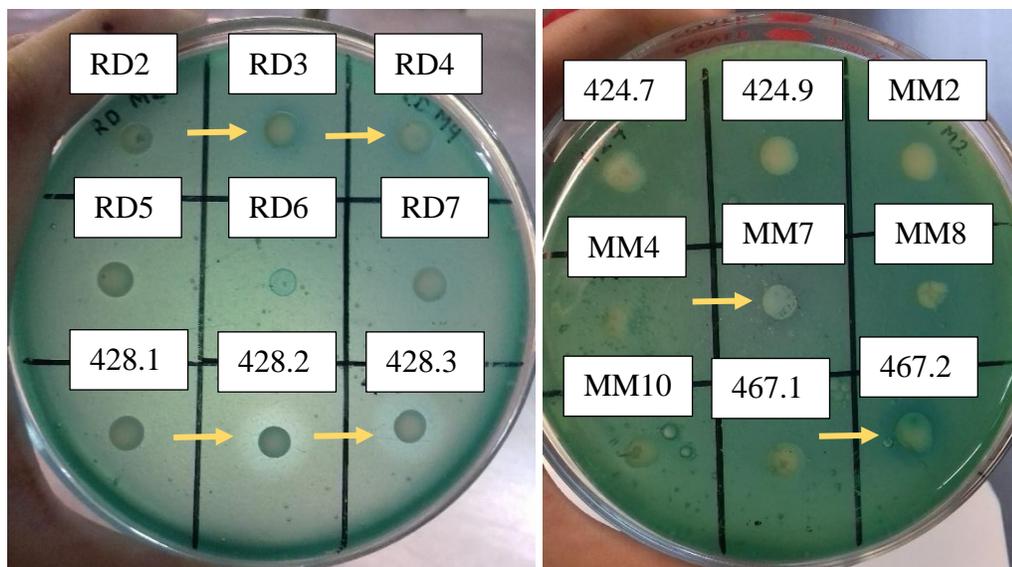


Figura 5.2. Efecto *killer* de distintas cepas. Se observa un halo de inhibición en aquellas cepas consideradas *killer*.

En la Tabla 5.1 se muestra que sólo 18 levaduras de 103 mostraron efecto *killer*. Asimismo, Pando *et al.* (2010) observaron que, de 134 levaduras aisladas, el 95 % eran fenotipo neutral y únicamente dos cepas resultaron *killer*, habiéndose encontrado en este estudio un mayor porcentaje de levaduras *killer* (17.5 %). Esta capacidad de producir micotoxinas es heredada citoplasmáticamente y está relacionada con la presencia de plásmidos de doble cadena lineal de ARN (dsRNA) encapsulados, formando partículas tipo virus (VLP) no infecciosas dentro del citoplasma de las células (Nally *et al.*, 2005). Por su parte, Bevan y Makower (1963) descubrieron cepas asesinas (K), sensibles (S) y neutras (N) de *S. cerevisiae*, donde las levaduras asesinas matan a las cepas sensibles al secretar una toxina proteica en el medio, para el cual ellas mismas son inmunes, en cambio las células neutras son inmunes a la toxina y no matan a las células sensibles.

Por lo que respecta a la actividad β -glucosidasa, podemos señalar que los terpenos glucosilados presentes en la manzana se pueden hidrolizar mediante enzimas glucosidasas para formar compuestos volátiles que potencializan el perfil aromático y otorgan características varietales típicas más agradables en la sidra, el cual es un aspecto importante de calidad (Mateo y Maicas, 2016).

En la Figura 5.3 a), se muestran algunas cepas que mostraron una coloración marrón, esto debido a que contenían la enzima β -glucosidasa.

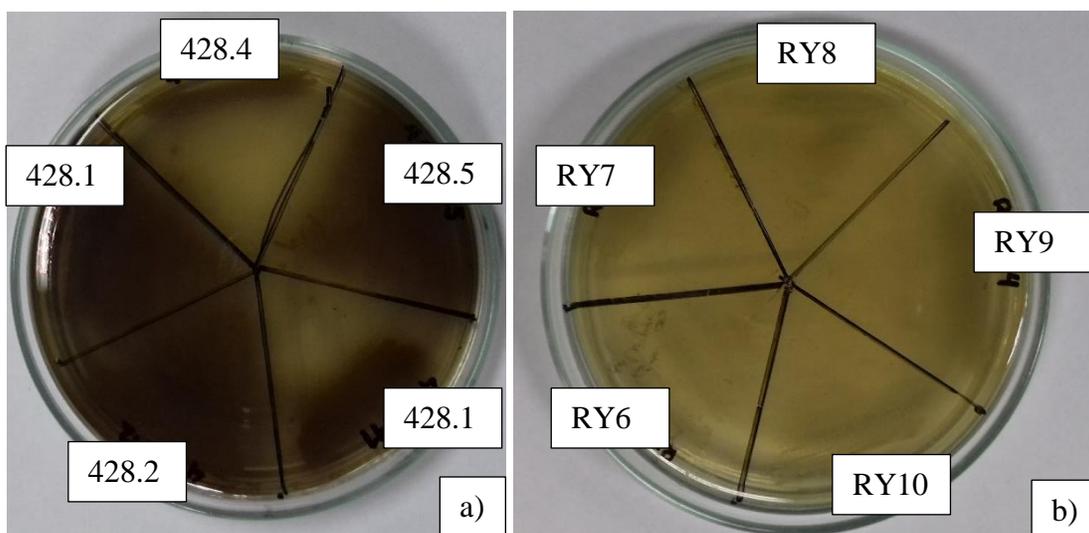


Figura 5.3. Actividad β -glucosidasa de algunas cepas. Se observa una coloración marrón en aquellas cepas que tienen la enzima degradadora, a).

En este caso, 59 cepas mostraron en el ensayo actividad β -glucosidasa (Tabla 5.1). Contrastando con los resultados de este estudio, Pando *et al.* (2010) detectaron dos cepas con actividad β -glucosidasa de 134 levaduras probadas, confirmando algunos estudios en los cuales la actividad es menos frecuente en levaduras *Saccharomyces*. Por otro lado, Delcroix *et al.* (1994) encontraron tres cepas enológicas que mostraban alta actividad glucosidasa. En nuestro caso 57.3 % de las levaduras mostraron poseer la enzima. Sin embargo, esto no asegura su acción en el medio fermentativo debido a que la enzima está asociada con la pared celular de la levadura, lo que la hace independiente de glucosa, pero susceptible a la inhibición por etanol (Mateo y Maicas, 2016).

Retomando lo anterior, se seleccionaron para ensayos de caracterización ulteriores a aquellas cepas que contaban con una o ambas características (64 cepas).

Tabla 5.1. Efecto *killer* y actividad β -glucosidasa de 103 levaduras *Saccharomyces* seleccionadas.

Características	No. de aislados
Efecto <i>killer</i> (+) Actividad β -glucosidasa (+)	13
Efecto <i>killer</i> (+) Actividad β -glucosidasa (-)	5
Efecto <i>killer</i> (-) Actividad β -glucosidasa (+)	46
Efecto <i>killer</i> (-) Actividad β -glucosidasa (-)	39
Total	103

+: Efecto *killer* y/o actividad β -glucosidasa, -: ausencia de efecto *killer* y/o actividad β -glucosidasa.

5.2.2. Capacidad floculante

La floculación implica la unión de azúcares con proteínas de tipo lectinas en la superficie de las células propiciando la sedimentación rápida, esto permite la clarificación y el degüelle de las sidras espumosas, además se considera un mecanismo de protección debido a que mejora la tolerancia celular a la alta concentración de etanol (Tofalo *et al.*, 2016).

Continuando con el proceso de selección de levaduras, a las 64 cepas preseleccionadas se les determinó su capacidad floculante mediante la técnica descrita por Suárez *et al.* (2008). En la Figura 5.4 se muestra un tubo obtenido en este ensayo, en el cual observamos que la cepa 429a.1 al tiempo 0 está turbia, mientras que después de las 2 h de reposo se ve una ligera sedimentación de la levadura.

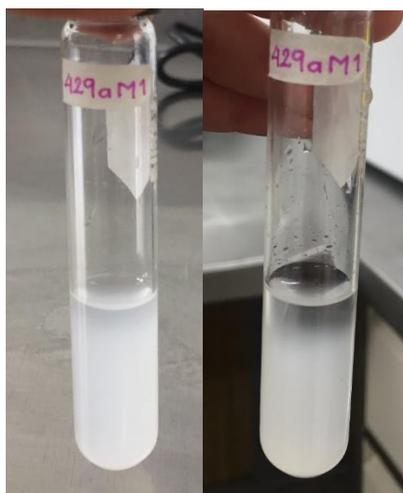


Figura 5.4. Evaluación visual de la capacidad floculante de la cepa **429a.1**

En la Figura 5.5 se observa que **436.3**, **AN8**, **AN10** y **AN7** tuvieron un grado de floculación alto (< 30 %), mientras que 26 levaduras eran medianamente floculantes (entre 30 % y 70 %), siendo descartadas aquellas que tenían un índice de floculación mayor al 70 % (floculan lentamente).

De igual manera, Suárez *et al.* (2008) evaluaron la capacidad de floculación de 41 levaduras por dos métodos: de manera visual obtuvieron que el 24 % del total de las colonias eran floculantes, mientras que, por la prueba espectrofotométrica de Helm el 23 % de las colonias fueron consideradas medianamente floculantes. En contraste con lo obtenido en este trabajo, se describen tres comportamientos diferentes, encontrando un mayor porcentaje de levaduras alta (6.3 %) y medianamente floculantes (42.2 %). Estos distintos comportamientos pueden darse debido a que existen células floculantes que tienen proteínas tipo lectina, denominadas floculinas, las cuales se unen selectivamente a los residuos de manosa presentes en las paredes de otras células de levadura adyacentes. Para que las lectinas logren su conformación activa necesitan iones calcio (Verstrepen *et al.*, 2003).

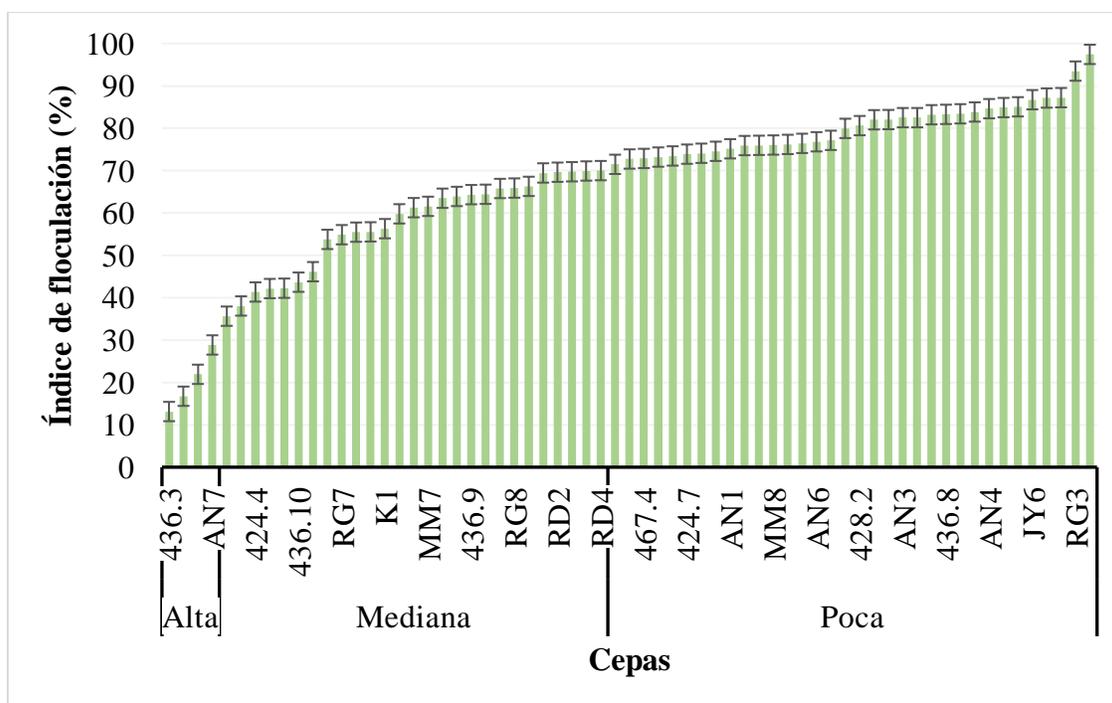


Figura 5.5. Índice de floculación de 64 levaduras seleccionadas.

5.2.3. Velocidad de fermentación

Para analizar la velocidad de fermentación de las levaduras, se seleccionaron 43 cepas poseyendo dos o tres características de las antes mencionadas. En la Figura 5.6. se observa de manera visual la formación de burbujas que denota el carácter fermentativo de la cepa **436.4**; por otro lado, en la Figura 5.7 se muestran tres comportamientos de las distintas cepas; considerando altamente fermentativas a aquellas cepas con pendiente de pérdida de peso de mayor magnitud en las primeras 24 horas del proceso fermentativo (**467.9**, **JY4**, **424.5**, **428.1**, **428.2** y **436.8**). Durante los siete días que dura la fermentación alcohólica, las levaduras al transformar los azúcares en alcohol y dióxido de carbono, provocan la disminución del peso de los tubos de ensaye, lo cual genera una pendiente negativa; entre mayor sea el valor, la levadura fermentará más rápido.

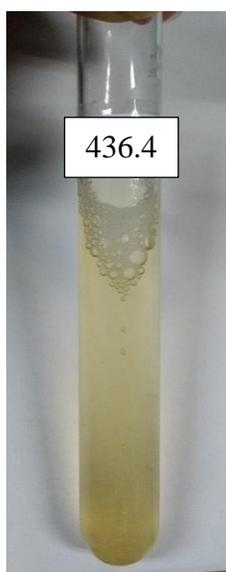


Figura 5.6. Evaluación visual de la velocidad de fermentación de la cepa **436.4**.

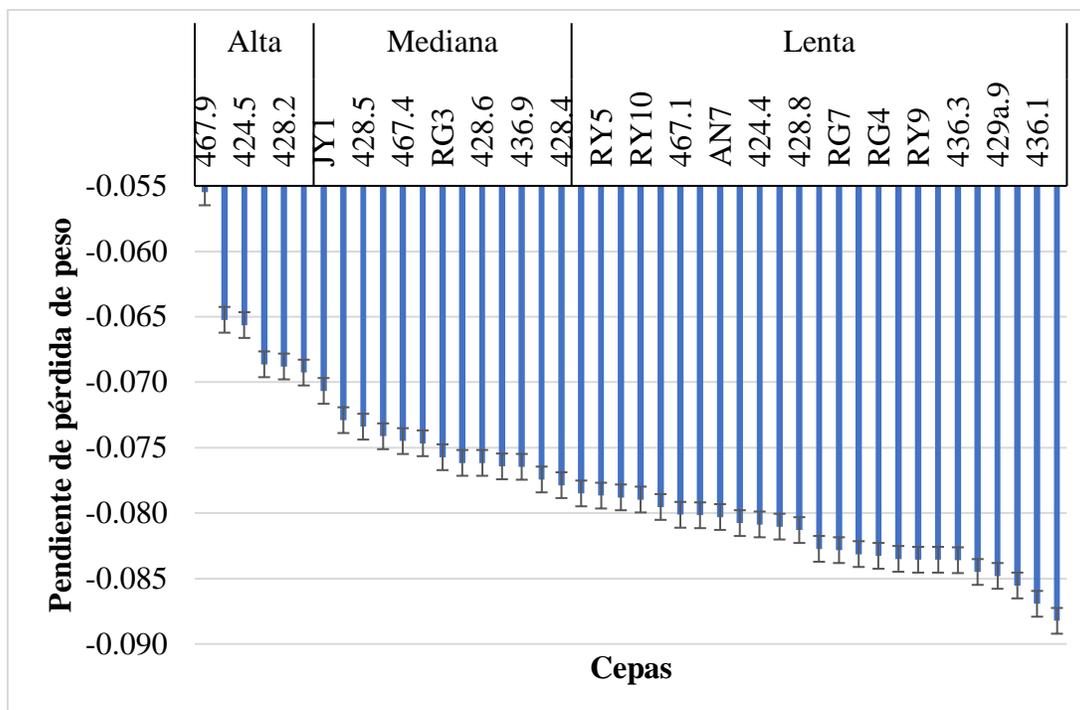


Figura 5.7. Velocidad de fermentación de 43 cepas de levaduras seleccionadas.

La eficiencia fermentativa depende de la capacidad de cada cepa de levadura para responder a diversas condiciones de estrés a las que están sometidas durante la fermentación, por mencionar algunos, el contenido de nutrientes del mosto, las temperaturas extremas, la toxicidad de etanol o ácidos grasos, la proporción de fuentes de nitrógeno y la cantidad inicial de aminoácidos; estos fenómenos influyen a nivel celular, disminuyendo el transporte de azúcar, la incapacidad de producir metabolitos que contrarresten el estrés osmótico y la falta de integridad de la membrana celular en presencia de altas concentraciones de etanol (Varela, *et al.*, 2004; Irastorza y Dueñas, 2010). Esto es un criterio importante de selección debido a que si la fermentación es lenta se corre el riesgo de contaminación y aumentan los costos de producción.

5.2.4. Tolerancia a etanol y SO₂

Es bien sabido que las levaduras fermentativas transforman la glucosa en etanol y dióxido de carbono (Walker y Stewart, 2016). El etanol producido durante la fermentación inhibe el desarrollo de las levaduras, por lo cual la viabilidad de las células se considera como un factor clave para la selección de éstas; ya que se ven afectados diversos aspectos de

supervivencia como, la fluidez de la membrana plasmática, la morfología de la vacuola, la actividad de enzimas glucolíticas y el ADN mitocondrial (Miranda *et al.*, 2017).

Por otro lado, durante el inicio de la fermentación de la sidra, el proceso se ve dominado por levaduras no-*Saccharomyces* y bacterias que producen poco etanol y algunos metabolitos que podrían afectar el producto final; por lo que resulta importante inhibir a los microorganismos presentes para favorecer el desarrollo de las cepas nativas de *Saccharomyces* (Miranda *et al.*, 2017). Para ello suele agregarse dióxido de azufre (SO₂), el cual es un agente antimicrobiano, las concentraciones más comúnmente usadas van de 20 a 50 ppm (Martín *et al.*, 2015).

A 30 cepas de levaduras seleccionadas de acuerdo a su efecto *killer*, actividad β -glucosidasa, capacidad floculante y velocidad de fermentación alta y media, se les evaluó su tolerancia etanol (8 %) y SO₂ (50 mg/L). Se observó la turbidez del medio a las 48 horas de incubación de 12 cepas de levaduras (40 %), las cuales fueron consideradas como tolerantes, mientras que 18 no mostraron crecimiento por ende no hubo enturbiamiento del medio (Figura 5.8).

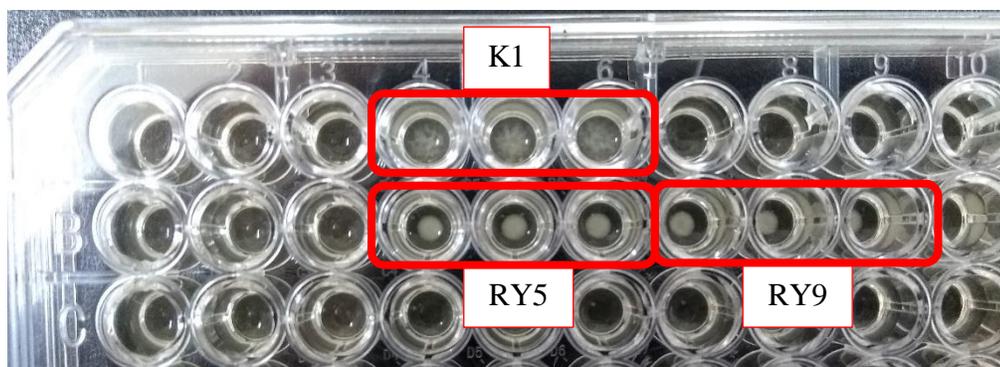


Figura 5.8. Evaluación de la turbidez de la cepa de referencia **K1** y dos cepas seleccionadas, **RY5** y **RY9**.

Miranda *et al.* (2015) seleccionaron 52 levaduras *Saccharomyces* nativas de viñedos queretanos respecto a su potencial enológico, resaltando que todas las cepas desarrollaron con 12 % de etanol; mientras que 55.8 % crecieron a 200 mg/L de SO₂, cabe destacar que en el estudio de Miranda *et al.* se determinó la DO, lo cual lo hace más exacto. Murkherjee *et al.* (2014) mencionan que las levaduras pueden mostrar habilidades diferentes

para crecer y/o sobrevivir en presencia de etanol, debido a que algunas cepas albergan ciertos alelos que permiten que combatan mejor los efectos tóxicos de este compuesto. Además, la tolerancia a etanol depende de la concentración de azúcares en el medio, el estado metabólico de las células, la temperatura, el pH y la concentración de etanol en las diferentes etapas de fermentación. Por otro lado, los esteroides y ácidos grasos insaturados sintetizados en presencia de oxígeno o la suplementación con vitaminas y proteínas tienen un papel fundamental en el incremento de la tolerancia a etanol (García *et al.*, 2004).

En cambio, Suárez *et al.* (2008) evaluaron la tolerancia a sulfitos en medio adicionado con 0.02 y 0.04 % de metabisulfito de potasio midiendo la disminución en la densidad, observando que todas las levaduras metabolizaron fácilmente los azúcares del medio en presencia de SO₂. Es importante que las levaduras seleccionadas toleren concentraciones altas de SO₂ ya que de esta manera podrían iniciar la fermentación con mayor rapidez, imponiéndose incluso sobre levaduras silvestres.

5.2.5. Tolerancia a la presión

Finalmente, de todas las características descritas anteriormente se seleccionaron 10 cepas de levaduras (**MM7**, **436.4**, **RY5**, **AN5**, **RG8**, **429a.9**, **428.3**, **RY3**, **RG6** y **428.6**), las cuales se sometieron a microfermentaciones, donde la primera fermentación se realizó inoculando la cepa de referencia **K1** y para la segunda fermentación, a la sidra tranquila de base se le añadió licor de tiraje (Figura 5.9). En la Figura 5.10 se puede observar la curva de presión generada por las levaduras a lo largo de seis semanas y en la Tabla 5.2 se muestra que existen diferencias significativas en función de la cepa de la levadura evaluada, donde se ve que la cepa **MM7** (3.72 atm) fue la que generó más presión, seguida de las cepas **K1** (3.63 atm), **436.4** (3.63 atm) y **RY5** (3.61 atm), considerándose las más altas, mientras que **428.6** (2.92 atm) toleró menos de 3 atm.



Figura 5.9. Levaduras seleccionadas sometidas a un proceso de 2ª fermentación en botella, para evaluar su tolerancia a 3 atm de presión.

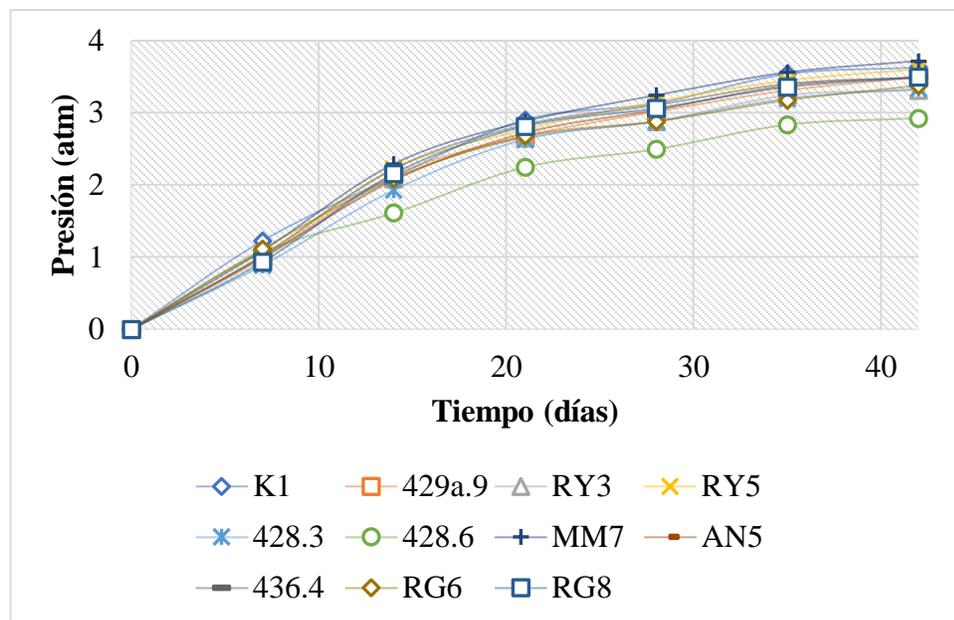


Figura 5.10. Tolerancia a presión (3 atm) de las 10 levaduras seleccionadas.

Tabla 5.2. Resultados de la presión de las sidras espumosas elaboradas a partir de 10 levaduras seleccionadas, en el día 42 de fermentación.

Cepa	Presión (atm)
MM7	3.76 ± 0.075 a
436.4	3.63 ± 0.035 ab
K1	3.63 ± 0.075 ab
RY5	3.61 ± 0.065 abc
AN5	3.60 ± 0.115 abc
RG8	3.56 ± 0.040 abcd
429a.9	3.56 ± 0.101 abcd
428.3	3.42 ± 0.040 bcd
RY3	3.40 ± 0.0 cd
RG6	3.38 ± 0.040 d
428.6	3.11 ± 0.101 e

Medias provenientes de tres repeticiones.
 Letras distintas indican diferencia estadística significativa a Tukey ($p \leq 0.05$).

Soto-Herrera *et al.* (2008) evaluaron el efecto de la concentración de azúcar para la segunda fermentación de sidra espumosa, observando que 20 g/L generaban 3.9 atm de presión, siendo similar a lo obtenido en nuestro estudio. Soto-Herrera *et al.* menciona que, a mayor contenido de sustrato, las levaduras generan una mayor concentración de CO₂ incrementando la presión interna de la botella.

El dióxido de carbono puede estimular e inhibir el desarrollo celular, el cual disminuye el pH del medio y la acidez resultante conduce a una alteración de algunos sistemas biológicos dentro de las células (Dixon y Kell, 1989). En hongos, en el ciclo del ácido tricarbóxico se inhibe el oxaloacetato, también se ve alterada la concentración de enzimas dentro de la célula, dando como resultado metabolitos alterados. En *Saccharomyces spp.*, se ha visto que la concentración de hexocinasa aumenta, pero la actividad de algunas enzimas asociadas a la síntesis de aminoácidos y proteínas, disminuye (Jones y Greenfield, 1982).

Una vez evaluados los resultados, se seleccionó la cepa de levadura **MM7** que contaba con efecto *killer*, actividad β-glucosidasa y velocidad de fermentación para la elaboración de la primera fermentación, mientras que para la segunda fermentación se seleccionaron las cepas **MM7**, **RY5** y **436.4** que resultaron ser altamente floculantes, tolerantes a etanol, SO₂ y presión.

5.3. Microfermentaciones

Recordemos que la elaboración de sidra espumosa se realizó por el método *Champenoise*, utilizando tres cepas de *Saccharomyces* sp seleccionadas, a saber: **MM7** obtenida de la variedad de manzana ‘*Malus x Micromalus*’, **RY5** de la variedad ‘Rayada’ y **436.4** de la variedad ‘436’. La sidra base se obtuvo inoculando a la cepa **MM7**, o bien a la levadura de referencia **K1**. Posteriormente, para la segunda fermentación se inocularon las cepas **MM7**, **RY5**, **436.4** o bien **K1**.

5.3.1. Primera fermentación

a) Evolución de la densidad

El seguimiento de la fermentación se realizó midiendo la densidad del mosto de manzana hasta llegar a una densidad constante de 0.99 g/mL, lo cual es indicativo de que la fermentación finalizó, es decir, que los azúcares del mosto han sido transformados en etanol, CO₂ y otros subproductos casi en su totalidad (Miranda *et al.*, 2017). El control de la densidad del mosto de manzana permite evaluar la velocidad fermentativa y nos indica cuando existe un paro fermentativo, además de que su determinación tiene una estrecha relación con la cantidad de azúcar y el grado alcohólico potencial, por ejemplo: una densidad de 1005 g/L equivale a 107.5 g/L de azúcar y a 6.35 °GL (Mangas, 2010).

En la Figura 5.11 se observa que en el primer día hay una disminución notable de la densidad en la cepa **MM7** (1.033 g/mL) a diferencia de la cepa **K1** (1.045 g/mL), no obstante, al día siete finalizada la fermentación, donde ambas cepas terminan en una densidad similar, 0.992 g/mL y 0.994 g/mL respectivamente, sin presentar diferencias importantes en el comportamiento de ambas levaduras.

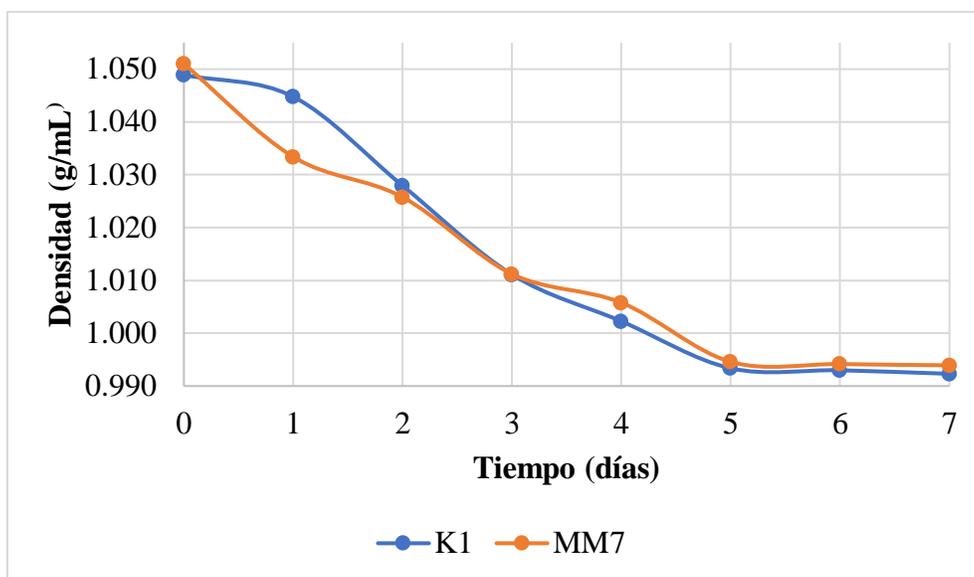


Figura 5.11. Evolución de la densidad del mosto de manzana durante la primera fermentación en función de la cepa de levadura.

Budak *et al.* (2015) elaboraron sidra a partir de manzanas ‘Red Delicious’, obteniendo una densidad final al día siete de 0.998 g/mL. Hernández (2011) al día nueve de fermentación alcanzó una densidad de 0.998 g/mL, valores muy similares a los obtenidos en nuestro estudio.

b) Cinética de crecimiento de las levaduras

En la Figura 5.12 se observa que en ambas cinéticas, los niveles iniciales de levaduras en los mostos fueron de entre 4.34 (**K1**) y 4.82 (**MM7**) Log UFC/mL, correspondiendo esta población en su mayoría a levaduras del género *Saccharomyces*, debido a que se realizó un sulfitado inicial para eliminar todo microorganismo nativo presente en la manzana y luego se inoculó con la cepa de referencia **K1** o bien, la cepa seleccionada **MM7**. A los dos días de iniciada la fermentación, en la fase exponencial, las poblaciones de levaduras se incrementan por encima de 8 Log UFC/mL. Posteriormente, existe una fase estacionaria donde las poblaciones se mantienen constantes y finalmente, en el día siete se observa una disminución de un logaritmo de los microorganismos; no se sabe con exactitud el número de células viables debido a que no se hizo el conteo posterior a los siete días de iniciada la fermentación. El comportamiento cinético de la cepa de referencia **K1** y la cepa

nativa **MM7** resultó similar, por lo cual nuestra cepa seleccionada resulta sobresaliente para la elaboración de sidra espumosa de la región.

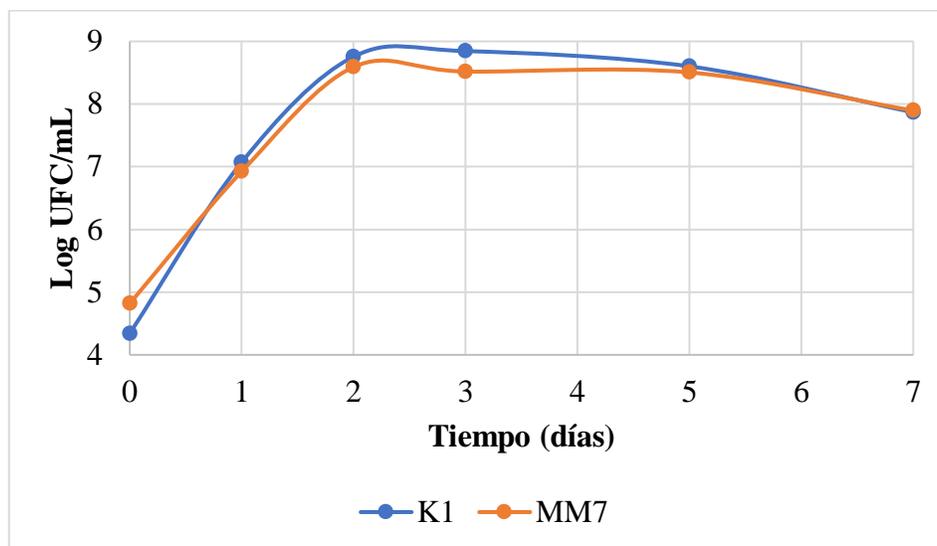


Figura 5.12. Cinética de crecimiento de las cepas de levaduras **K1** y **MM7** durante la primera fermentación de sidra espumosa.

Asimismo, Irastorza y Dueñas (2010) reportan en fermentaciones espontáneas, niveles iniciales de levaduras que oscilan de 5 a 7 Log UFC/mL, lo cual depende del estado fitosanitario de la manzana. Hernández (2011), en el día dos de fermentación de manzana ‘Golden Delicious’ encontró una población de levaduras de 7 Log UFC/mL, con la levadura comercial “Tradi-Pan”. Ramírez (2005) obtuvo 6 Log UFC/mL al tercer día de fermentación. Tras la fermentación alcohólica en el día siete se observa una fase de declive, en la que el número de células viables desciende progresivamente hasta alcanzar niveles de 1 a 3 Log UFC/mL, porque la cantidad de nutrientes se ve restringida o bien las levaduras se ven inhibidas por el aumento de etanol.

En nuestro estudio, los niveles de levaduras son relativamente bajos debido a que el mosto se sulfita previamente para eliminar microorganismos indeseables como bacterias y levaduras nS, para después inocular la cepa seleccionada. Dicho sulfitado pudo haber tenido efecto en el desarrollo de las levaduras inoculadas.

c) Comparación entre la densidad y la cinética de crecimiento de las levaduras

En la Figura 5.13 se muestra la comparación entre la cinética de crecimiento de las cepas **K1** y **MM7** y la evolución de la densidad, durante los siete días que duró el proceso fermentativo.

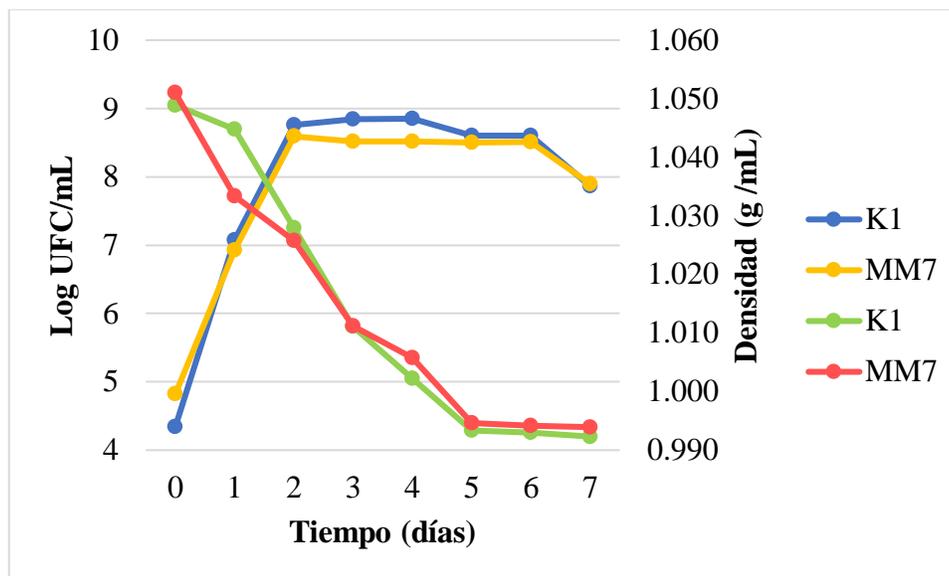


Figura 5.13. Densidad en relación a la cinética de crecimiento en función de la cepa de levadura.

De la Figura podemos resaltar que en un inicio la cepa nativa **MM7** poseía una concentración mayor de levaduras que **K1**, y de igual manera una densidad más alta. Durante el periodo de adaptación de las dos cepas (un día), se observa una disminución mínima de la densidad; posteriormente en el día 2 cuando se da el máximo crecimiento se muestra un comportamiento similar en ambos casos, donde el desarrollo de microorganismos aumenta cuatro logaritmos aproximadamente y se nota una disminución de la densidad mayor, asociada a una mayor producción de etanol. De acuerdo con Ingledew (1999) durante la fermentación, el periodo de degradación máxima de azúcar y producción de alcohol coincide con la fase logarítmica, y se ha determinado que las células en crecimiento producen etanol 33 veces más que aquellas que no crecen.

Finalmente, en el día 5 se observa una densidad constante en la cepa **K1** y **MM7** (0.992 y 0.994 g/mL, respectivamente) y, por ende, un agotamiento de nutrientes, acompañado por la disminución de un logaritmo de la concentración de levaduras.

El crecimiento de la levadura implica el transporte y la asimilación de nutrientes, seguido de su integración en numerosos componentes celulares necesarios para que las células aumenten en biomasa y, por consiguiente, se dividan. El objetivo principal de una célula es reproducirse, no producir alcohol, sin embargo, durante el proceso fermentativo, estos aspectos van de la mano. La producción de etanol no se da de manera eficiente si no existe un crecimiento significativo de las células, las cuales se esfuerzan por mantener su equilibrio redox y producir suficiente ATP para un crecimiento continuo (Walker y Stewart, 2016).

Por otro lado, el uso de cepas seleccionadas nos permite tener un mejor control sobre la fermentación, asegurando la calidad microbiológica de la sidra, ya que existe un dominio del medio fermentativo y esto evita el establecimiento de otras levaduras silvestres (Cruzat y Barrios, 2009). Es importante destacar que las cepas nativas al ser específicas de la región, se encuentran adaptadas a las condiciones climáticas y a la materia prima, y son responsables de las características únicas en las sidras (Mas *et al.*, 2006). En este estudio al observar un comportamiento similar de una cepa comercial y una cepa nativa, nos permite concluir que el uso de cepas seleccionadas resulta benéfico para la producción de bebidas fermentadas con índices máximos, característicos y genuinos de la zona considerada, como un mecanismo para lograr la diferenciación de sidras.

5.3.2. Características físicas y químicas de las sidras tranquilas

En la Tabla 5.3 se muestran los valores obtenidos para las variables evaluadas de las sidras tranquilas.

Tabla 5.3. Características físicas y químicas de sidras tranquilas en función de la levadura utilizada.

Tratamiento	Azúcares residuales (g/L sacarosa)	Grado alcohólico (°GL)	ATT (g/L ácido málico)	pH	Acidez volátil (g ácido acético/L)	Anhídrido sulfuroso total (mg/L)
K1	1.78±0.01 a	7.15±0.05 a	4.19±0.12 a	3.57±0.0 b	0.27±0.03 b	601.6±12.08 a
MM7	1.70±0.01 b	6.49±0.08 b	4.03±0.03 a	3.63±0.0 a	0.35±0.02 a	465.6±18.17 b

Medias provenientes de tres repeticiones. Letras distintas indican diferencia estadística significativa a $p \leq 0.05$. Prueba de medias de Tukey.

a) Azúcares residuales

El mosto de manzana tiene concentraciones variables de carbohidratos, 70% del azúcar fermentable consiste de fructosa, seguido de glucosa y sacarosa. Sin embargo, la mayoría de las fermentaciones alcohólicas son incompletas debido a que las levaduras *Saccharomyces* degradan fácilmente la glucosa, mas no la fructosa, y es por ello que en la sidra se tiene una alta proporción de azúcares residuales (Wang *et al.*, 2004).

En este estudio los valores de azúcares residuales fueron de 1.70 g/L a 1.78 g/L, por lo que ambas cepas mostraron ser buenas fermentadoras. Así también, de acuerdo a la norma NOM-199-SCFI-2017 las sidras se clasifican como secas, ya que contienen menos de 10 g/L de azúcares residuales.

Drouin (2001) elaboró sidra a partir de una mezcla de variedades de manzana, obteniendo un valor de 27.35 g/L de azúcares residuales al inocular levadura nativa 71-B.

Mangas (2010) menciona que los azúcares se transportan a las células de levadura a través de la membrana plasmática por medio del transporte activo primario, difusión pasiva y facilitada o el transporte activo secundario, pero esto dependerá en gran medida del tipo de azúcar utilizado, las especies de levaduras y las condiciones de fermentación. Por lo cual, las cepas seleccionadas en este trabajo podrían tener buenos transportadores de azúcares, lo que permitió una degradación completa.

b) Grado alcohólico

El grado alcohólico que se alcanza en la sidra es menor que en vino, debido a que se tienen concentraciones menores de azúcar (Hernández y Sastre, 1999), siendo valores

normales de alcohol entre 3 y 6 °GL de acuerdo a la NOM-199-SCFI-2017. En Asturias se consideran manzanas entre 11 °Bx y 18 °Bx para obtener un mosto rico en azúcares; un mosto para sidra de 15.8 °Bx equivale aproximadamente a 144.8 g/L en azúcares totales, que correspondería a un grado alcohólico potencial de 8.6 (Pereda, 2011).

El contenido de azúcares inicial del mosto fue de 13.05 °Bx (119.6 g/L de azúcares totales), de las cuales, la cepa **K1** generó una sidra con 7.15 °GL en comparación con la cepa nativa **MM7** con solo 6.49 °GL. Esto indica que el rendimiento de azúcar/alcohol fue de 16.48 y 18.17 gAz/°Et para **K1** y **MM7**, respectivamente, por lo cual la levadura comercial **K1** demuestra una elevada conversión de azúcares coincidiendo con lo reportado en su ficha técnica con valores entre 16 y 17 gAz/°Et. A pesar de que la cepa **MM7** no obtuvo un rendimiento de conversión alto, la producción de alcohol se encuentra dentro los rangos establecidos por la norma NOM-199-SCFI-2017 (de 3 a 6 °GL).

Budak *et al.* (2015) obtuvieron en el mosto de manzana una concentración inicial de azúcares de 144.24 g/L y con un grado alcohólico final de 6.10 °GL. Hernández (2011) obtuvo 5.7 °GL con una concentración de azúcar inicial de 15.8 °Bx (144.8 g/L), al utilizar levadura específica para panadería, esta poca producción de etanol podría deberse a que la levadura “Tradi-Pan” no cuenta con las características deseables para la elaboración de sidra. Además, Suárez *et al.* (2008) utilizó levaduras nativas para la elaboración de sidra asturiana, obteniendo 6.3 °GL, aunque no mencionan la concentración inicial de azúcares. Drouin (2001) utilizó una levadura nativa obteniendo en la sidra tranquila 5.96 °GL con una concentración inicial de 14 °Bx (135.15 g/L), por lo que se puede decir que el nivel de conversión de azúcares en alcohol depende también del microorganismo. La variedad de manzana ‘Golden Delicious’ utilizada para la elaboración de sidra en este estudio tenía mayor contenido de azúcares, por ende, el grado alcohólico obtenido fue mayor en comparación con los estudios antes mencionados, recordando que la composición química de la manzana varía en función de diversos factores climatológicos.

c) Acidez total titulable (ATT) y pH

El mosto contiene ácidos orgánicos (málico, succínico, cítrico) que le otorgan una característica ácida que influye en la estabilidad química y el pH de la sidra protegiendo de

la acción nociva de microorganismos, además de dar equilibrio en el sabor, olor y color (Kerem *et al.*, 2004).

La concentración de estos ácidos depende de la proporción de manzanas empleadas y de su estado de madurez, destacando en abundancia el ácido málico (Pereda, 2011).

El pH del mosto de manzana inicial fue de 3.96 y al término de la fermentación, sidra tranquila obtuvo valores de pH de entre 3.57 (**K1**) y 3.63 (**MM7**).

Ye *et al.* (2014) evaluaron la variación de pH durante la fermentación del mosto de manzana de la variedad ‘Fuji’ utilizando la levadura *S. cerevisiae* WLS21, observando en un inicio un pH de 3.29 y en el día nueve, 3.50. Se observa claramente que en nuestro estudio hubo una disminución del pH, a diferencia del estudio de Ye *et al.* donde aumentó el pH al finalizar el proceso fermentativo. Esta diferencia puede deberse a que las levaduras *Saccharomyces* son capaces de producir etanol a partir del ácido málico disminuyendo la acidez o bien, por la formación de los ácidos láctico y acético durante la fermentación alcohólica lo cual aumenta la acidez (Mangas, 2010).

La acidez total, por su parte, mide la concentración de los ácidos orgánicos libres en la disolución (Pereda, 2011). En este estudio se tuvo una acidez inicial de 2.77 g/L de ácido málico, observándose que, al finalizar el proceso fermentativo aumentó a 4.03 para la cepa **K1** y 4.19 g/L ácido málico para la cepa nativa **MM7**, siendo **MM7** la que tiene mayor concentración de ácidos. La ATT de la sidra tranquila se encuentra dentro de los valores establecidos por la NOM-199-SCFI-2017, de entre 3.5 y 7.5 g/L ácido málico.

Budak *et al.* (2015) obtienen un valor inicial de acidez de 1.9 g/L ácido málico y al finalizar la fermentación, hubo un aumento en la acidez, siendo el valor obtenido de 2.3 g/L ácido málico, en sidra elaborada a partir de la variedad ‘Red Delicious’ con una levadura *S. cerevisiae*, Mientras que, Ye *et al.* (2014) observan una variación de ATT desde 7 g/L ácido málico el día cero hasta 6.96 g/L ácido málico en el día nueve, donde observamos una disminución de la acidez.

d) Acidez volátil

La acidez volátil se expresa como g/L de ácido acético, este es un subproducto de la fermentación que causa defectos en la sidra cuando está presente en alta concentración, e indica problemas microbiológicos. La producción de acidez volátil es

directamente proporcional a la temperatura de fermentación (OIV, 2017). De acuerdo a la norma, el límite máximo es de 1.2 g/L de ácido acético.

En este trabajo se encontraron valores bajos de acidez volátil en la cepa **K1** con 0.27 g/L de ácido acético, mientras que en la cepa **MM7** fue relativamente mayor con 0.35 g/L los cuales se encuentran dentro de lo establecido por la norma. Picinelli *et al.* (2000) obtuvieron valores de acidez volátil de sidras asturianas naturales, durante cuatro años consecutivos (1995-1998) que van desde 1.69, 1.37, 1.47 y 1.60 g/L de ácido acético, respectivamente; ellos mencionan que los valores altos de acidez volátil es una característica de las sidras asturianas, y que puede deberse posiblemente a la presencia de ácidos grasos de cadena corta.

e) Anhidrido sulfuroso total

El anhídrido sulfuroso (SO₂) es una sustancia con propiedades antisépticas, es decir, que ejerce una acción diferencial sobre las poblaciones de bacterias y levaduras, que se utiliza en la elaboración y conservación de sidra (Mangas, 2010). La acción del sulfitado depende de la concentración, del pH del mosto y de la presencia de compuestos que se combinan con el SO₂ (Irastorza y Dueñas, 2010).

En la Tabla 5.3 se observan los valores entre 465.5 (**MM7**) y 601.6 (**K1**) mg/L de anhídrido sulfuroso total, siendo la sidra tranquila inoculada con la cepa **K1** la de mayor concentración. Ambas sidras sobrepasan los niveles señalados por la NOM-199-SCFI-2017 de 300 mg/L de anhídrido sulfuroso total. Esta concentración elevada de SO₂ en las sidras tranquilas pudo deberse a un error en la aplicación del metabisulfito de potasio, durante el desfangado, pero a pesar de estos niveles altos de SO₂ lograron fermentar. Ye *et al.* (2014) muestran valores de 35.05 mg/L.

En una fermentación espontánea, 50 mg/L de SO₂ es suficiente para inhibir la mayoría de levaduras nS (Henick-Kling *et al.*, 1998).

5.3.3. Segunda fermentación

Las levaduras seleccionadas para la segunda fermentación de sidra espumosa deben cumplir con una serie de características como son: fermentar en condiciones reductoras, en presencia de etanol, a baja temperatura, bajo alta presión de CO₂, ser altamente floculantes y

no adherirse al vidrio, facilitando así su eliminación durante la clarificación de la sidra (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2001).

Recordemos que, para la segunda fermentación de la sidra espumosa, se seleccionaron tres cepas de levadura (**MM7**, **RY5** y **436.4**), las cuales tenían las características necesarias para su elaboración, y se incluyó la levadura de referencia **K1**.

La sidra tranquila de base realizada a partir de la levadura **K1** se vertió en botellas PET de 300 mL y se le agregó el licor de tiraje que consistía en las cepas seleccionadas y 30 g/L de azúcar. Sin embargo, la segunda fermentación para generar sidra espumosa realizada en este trabajo, se vio inhibida, lo cual pudo deberse a un error en la aplicación de metabisulfito de potasio durante el desfangado del mosto de manzana, obteniendo en la sidra tranquila de base una concentración de anhídrido sulfuroso total de 601.6 mg/L, a pesar de que la sidra fue aireada para reducir los niveles de SO₂, no resultó favorable.

Al agregar el dióxido de azufre a la sidra, en cualquiera de las formas comúnmente utilizadas, se disocia en tres especies moleculares: (SO₂·H₂O), bisulfito (HSO₃⁻) y sulfito (SO₃²⁻), donde el equilibrio de los tres dependerá del pH. El SO₂ molecular es frecuente en pH de 0-2, el anión bisulfito de pH 2-7 y el sulfito en pH de 7-10 (Bakker *et al.*, 1998). Siendo la especie dominante en la sidra el bisulfito, ya que el pH fue de 3.6, el cual resulta ser un compuesto reactivo que interactúa con varios compuestos de la sidra que anulan sus propiedades (Burroughs, 1975).

Por otro lado, el SO₂ existe en forma libre (bisulfito y sulfito) y combinada, el primero es la forma que inhibe el desarrollo de las levaduras principalmente. El SO₂ molecular atraviesa fácilmente la célula por difusión simple debido a que no tiene carga (Stratford y Rose, 1986); una vez dentro de la célula con un pH intracelular de 5.5 a 6.5, se disocia en bisulfito y sulfito; disminuyendo la concentración de SO₂ intracelular y permitiendo la entrada de SO₂ molecular (Imai y Ohno, 1995).

El impacto del dióxido de azufre se ha estudiado principalmente en el crecimiento, esporulación y la recuperación después de la exposición de *S. cerevisiae* (Baldwin, 1951). También se demostró que la resistencia de la levadura difiere según la fase de crecimiento, siendo más resistentes en la fase exponencial que en la fase estacionaria tardía (Ventre, 1934). La levadura expuesta a SO₂ sólo lo tolera durante un corto tiempo antes de sufrir daños irreversibles (Schimz, 1980). Posteriormente, se demostró que la exposición a SO₂ tiene tres

causas (Anacleto y van Uden, 1982): a) daño a la membrana debido a la unión del SO_2 a receptores específicos, metabolitos (impidiendo su uso para vías metabólicas), enzimas (Hinze y Holzer, 1986), proteínas (destruyendo el puente disulfuro), coenzimas y cofactores (Carmack *et al.*, 1950), (b) fuga de metabolitos intracelulares y (c) caída del ATP intracelular debido a la hidrólisis del ATP por una ATPasa unida a la membrana.

Con respecto a la sidra tranquila de base elaborada con la levadura seleccionada **MM7**. En la Figura 5.14 se muestra el seguimiento de la fermentación a partir de la presión. Se observa que el día 7 de fermentación, la levadura de referencia **K1** alcanza una presión de 5.10 atm, seguida de **436.4** (4.39 atm), **MM7** (3.25 atm) y **RY5** (2.91); conforme avanza la fermentación se muestra el mismo comportamiento y al finalizar las levaduras **K1**, **436.4** y **MM7** logran una presión similar de 5.93, 5.83 y 5.75 atm, respectivamente. Siendo la cepa **436.4** la mejor para la segunda fermentación de sidra espumosa debido a su potencial fermentativo y a la presión generada, similar a lo obtenido por la cepa comercial.

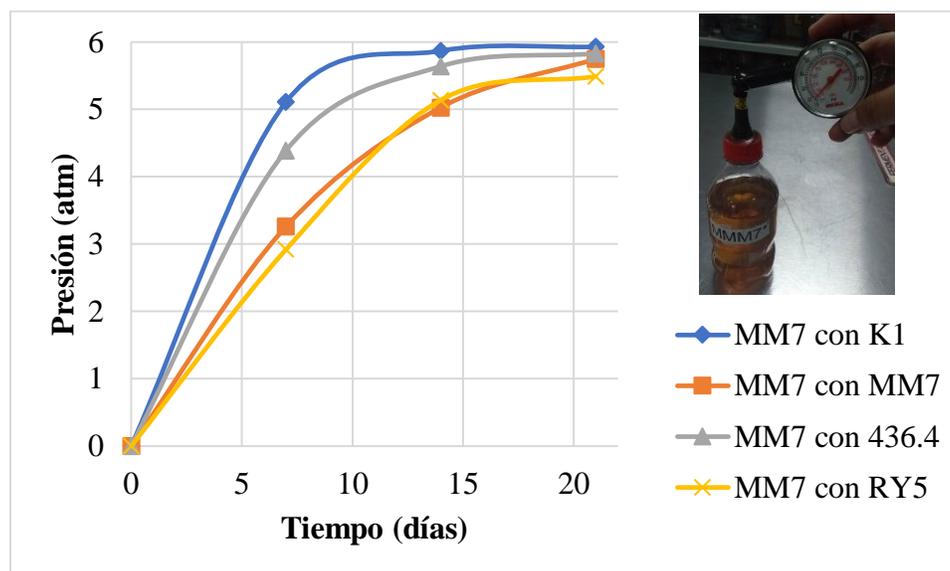


Figura 5.14. Evolución de la presión en función de la levadura utilizada para la segunda fermentación de la sidra tranquila de base obtenida a partir de la levadura nativa seleccionada **MM7**.

Durante la segunda fermentación la levadura fermenta los azúcares convirtiéndolos en etanol y CO_2 , siendo este gas suficiente para elevar la presión interna y producir

efervescencia al momento del servido (Liger-Belair, 2015). A una mayor concentración de azúcares, se genera mayor CO₂, considerando que 5 g L⁻¹ aumenta la presión interna de la botella en 1 atm aproximadamente (Navarre, 1998). Por lo cual, en este estudio 30 g/L de azúcar dieron como resultado 5 atm de presión aproximadamente en las cuatro cepas evaluadas, considerándose como buenas para la elaboración de sidra espumosa.

Asimismo, Soto-Herrera *et al.* (2008) obtuvieron 4 atm de presión en sidras espumosas elaboradas a partir de manzana ‘Golden Delicious’ después de agregar 20 g/L de azúcar a la sidra base embotellada.

5.3.4. Características físicas y químicas de las sidras espumosas

En la Tabla 5.4 se muestran los valores obtenidos para las variables evaluadas de las sidras espumosas.

Tabla 5.4. Características físicas y químicas de sidras espumosas en función de la levadura utilizada para la segunda fermentación.

Tratamiento	Grado alcohólico (°GL)	Azúcares residuales (g/L sacarosa)	ATT (g/L ácido málico)	pH	Acidez volátil (g ácido acético/L)	Anhídrido sulfuroso total (mg/L)
MM7-K1	8.57±0.05 b	1.65±0.01 c	4.28±0.03 a	3.66±0.01 a	0.05±0.03 b	226.13±9.38 a
MM7-MM7	8.59±0.05 b	1.96±0.03 a	4.05±0.03 c	3.64±0.03 ab	0.07±0.03 b	221.87±0.93 a
MM7-436.4	8.13±0.08 c	1.78±0.01 b	4.21±0.03 b	3.61±0.02 b	0.04±0.03 b	202.99±13.02 a
MM7-RY5	8.89±0.05 a	1.80±0.03 b	4.21±0.03 b	3.61±0.01 ab	0.48±0.03 a	205.3±12.01 a

Medias provenientes de tres repeticiones. Letras distintas indican diferencia estadística significativa a $p \leq 0.05$.

Prueba de medias de Tukey.

La concentración de azúcares residuales (< 2 g/L) se encuentra dentro de lo establecido por la NOM-199-SCFI-2017 para sidra gasificada (90 g/L), debido a que no se eliminaron las lías mediante degüelle, pudieron quedar levaduras que degradaron totalmente los azúcares, lo cual indica que hubo una fermentación completa. Siendo menores en la sidra inoculada con la cepa de referencia (1.65 g/L), seguida de la cepa seleccionada **436.4** (1.78 g/L). Las sidras espumosas obtenidas por Hernández (2011) contuvieron 0.4 g/L de azúcar residual. Soto-Herrera *et al.* (2008) observaron un comportamiento diferente al de este

estudio, debido a que el nivel de azúcar osciló en los 6.68 g/L, lo que indica que la levadura no fermentó completamente los azúcares disponibles. Mangas *et al.* (2003) tomaron una sidra fermentada de una bodega, que contaba con características sensoriales adecuadas y se utilizó como sidra base para la elaboración de sidra espumosa, la cual inocularon con una levadura sidrera (*S. cerevisiae*, var. *uvarum*) de la colección de microorganismos del Serida, en la cual obtuvieron un valor mínimo de azúcares residuales, que no pudo ser detectado por la metodología.

En lo que respecta al grado alcohólico, hubo un incremento de aproximadamente 2 °GL, siendo **RY5** la que mostró mayor producción de alcohol (8.89 °GL), seguida de **MM7** (8.59), las cuales mostraron características similares a la cepa comercial. Lo anterior resulta lógico, si consideramos que se agregaron 30 g/L de azúcar. Hernández (2011) agregó 40 g/L de azúcar y una cepa comercial “TradiPan” a la sidra de base, obteniendo sidras espumosas con 9.6 °GL, mientras que Soto-Herrera *et al.* (2008) agregó 20 g/L de azúcar y la cepa comercial **K1**, obteniendo sidras espumosas con valores de 6.26 °GL. Mangas *et al.* (2003) agregaron 20 g/L de sacarosa al licor de tiraje e inoculando una cepa sidrera (*S. cerevisiae*, var. *uvarum*), obteniendo sidras espumosas con concentraciones de alcohol de 7.31 °GL. La norma para sidras espumosas (NOM-199-SCFI-2017) establece valores entre 3 y 6 % de alcohol, por lo que nuestro estudio sobrepasa los límites máximos, debido a que hubo una degradación total de los azúcares.

Recordemos que la sidra de base tenía una acidez inicial de 4.03 g/L ácido málico, por lo que en la obtención de sidra espumosa hubo un leve aumento de la ATT teniendo valores de 4.05 (**MM7**), 4.21 (**436.4** y **RY5**) y 4.28 (**K1**) g/L ácido málico, lo cual indica que las levaduras produjeron ácidos orgánicos durante la segunda fermentación, y entrando dentro de los valores estándar de ATT mencionados por la norma (3.5 a 7.5 g/L ácido málico). Hernández (2011) en la sidra de base elaborada a partir de manzana ‘Golden Delicious’ obtuvo un valor inicial de pH de 4.5, disminuyendo así para la sidra espumosa con un pH de 3.8 y una acidez inicial de 4.42 g/L ácido málico que aumentó para la segunda fermentación a 7.65 g/L ácido málico, lo cual puede referirse a la levadura utilizada y la fecha de cosecha, ya que como se mencionó anteriormente, la concentración de ácidos orgánicos puede diferir debido al estado de madurez de la fruta.

Por su parte, el pH observado en la sidra de base (3.63) disminuyó levemente en las sidras espumosas inoculadas con las cepas **436.4** y **RY5** (3.61), mientras que en las sidras inoculadas con la cepa de referencia **K1** y **MM7** el pH aumentó ligeramente, de 3.66 y 3.64, respectivamente, lo cual indica que hubo una modificación poco notoria en los ácidos orgánicos presentes.

En cuanto a la acidez volátil, y recordando que la sidra de base obtuvo un valor inicial de 0.35 g ácido acético/L, se muestra en la sidra espumosa una reducción de la acidez volátil en las cepas **436.4** (0.04 g ácido acético/L), **K1** (0.05 g ácido acético/L), y **MM7** (0.07 g ácido acético/L), a diferencia de la cepa **RY5** que incrementó su acidez volátil a 0.48 g ácido acético/L. Con valores dentro de estándares establecidos por la norma (1.2 g ácido acético/L). A su vez, Hernández (2011) reporta valores de 0.14 g ácido acético/L en sidra espumosa elaborada con manzana ‘Golden Delicious’ e inoculada con levadura de panificación, mientras que Mangas *et al.* (2003) mencionan niveles de 0.8 g ácido acético/L, sin embargo, no mencionan los valores iniciales de acidez volátil. Este incremento puede deberse al desarrollo de bacterias acéticas que avinagraron la sidra.

Finalmente, para anhídrido sulfuroso se observa una disminución de este compuesto en un 50 % en la sidra espumosa, recordando que la sidra base tenía una concentración de 465.6 mg/L, siendo la sidra espumosa inoculada con la cepa **436.4** (202.99 mg/L) la que menor SO₂ obtuvo, seguida de **RY5** (205.3 mg/L) y **MM7** (221.87 mg/L) todas dentro de los límites establecidos por la norma (300 mg/L). La disminución del SO₂ pudo deberse a que previamente se aireó la sidra tranquila. Por otro lado, Hernández (2011) en sidra espumosa elaborada a partir de una cepa de panificación, menciona valores de 44 mg/L, lo cual corresponde al sulfitado que realizó de 3 g/HL. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, en nuestro estudio pudo haber un error en la manipulación del metabisulfito de potasio, por lo cual hubo mayor presencia de anhídrido sulfuroso.

5.4. Análisis sensorial

5.4.1. Calidad de la efervescencia

La efervescencia es un atributo importante en las bebidas gasificadas, debido a que es lo primero que perciben los consumidores (Maujean *et al.*, 1990).

En la Tabla 5.5 se muestran los valores promedios obtenidos para las distintas variables evaluadas por 10 jueces entrenados mediante una prueba hedónica lineal no estructurada. Se puede observar que las cepas de levaduras nativas utilizadas para la segunda fermentación de sidras espumosas afectaron significativamente el tiempo de reducción de la corona, el número de trenes, el diámetro de las burbujas y la velocidad de efervescencia, por el contrario, no así para la altura de la corona.

Tabla 5.5. Evaluación sensorial mediante prueba hedónica no estructurada de la calidad de efervescencia de sidras espumosas elaboradas con distintas cepas de levaduras seleccionadas nativas.

Tratamiento	Altura de la corona	Tiempo de reducción de la corona	Número de trenes	Diámetro de burbujas	Velocidad de efervescencia
MM7-K1	9.77±0.31 a	8.16±0.36 a	8.00±0.56 a	8.73±0.46 a	6.91±0.50 b
MM7-MM7	9.70±0.35 a	3.97±0.48 c	7.28±0.54 b	8.56±0.40 a	8.09±0.56 a
MM7-436.4	9.89±0.26 a	6.50±0.34 b	1.33±0.43 c	7.88±0.58 b	7.97±0.48 a
MM7-RY5	9.70±0.35 a	3.28±0.42 d	4.80±0.47 d	7.13±0.49 c	6.17±0.45 c

Medias provenientes de 10 repeticiones (jueces). Letras distintas indican diferencia estadística significativa a $p \leq 0.05$. Pruebas de medias de Tukey.

La calificación otorgada por los jueces para la altura de corona fue similar para los cuatro tratamientos, siendo de entre 9.7 y 9.89 en una escala de 0 (nula) a 10 (abundante), lo que indica que la corona formada cubrió toda la copa. Esto pudo deberse a que las cepas transformaron en su totalidad los azúcares presentes en el mosto de manzana en etanol y produjeron CO₂, incrementándose así la presión interna y la espuma al momento del servido (Soto-Herrera *et al.*, 2008).

Para el tiempo de reducción de la corona, todas las cepas difirieron, la cepa comercial **K1** fue la mejor evaluada y con la menor calificación **RY5**, en una escala de 1 (demasiado rápido) a 10 (demasiado lento).

La acumulación de espuma en la superficie depende de algunas sustancias presentes en la sidra como aminoácidos, polisacáridos, ácidos orgánicos (tartárico y málico), por el contrario, el etanol, la acidez volátil y el dióxido de azufre suelen tener una contribución negativa (Picinelli *et al.*, 2005), las cuales tienen propiedades tensoactivas y que son

adsorbidas en la interfase líquido-gas sobre la membrana de la burbuja, logrando estabilizarla sin destruirse; la acumulación de burbujas conduce a la formación de la espuma y a su persistencia en el tiempo (Hidalgo, 2010).

Además, la cepa de referencia **K1** y la cepa nativa formó muchos trenes obteniendo una calificación de 8, seguida de la cepa nativa **MM7** (7.28), donde la escala iba de 0 (nulo) a 10 (muchos).

Asimismo, tanto la cepa **K1** como la cepa **MM7** mostraron los más altos promedios en cuanto al diámetro de burbuja, obteniendo una calificación de 8.73 y 8.56, respectivamente en una escala 0 (muy grande) a 10 (muy pequeño). Liger-Belair y Jeandet (2002) mencionan que una mayor cantidad de CO₂ en el seno del líquido, generado por una concentración alta de azúcar (30 g/L), propicia un menor diámetro de la burbuja, debido a que el radio crítico del sitio de nucleación, donde se generan las burbujas, es más pequeño conforme se incrementa la cantidad de gas presente en el seno del líquido.

Para la velocidad de efervescencia, las cepas **MM7** y **436.4** fueron las mejor evaluadas con calificaciones de 8.09 y 7.97, respectivamente, en una escala de 0 (demasiado lenta) a 10 (demasiado rápida). Soto-Herrera *et al.* (2008) observaron que en la medida que aumenta el contenido de azúcar, la velocidad de ascenso de las burbujas disminuye. De acuerdo a Hidalgo (2010) las burbujas ascienden a una velocidad de 15 cm/s, alcanzando en la superficie de la sidra espumosa un diámetro aproximado de 1 mm.

Diversos autores mencionan que el tipo de levadura utilizada para llevar a cabo la segunda fermentación de sidra espumosa afecta la composición de ésta, debido a la velocidad de autólisis de las levaduras durante el envejecimiento de la sidra, donde los componentes celulares autodegradan y liberan polisacáridos, proteínas, péptidos, aminoácidos libres, lípidos y nucleótidos al medio (Alexandre y Guilloux-Benatier, 2006, Comuzzo *et al.*, 2015), proporcionándole a la sidra, estabilidad de la espuma, disminución de la astringencia, protección de la sidra frente a la oxidación o una mayor complejidad aromática y de sabor (Pozo-Bayón *et al.*, 2009).

Soto-Herrera *et al.* (2008) evaluaron las características de efervescencia en sidras con dos jueces entrenados en una prueba hedónica no estructura de diez puntos, obteniendo valores inferiores a los obtenidos en este estudio en la altura de la corona (4.99), diámetro de burbujas (4.75) y velocidad de efervescencia (3.98) y valores similares de tiempo de

reducción de la corona (3.63) y el número de trenes (4.54). Ellos mencionan que los datos no pudieron ser del todo confiables debido a las limitantes del campo de visión y la iluminación, además se necesita un mayor número de participantes para obtener una mejor confiabilidad de los resultados.

Asimismo, Picinelli *et al.* (2005) evaluaron el efecto de una cepa de *S. bayanus* y una cepa comercial LEVULINE CHP en la calidad sensorial de la efervescencia en sidras espumosas, obteniendo sidras con 7 atm de presión a los 21 meses. Ellos observaron una significancia estadística en función de la levadura para la altura de corona, tiempo de reducción de la corona y la formación de trenes de burbujas de las sidras, comparando con nuestro estudio donde obtuvimos diferencia significativa en todas las variables, excepto la altura de la corona. Picinelli *et al.* (2005) mencionan que esto puede deberse a la actividad metabólica de cada microorganismo a través del tiempo.

Por todo lo anterior, podemos afirmar que las sidras espumosas elaboradas a partir de las cepas seleccionadas, **MM7** y **436.4**, fueron las de mejor calidad espumante de acuerdo a la evaluación de los jueces, obteniendo valores similares a los de la cepa comercial **K1**.

5.4.2. Evaluación de los aspectos visual, olfativo y gustativo

5.4.2.1. Prueba hedónica no estructurada

La prueba hedónica lineal no estructurada consistió en evaluar los aspectos visual, olfativo y gustativo de las sidras espumosas, donde 11 jueces entrenados calificaron en una escala de 0 (me disgusta mucho) a 10 (me gusta mucho).

En la Tabla 5.6 se muestran los resultados obtenidos para las tres variables evaluadas, observando que existen diferencias significativas en función de la cepa de levadura utilizada para la segunda fermentación de sidra espumosa.

Tabla 5.6. Evaluación sensorial por medio de prueba hedónica de sidras espumosas obtenidas con distintas cepas de levaduras.

Tratamiento	Visual	Olfativo	Gustativo
MM7-K1	8.36±0.42 a	9.57±0.31 a	6.88±0.46 b
MM7-MM7	8.53±0.22 a	6.29±0.31 c	4.27±0.43 d
MM7-436.4	7.59±0.26 b	8.50±0.31 b	5.95±0.55 c
MM7-RY5	6.95±0.53 c	3.28±0.29 d	8.55±0.23 a

Medias provenientes de 11 repeticiones (jueces). Letras distintas indican diferencia estadística significativa a $p \leq 0.05$ Pruebas de medias de Tukey.

En el aspecto visual, resaltan las cepas **MM7** y **K1**, seguidas de la cepa **436.4**, lo cual indica que su apariencia era agradable ante el consumidor. A pesar de que las sidras presentaban turbidez, que es considerado un aspecto negativo para la apariencia y aceptación del producto en general debido a que no se realizó el removido de las lías, la calificación otorgada fue buena. Esto se debió a que las levaduras tenían la característica de ser altamente floculantes. Bajaj *et al.* (1997) mencionan que el color de la sidra depende de la presencia de pigmentos presentes en las manzanas como clorofilas, carotenoides y compuestos fenólicos, estos últimos se oxidan y según el grado de oxidación se tienen tonos amarillos, dorados, marrones, además hace referencia a que la turbidez se debe a la presencia de partículas irregulares de tamaño considerable en suspensión.

En el aspecto olfativo, la sidra **K1** destacó mientras que las sidras elaboradas a partir de la cepa **RY5** y **MM7** fueron las peor calificadas debido a que los jueces detectaron aromas a fósforo y floral, mientras que en **MM7** se detectó el aroma floral y sulfuroso, provocado por el ácido sulfhídrico o compuestos azufrados. Le Queré *et al.* (2006) establecen que los aromas característicos de la sidra se deben a las transformaciones producidas durante la fermentación; los aromas frutales se deben a la presencia de acetatos y los florales que están asociados por ejemplo al 2-feniletanol o el acetato 2-fenietilo.

En lo que respecta al aspecto gustativo, se observa que la sidra proveniente de la cepa **RY5** fue la de mejor sabor en comparación con las demás cepas nativas, siendo **MM7** la de sabor más desagradable. Las sidras fueron caracterizadas por los jueces con un sabor seco, amargo, ácido y con resabio a manzana. González (2010) menciona que los responsables del sabor ácido son los ácidos: málico, quínico, láctico, dihidrosiquímico, citramálico y succínico, que se encuentran en concentraciones distintas dependiendo el

desarrollo de la fermentación. Noble (2002) establece que el sabor amargo depende de las proantocianidinas, compuestos que también otorgan la astringencia; el grado de ambas sensaciones varía según el grado de polimerización y difiere entre monómeros y sus derivados.

Es así como podemos resaltar, que las sidras espumosas inoculadas con las cepas nativas tienen un nivel de aceptación similar al de la sidra inoculada con la cepa comercial, por lo cual se podrían realizar sidras espumosas de calidad y aceptación, que tengan tipicidad de la región.

5.4.2.2. Prueba de rangos de Kramer

Asimismo, se realizó una prueba de preferencia de Kramer, la cual consistió en que diez jueces entrenados debían clasificar las sidras espumosas en orden decreciente de preferencia general.

En la Tabla 5.7 se muestran los resultados obtenidos, donde observamos que la prueba de Kramer no revela diferencia estadística significativa entre sidras, ya que los valores obtenidos se encuentran dentro del rango de 17 a 33 según la tabla del Anexo 4. Además, no se encuentra una relación con los resultados obtenidos en la prueba hedónica no estructurada, esto pudo deberse a que hay una compensación entre las variables (gustativa, olfativa y visual) ya que se analizan por separado, y en la prueba de Kramer se evalúa la aceptabilidad general. A pesar de que los comentarios de los jueces fueron referentes a la turbidez, lo cual fue una limitante para que se diera una evaluación correcta, y de que fueron consideradas como ácidas (**MM7** y **436.4**), con aroma a sulfuroso (**RY5** y **MM7**), amargas y secas.

Tabla 5.7. Prueba de preferencia de Kramer de sidras espumosas.

Tratamiento	Lugar				Total
	1	2	3	4	
MM7-K1	6	0	1	4	25 b
MM7-436.4	3	4	2	2	25 b
MM7-MM7	0	4	3	4	33 b
MM7-RY5	2	3	5	1	27 b

Rango para diez repeticiones y cuatro tratamientos: 17-33 según la Tabla de Kramer (Anexo 4).
Letras distintas indican diferencia estadística significativa a $p < 0.05$

5.6. Identificación molecular de las levaduras

Una manera de realizar la identificación de levaduras de forma confiable es mediante la secuenciación de genes, específicamente se ha visto que los genes ribosomales que codifican para la subunidad 5.8S (Figura 5.15) (Álvarez, 2011). En ésta, los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) son secuenciados en levaduras ascomicetas y basidiomicetas (Kurtzman y Robnett, 2014).

Las tres cepas nativas seleccionadas para las microfermentaciones se identificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para confirmar la correcta ejecución de la PCR, se efectuó una electroforesis en gel de agarosa a 1.2 %, obteniendo la imagen que se muestra en la Figura 5.16. Se observa que la banda obtenida por la amplificación se encuentra a una altura de entre 850 y 880 pb.

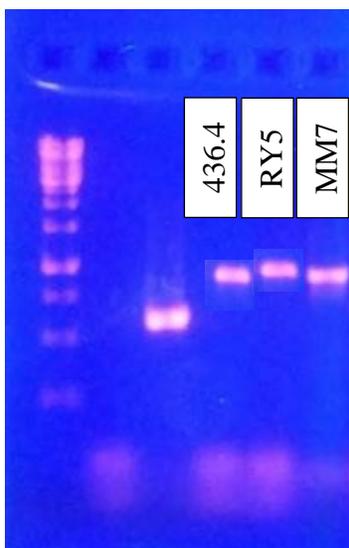


Figura 5.15. Productos de la amplificación ITS1/ITS4 de la subunidad 5.8S, de las tres cepas nativas *Saccharomyces*. En los carriles: marcador de peso molecular (1kb), control negativo, control positivo, **436.4**, **RY5** y **MM7**.

Ya amplificados los productos, se enviaron a secuenciar por el método de didesoxinucleótidos, obteniéndose así las variables de confiabilidad que se muestran en la Tabla 5.8.

Tabla 5.8. Identificación y confiabilidad obtenida para las tres cepas de levaduras seleccionadas.

Cepa	Especie	Valor E	Porcentaje de identidad	Cobertura de consulta
436.4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0 %	87 %	99 %
RY5	<i>Saccharomyces paradoxus</i>	0 %	100 %	99 %
MM7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0 %	99 %	99 %

Las cepas **436.4** y **MM7** fueron identificadas como *S. cerevisiae*, mientras que **RY5** se identificó como *S. paradoxus*. En las tres cepas se obtuvo un valor E del 0 % lo cual significa que es improbable hallar una coincidencia debido al azar. Por otro lado, el porcentaje de identidad de las cepas **RY5** y **MM7** cumple con la totalidad de la secuencia comparada, sin embargo, la cepa **436.4** no coincide en 13 % con la secuencia de referencia, lo cual podría deberse a una contaminación del ADN. Asimismo, la cobertura de consulta corresponde a la fracción de la secuencia identificada que coincide con partes de la secuencia establecida en el GenBank; siendo el porcentaje obtenido por las tres cepas del 99 % de coincidencia (BIO-RAD, 2018).

Es importante destacar que las cepas identificadas como *S. cerevisiae* (**436.4** y **MM7**) presentaron una tolerancia de hasta 6 atm de presión aproximadamente. La alta producción de alcohol de la cepa *S. paradoxus* (**RY5**), durante la elaboración de sidra espumosa no ha sido reportada, ya que se ha estudiado poco en ambientes fermentativos.

Por otro lado, *S. paradoxus* es el pariente silvestre de *S. cerevisiae* (Koufoupanou *et al.*, 2006), la cual se encuentra en exudados de árboles de hoja caduca como el roble, insectos y suelo (Orlic *et al.*, 2007) y de la que poco se ha estudiado su efecto como iniciador en fermentaciones. No obstante, Orlic *et al.* (2007) probaron la capacidad de fermentación de siete cepas indígenas de *S. paradoxus*, las cuales mostraron buen vigor de fermentación, tolerancia a etanol, finalizando la fermentación con baja concentración de azúcares residuales, degradación de hasta un 40 % de ácido málico, con lo que se produjeron vinos secos y semisecos con buenas propiedades enológicas. Bellon *et al.* (2011) generaron un híbrido interespecífico de entre una cepa *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*, el cual obtuvo < 0.25 % de azúcar residual e identificaron 32 compuestos aromáticos; de los cuales 13 cambiaron

significativamente con respecto a la cepa control *S. cerevisiae*. Pataro *et al.* (2000) aislaron esta cepa durante la fermentación espontánea de la caña de azúcar en tres destilerías de aguardiente.

VI. CONCLUSIONES

Aislamiento de levaduras

- Las cepas de levaduras aisladas de distintas variedades de manzana correspondieron en su mayoría al género *Saccharomyces* (76.3 %).
- La velocidad de fermentación del mosto de manzana difirió significativamente dependiendo de la variedad obtenida, siendo el mosto de 436 el que finalizó la fermentación más rápidamente. Esto contrasta con las variedades *Malus x Micromalus*, Rosada, 429b y Joya las cuales realizan fermentaciones incompletas.

Selección de levaduras

- Tres cepas (**MM7**, **436.4** y **RY5**) de entre todos los aislados resultaron altamente floculantes, tolerantes a etanol, SO₂ y presión, poseen actividad β-glucosidasa, efecto *killer* y son altamente fermentativas, para la elaboración de sidra espumosa.

Ensayos de sidra espumosa

- Durante la primera fermentación la cepa nativa **MM7** obtuvo una velocidad de fermentación igual a la cepa de referencia **K1**, la cual duró siete días.
- Las sidras tranquilas y espumosas obtenidas a partir de la fermentación por parte de las cepas nativas presentaron características físicas y químicas dentro de los rangos establecidos por la norma NOM-199-SCFI-2017.
- La máxima tolerancia a la presión obtenida es de 5.83 atm, fue por la cepa **436.4**.
- Las sidras espumosas muestran valores elevados de grado alcohólico, que corresponden a una degradación total de azúcares, considerándose sidras secas.
- La calidad efervescente de las sidras varía en función de la cepa de levadura utilizada, siendo las mejores las elaboradas con las cepas **MM7** y **436.4**, mientras que todas las sidras tuvieron una aceptación general por la prueba de Kramer.

Identificación de las levaduras

- La secuenciación de los productos de PCR permitió una identificación confiable de los microorganismos seleccionados, identificándose las especies *S. cerevisiae* (MM7 y 436.4) y *S. paradoxus* (RY5).

Recomendaciones para futuros trabajos de investigación

Se recomienda realizar aislamientos de levaduras durante varios años en las variedades de manzana establecidas en Querétaro, para determinar la diversidad de especies de levaduras y los factores que pueden afectar o beneficiar la presencia de éstas.

Debido a que no hubo removido de lías de las sidras espumosas elaboradas durante este trabajo, se recomienda realizar la pertinente clarificación y añadir el licor de expedición para evaluar la aceptación gustativa, olfativa y visual. Además, considerar determinar el perfil aromático de las sidras espumosas, para evaluar diferencias entre cepas nativas seleccionadas y su posible uso para la elaboración de productos regionales.

Por otro lado, sería interesante evaluar la calidad de efervescencia de las sidras espumosas obtenidas con las cepas nativas seleccionadas en este trabajo, mediante análisis de imágenes.

Ya que se seleccionó una levadura *S. paradoxus*, se propone realizar microfermentaciones con cepas de esta especie para evaluar su posible uso como iniciador en la elaboración de sidra espumosa y conocer las características que puede otorgar al producto para mejorar su calidad.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alexandre, H. and Guilloux-Benatier, M. (2008). Yeast autolysis in sparkling wine-a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12: 119-127.
- Alonso, S., Laca, A., Rendueles, M., Mayo, B. and Díaz, M. (2015). Cider apple native microbiota characterization by PCR-DGGE. *Journal of the Institute of Brewing* 121:287-289.
- Álvarez, J. (2011). Aislamiento y caracterización genética y enológica de levaduras vínicas autóctonas de uva Prieto Picudo y caracterización aromática de sus vinos. (Tesis doctoral). Recuperado el 10 de octubre de 2018, a partir de: <http://buleria.unileon.es/xmlui/handle/10612/1882>
- Anacleto, J. and Van Uden, N. (1982). Kinetics and activation energetics of death in *Saccharomyces cerevisiae* induced by sulfur dioxide. *Biotechnology and Bioengineering* 24: 2477–2486.
- Andrés-Lacueva, C., López-Tammames, E., Lamuela-Raventós, R., Buxaderas, S. and Torre-Boronat, M. (1996). Characteristics of sparkling base wines affecting foam behavior. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 989-995.
- Arévalo-Villena, M., Díez, J., Úbeda, J., Navascués, E. and Briones, A. (2006). Relationship between *Debaryomyces pseudopolymorphus* enzymatic extracts and release of terpenes in wine. *Biotechnology Progress* 22: 375–381.
- Bajaj, K., Díez de Bethencourt, C., Junquera, B. and González-San José, M. (1997). In vitro enzymic oxidation of apple phenols. *Journal of Food Science and Technology* 34 (4), 296-302.
- Bakker, J., Bridle, P., Bellworthy, S., Garcia-Viguera, C., Reade, H. and Watkins, S. (1998). Effect of sulphur dioxide and must extraction on colour, phenolic composition and sensory quality of red table wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 78:297–307.
- Baldwin, G. (1951) Basic effect of sulphur dioxide on yeast growth. *American Journal of Enology and Viticulture* 2:43–53.
- Bauchard, J. (1994). *Fruits d'ici et d'ailleurs*. Ed. Ouest-France. Francia 176 pp.

- Bellon, J., Erlington, J., Siebert, T., Pollnitz, A., Rose, L., Barros, M. and Chambers. P. (2011). Newly generated interspecific wine yeast hybrids introduce flavour and aroma diversity to wines. *Journal of Applied Microbiology* 91: 603-612
- Belrose. (2012). *World apple review*. Ed. Belrose, Inc., Pullman. WA, USA: 149 p.
- Bevan, E. and Makower, M. (1963). The physiological basis of the *killer* character in yeast. In: *Genetics Today, XI International Congress of Genetics* Geerts (Ed). Pergamon Press, Oxford: 202-203 pp.
- BIO-RAD. (2018). *Biotechnology Explorer™ C. elegans Behavior Kit: Blast extension activity*. Recuperado el 12 de octubre de 2018, a partir de: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lse/literature/10040011.pdf>
- Budak, N., Ozelik, F. and Güzel-Seydim, Z. (2015). Antioxidant activity and phenolic content of Apple cider. Turkey, *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology* 3(6): 356-360.
- Burroughs, L. (1975). Determining free sulfur dioxide in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 26:25–29.
- Buxaderas, S. and López-Tamames, E. (2010). Managing the quality of sparkling wines. En A. G. Reynolds. (Ed.). *Managing wine quality: oenology and wine quality 2*: 164-187. Cambridge: Woodhead publishing limited.
- CABI. (2012). *Crop protection compendium*. Ed. CAB International, Wallingford, UK.
- Caliari, V., Preto, C., Pierre, J. and Bordignon-Luiz, M. (2015). Effect of the Traditional, Charmat and Asti method production of the volatile composition of Moscato Giallo sparkling wines. *LWT-Food Science and Technology* 61: 393-400.
- Cárdenas-Hernández, J. y Fischer, G. (2013). Clasificación botánica y morfología de manzano, peral, duraznero y ciruelo. In: D. Miranda, J. Cárdenas-Hernández y G. Fischer (Eds.), *Los frutales caducifolios en Colombia* (1ª Ed, pp 21–29). Bogotá, Colombia.
- Carmack, M., Moore, M. and Balis, M. (1950). The structure of the antihemorrhagic sodium bisulfite addition product of 2- methyl-1,4-naphthoquinone (menadione). *Journal of the American Chemical Society* 72:844–847.
- Carrascosa, A., Martinez-Rodriguez, A., Cebollero, E. and Gonzalez, R. (2011). *Saccharomyces* Yeasts II: Secondary fermentation. In: A. Carrascosa, R. Muñoz and R.

- González (Eds.), *Molecular Wine Microbiology*. Ed. Elsevier. London, UK: volume 2, pp. 33–48.
- Chandon, J. (2003). *Faites votre cidre*. Ed. D'utovie. París, Francia: 40 p.
- Cruzat, R. y Barrios, E. (2009). Resultados y lecciones en levaduras nativas para la elaboración de vino orgánico de calidad. Ed. Serie Experiencias de Innovación para el Emprendimiento Agrario. Santiago de Chile, Chile: 7-8 pp.
- Comuzzo, P., Battistutta, F., Vendrame, M., Páez, M., Luisi, G. and Zironi, R. (2015). Antioxidant properties of different products and additives in white wine. *Food Chemistry* 168: 107-114.
- Coque, M., Díaz, M. y García, J. (2012). El cultivo del manzano: Variedades de sidra y de mesa. Ed. Mundi-Pren. Madrid, España: 11-13 pp.
- Cousin, F., Le Guellec, R., Schlusshuber, M., Dalmasso, M., Laplace J. and Cretenet, M. (2017). Review Microorganisms in fermented apple beverages: current knowledge and future directions. *Microorganisms* 5: 1-22.
- Delcroix, A., Gunata, Z., Sapis, J., Salmon, J. and Bayonove, C. (1994). Glycosidase activities of three enological yeast strains during winemaking: effect on the terpenol content of Muscat wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 45:291–296.
- De Beaulieu, F. and Ronné, H. (2000). *Les cidres et leurs eaux-de-vie*. Ed. Ouest-France. Rennes, Francia: 63 p.
- Dixon, N. and D. B. Kell. (1989). The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of microorganisms. *Journal of Applied Bacteriology* 67:109–136.
- Drouin, G. (2001). Obtención artesanal de sidra: Evaluación de mezclas de manzanas producidas en la Sierra de Querétaro y de cepas de levadura sobre la calidad del producto. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México: 68 p.
- D.O.P. Sidra de Asturias. (2017). Sidra de Asturias. Recuperado el 9 de abril de 2017, a partir de http://gastronomia.productosdeasturias.com/tienda-online-carnes-de-asturias-quesos-de-asturias/marcas-asturianas-de-calidad/d-o-p-sidra-de-asturias_92_56_104_0_1_in.html
- Dunkel, A. and Hofmann, T. Carbonic Anhydrase IV Mediates the Fizz of Carbonated Beverages. *Angewandte Chemie International Edition* 49: 2975– 2977.

- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49: 329-337.
- Fernández, R., Parra, R., Pérez, S., Vera, M. y Zacatenco, G. (2010). Variedades de manzana recomendadas para las serranías de Hidalgo y Querétaro. México, D.F.: 7 p.
- Flanzy, C. (2003). *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. 2ª Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España: 783 p.
- García, M., Quintero, R. y López-Munguía, A. (2004). *Biotecnología alimentaria*. Ed. Limusa. México: 268-269 pp.
- García, M., Esteve-Zarzoso and Arroyo, T. (2016). Non-*Saccharomyces* yeasts: biotechnological role for wine production. In: A. Morata and I. Loira (Eds.), *Grape and wine biotechnology*. Ed. IntechOpen. 261 p.
- González, M. (2010). La evaluación sensorial. In: D. Blanco y J. Mangas (Eds.), *La manzana y la sidra: bioprocesos, tecnologías de elaboración y control*. Asturgraf. Asturias, España: 139 pp.
- Gutiérrez, M., Tudela, E., García, E. y López, L. (2016). El manzano de sidra: producción y transformación. Ed. Centro de Investigación y Formación Agrarias. Cantabria, España: 8 p.
- Gutiérrez, N. (2014). *Manzano*. Recuperado el 1 de abril de 2017, a partir de <http://seder.jalisco.gob.mx/catalogo-plantas/manzano>
- Henick-Kling, T., Edinger, W., Daniel, P. and Monk, P. (1998) Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *Journal of Applied Microbiology* 84:865–876.
- Hernández, A. (2011). Evaluación de distintas variedades de manzana y mezclas para la elaboración de sidra espumosa. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán: 28 p.
- Hernández, M. y Sastre, A. (1999). *Tratado de nutrición*. Ed. Díaz de Santos. Madrid, España: 441 p.
- Herrero, M., Gonzalo, Á. y García, L. (2010). Tecnología de la producción de sidra. Equipamiento industrial. In: D. Blanco y J. Mangas (Eds.), *La manzana y la sidra*:

- bioprocesos, tecnologías de elaboración y control. Ed. Asturgraf. Asturias, España: 198-207 pp.
- Hidalgo, J. (2010). Tratado de enología. Tomo 1 (2ª Ed.). Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España: 548-567 pp.
- Hidalgo, T. (2002). Tratado de Enología Tomo 2. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España: 258 p.
- Hinze, H. and Holzer, H. (1986). Analysis of the energy metabolism after incubation of *Saccharomyces cerevisiae* with sulfite or nitrite. Archives of Microbiology 145:27–31.
- Hubert, J. (1999). Texte du montage audiovisuel sur la fabrication du cidre. Ed. Ecomusée du Pays de Rennes. Rennes, Francia: 1926 p.
- Ibarz, M., Ferreira, V., Hernández-Orte, P., Loscos, N. and Cacho, J. (2006). Optimization and evaluation of a procedure for the gas chromatographic-mass spectrometric analysis of the aromas generated by fast acid hydrolysis of flavors precursors extracted from grapes. Journal of Chromatography 1116: 217–229.
- Imai, T. and Ohno, T. (1995). The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology 61:3604–3608.
- Infoagro. (2017). El cultivo de la manzana. Recuperado el 25 de marzo de 2017, a partir de http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tradicionales/manzana.htm
- Ingledeu, W.M. (1999). Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: A yeast primer. In: Lyons, T. and Kelsall, D. (Eds.) The Alcohol Textbook. (3ª Ed.). Ed. Nottingham University Press. Nottingham, UK: 49–87.
- Iraistorza, A. y Dueñas, M. (2010). Microbiología de la sidra. En D. Blanco & J. Mangas (Eds.), La manzana y la sidra: bioprocesos, tecnologías de elaboración y control. Ed. Asturgraf. Asturias, España: 105–120 pp.
- Jackson, R. (2017). Wine tasting: A professional handbook. (3ª Ed.). Ed. Elsevier. United Kingdom: 3 pp.
- Jatinder, K., Bhupinder, S., Chadha, B., Ghatora, S. and Harvinder, S. (2007). Purification and characterization of β - glucosidase from *Melanocarpus sp.* MTCC 3922. Electronic Journal of Biotechnology 10: 260–270.
- Jones, R. and Greenfield, P. (1982). Effect of carbon dioxide on yeast growth and

- fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 4: 210-230.
- Kawata, M., Tsutomu, F. and Harayuki, I. (2007). Intraespecies diversity of the Industrial yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus* based on analysis of the sequences of the internal transcribed spacer (ITS) Regions and the D1/D2 Region of 26S rDNA. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 71 (7), 1616-1620.
- Keith, G. (2009). *Wine quality: tasting and selection*. Ed. Wiley-Blackwell. United Kingdom: 14 pp.
- Kerem, Z., Bravdo, B., Shoseyov, O. and Tugendhaft, Y. (2004). Rapid liquid chromatography–ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and must. *Journal of Chromatography* 1052: 211–215.
- Kosseva, M., Joshi, V. and Panesar, P. (2017). *Science and Technology of fruit wine production*. Ed. Elsevier. London, UK: 334 p.
- Koufoupanou, V., Hughes, J., Bell, G. and Burt, A. (2006). The spatial scale of genetic differentiation in a model organism: the wild yeast *Saccharomyces paradoxus*. *Philosophical Transactions of The Royal Society* 361, 1941-1946.
- Kurtzman, C., and Robnett, C. (2014). Description of *Kuraishia piskuri* f.a., sp. a new methanol assimilating yeast and transfer of phylogenetically related *Candida* species to the genera *Kuraishia* and *Nakazawaea* as new combinations. *FEMS Yeast Research* 14 (7), 1028-1036.
- Lemonnier, J. et Duteurtre, B. (1989). Un progrès important pour le champagne et les vins de méthode traditionnelle. *Revue française d’Oenologie* 4: 15–26.
- Le Quééré, J., Husson, F., Renard, C. and Primault, J. (2006). French cider characterization by sensory, technological and chemical evaluations. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* 39, 1033-1044.
- Liger-Belair, G. and Jeandet, P. (2002). Effervescence in a glass of champagne: A bubble history. *Europhysics News* 33, 117-119.
- Liger-Belair, G., Cilindre, C., Beaumont, F., Jeandet, P. and Polidori, G. (2012). Evidence for ascending bubble driven flow patterns in champagne glasses, and their impact on gaseous CO₂ and ethanol release under standard tasting conditions. *Bubble Science, Engineering and Technology* 4: 35-48.
- Liger-Belair, G. (2015). The science of bubbly. Ed. *Scientific American* 16-21.

- Lopes, C. and Sangorrin, M. (2010). Optimization of killer assays for yeast selection protocols. *Revista Argentina de Microbiología* 42: 298–306.
- Mangas, J. (2010). Sidras espumosas. In: D. Blanco y J. Mangas (Eds.), *La manzana y la sidra: bioprocesos, tecnologías de elaboración y control*. Ed. Asturgraf. Asturias, España: 224 p.
- Martí-Raga, M., Martín, V., Gil, M., Sancho, M., Zamora, F., Mas, A. and Beltran, G. (2016). Contribution of yeast and base wine supplementation to sparkling wine composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96 (15): 4962-4972.
- Martínez Peniche, R. Á. (2014). Catálogo de genotipos de manzana para la sierra de Querétaro: descripción, calidad, tolerancia a enfermedades y vocación industrial. Ed. CONCYTEQ. Querétaro, México.
- Martínez-Rodríguez, A., Carrascosa, A., Barcenilla, J., Pozo-Bayón, A. and Polo, C. (2001) Autolytic capacity and foam analysis as additional criteria for the selection of yeast strains for sparkling wine production. *Food Microbiology* 18, 183–191.
- Martínez-Rodríguez, A. and Pueyo, E. (2009). Sparkling wines and yeast autolysis. En M. V. Moreno-Arribas and M. C. Polo. (Eds.), *Wine chemistry and biochemistry*. Ed. Springer. New York: Springer: 61-88 pp.
- Martín, L., Tomé, J., Puxeau, M., Brull, A., Nart, E. y Andorrá, I. (2015). Levaduras autóctonas para producir vinos libres de dióxido de azufre. In: J. Guasch, O. Busto, M. Mestres, L. Aceña y J. Capdevilla (Eds.), *Enología: Innovación vitivinícola*. Ed. Gienol. Tarragona, España: 250 p.
- Mas, A., Torija, M., Beltrán, G., Novo, M., Hierro, N., Oblat, M., Rozés, N. y Guillamón, J. (2006). Selección de Levaduras. Ed. Alfa Editores Técnicos. México, D.F.
- Mateo, J. and Maicas, S. (2016). Review Application of non-*Saccharomyces* yeasts to wine-making process. *Fermentation* 2: 1-13.
- Maujean, A., Poinssaut, P., Dantan, H., Brissonet, F. et Cossiez, E. (1990). Étude de la tenue et de la qualité de mousse des vins effervescents. II. Mise au point d'une technique de mesure de la moussabilité, de la tenue et de la stabilité de la mousse des vins effervescents. *Bull. Off. Int. Vigne Vins* 63: 405-427.

- Medina, K., L. Ferreri, L. Fariña, E. Boido, E. Dellacassa, C. Gaggero, y F. Carrau. (2007). Aplicación de la levadura *Hanseniaspora vineae* en cultivos mixtos con *Saccharomyces cerevisiae* en la vinificación. *Enología*, 6: 1-6.
- Merwin, I., Valois, S. and Padilla-Zakour, O. (2008). Cider Apples and Cider-Making Techniques in Europe and North America. *Horticultural Reviews* 34: 365-415 pp.
- Miranda-Castilleja, D., Ortiz-Barrera, E., Arvizu-Medrano, S., Ramiro-Pacheco, J., Aldrete-Tapia, J. y Martínez-Peniche, R. (2015). Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces* spp. nativas de viñedos en Querétaro. *Agrociencia* 49: 759-773.
- Miranda, D., Aldrete, J., Arvizu, S., Hernández, M., Soto, L. and Martínez, R. (2017). Growth kinetics for the selection of yeast strains for fermented beverages. In: Morata, A. y Loira, I. (Eds.), *Yeast - Industrial Applications*. Ed. InTech: 74 – 75.
- Morán, J. (2014). Evaluación de aptitudes agroindustriales de genotipos de manzana establecidos en la sierra de Querétaro. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química en Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México. 87 p.
- Montoya, H. (2008). Microbiología básica para el área de la salud y afines (2ª Ed.). Universidad de Antioquia. Antioquia, Colombia. 160 p.
- Mukherjee, V., Steensels, J., Lievens, B., Van de Voorde, I., Verplaetse, A., Aerts, G., Willems, K., Thevelein, J., Verstrepen, K. and Ruyters, S. (2014). Phenotypic evaluation of natural and industrial *Saccharomyces* yeasts for different traits desirable in industrial bioethanol production. *Applied Microbiology of Biotechnology* 98: 9483–9498.
- Nally, M., Maturano, Y., Vázquez, F. y Toro, M. (2005). Comportamiento de una cepa salvaje de *Saccharomyces cerevisiae* killer y su isogénica sensible respecto de diferentes fuentes de nitrógeno en cultivos mixtos. *Revista Argentina de Microbiología* 37: 73-77.
- Navarre, J. (1998). *Manuel d'Œnologie* (4ª Ed.). Ed. J.B. Bailliere. Paris, Francia: 354 p.
- NCBI. (2017). Taxonomy browser. Recuperado el 26 de marzo de 2017, a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=3750>
- Nogueira, A. and Wosiacki, G. (2012). Apple cider fermentation. En Y. Hui and E. Özgül (Eds.), *Handbook of plant-based fermented food and beverage technology* (2ª Ed, pp. 209–235). Ed. CRC Press. Boca Ratón, E.E. UU. 209-235 pp.

- OIV. (2017). Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts (2 vol.). Recuperado el 28 de abril de 2017, a partir de <http://www.oiv.int/fr/normes-et-documents-techniques/methodes-danalyse/recueil-des-methodes-internationales-danalyse-des-vins-et-des-mouts-2-vol>
- Orlic, S., Redzepovic, S., Jeromel, A., Herjavec, S. and Iacumin, L. (2007). Influence of indigenous *Saccharomyces paradoxus* strains on Chardonnay wine fermentation aroma. *International Journal of Food Science and Technology* 42, 95-101.
- Paz-Cuadra, A., Guzmán-Pantoja, L., Martínez-Peniche, R., Caltzontzin-Fernández, K., Pacheco-Aguilar, J. and Arvizu-Medrano, S. (2014). Evaluation of the susceptibility of Apple genotypes in Queretaro, Mexico to powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*). *Scientia Horticulturae* 170: 53-60.
- Pérez, G., Fariña, L., Barquet, M., Boido, E., Gaggero, C., Dellacassa, E. and Carrau, F. (2011). A quick screening method to identify β -glucosidase activity in native wine yeast strains: application of Esculin Glycerol Agar (EGA) medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 47–55.
- Palmeri, R. and Spagna, G. (2007). β -glucosidase in cellular and acellular form for winemaking application. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 382–389.
- Pando, R., Querol, A. and Suárez, B. (2010). Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. *Food Microbiology* 27: 503–508.
- Pataro, C., Guerra, J., Petrillo-Peixoto, M., Mendonca-Hagler, L., Linardi, V. and Rosa, C. (2000). Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. *Journal of Applied Microbiology* 80, 24-31.
- Pereda, M. (2011). Elaboración de sidra natural ecológica. Ed. Mundi-Prensa. España: 66, 115-117.
- Perret, A., Bonhommeau, D., Liger-Belair, G., Cours, T. and Alijah, A. (2014). CO₂ diffusion in Champagne wines: a molecular dynamics study. *The Journal of Physical Chemistry* 118: 1839-1847.
- Picinelli, A., Suárez, B., Moreno, J., Rodríguez, R., Caso-García, L. and Mangas, J. (2000). Chemical characterization of asturian cider. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 48, 3997-4002.

- Picinelli, A., Fernández, N., Rodríguez, R. and Suárez, B. (2005). Sensory and Foaming Properties of Sparkling Cider. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 53, 10051-10056.
- Pozo-Bayón, M., Andujar-Ortiz, I., Alcaide-Hidalgo, J., Martín-Álvarez, P. and Moreno-Arribas, M. (2009) Characterization of commercial inactive dry yeast preparations for enological use based on their ability to release soluble compounds and their behavior toward aroma compounds in model wines. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 57(22):10784-10792.
- Ramírez-Mora, E., Martínez, R. y Fernández-Montes, M. (2005). Efecto de la concentración de azúcar y la cepa de levadura en la calidad de sidra. *Brazilian Journal of Food Technology* 5: 89–95.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubordieu, D., Donèche, B. and Lonvaud A. (2003). *Trattato di enologia*, Vol. I. Ed. Edagricole, Bologna, Italia: 193-220.
- Rieger, M. (2006). *Introduction to fruit crops*. Ed. Food Products Press. Binghamton, UK.
- SAGARPA. (2012). Plan Rector. Recuperado el 24 de marzo de 2013, a partir de <http://www.unifrut.com.mx>
- Schmitt, M. and Breinig, F. (2002). The viral Killer system in yeasts: from molecular biology to application. *FEMS Microbiology Reviews* 26 (3): 257–276.
- Schimz, K. (1980). The effect of sulfite on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology* 125:89–95.
- SIAP. (2017). Avance de siembras y cosechas. Resumen nacional por cultivo. Recuperado el 30 de abril de 2017, a partir de <http://infosiap.siap.gob.mx>
- Soto-Herrera, J., Castillo-Castañeda, E. y Martínez-Peniche, R. A. (2008). Efecto del nivel de azúcar en la calidad de la efervescencia en sidra espumosa mediante análisis de imágenes. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 6 (1): 33–40.
- Suárez, B., Pando, R., Lastra, A. and Mangas, J. (2008). Screening of cider yeasts for sparkling cider production. *Food Microbiology* 25: 690-697.
- Suárez, L. (2004). *Microbiología enológica. Fundamentos de vinificación (Tercera)*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España: 634 p.
- Stratford, M. and Rose, I. (1986). Transport of sulphur dioxide by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology* 132:1–6.

- Todd, B., Fleet, G. and Henschke, P. (2000). Promotion of autolysis through the interaction of killer and sensitive yeasts: Potential application in sparkling wine production. *American Journal of Enology and Viticulture* 51, 65–72.
- Tofalo, R., Perpetuini, G., Di Gianvito, P., Arfelli, G., Schirone, M., Corsetti, A. and Suzzi, G. (2016). Characterization of specialized flocculent yeasts to improve sparkling wine fermentation. *Journal of Applied Microbiology* 120: 1574-1584.
- USDA. (2017). USDA: Análisis del mercado mundial de manzanas. Recuperado el 11 de noviembre de 2018, a partir de <http://www.agrimundo.gob.cl/?p=35063>
- Varela, C., Pizarro, F. and Agosin, E. (2004). Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. *Applied and environmental microbiology* 70: 3392-3400.
- Velázquez, A. (2014). El precio de la manzana nacional por debajo del precio de manzana de importación. Recuperado el 26 de marzo de 2017, a partir de <http://observatoriodeprecios.com.mx/index.php/precios-productos/productos-agropecuarios/manzana/169-el-precio-de-la-manzana-nacional-por-debajo-del-precio-de-manzana-de-importacion>
- Ventre, J. (1934). Les levures en vinification: étude du ferment et du milieu - conditions d'emploi. *Revue de Viticulture* 5: 439-451.
- Verstrepen, K., Derdelickx, G., Verachtert, H. and Delvaux, F. (2003). Yeast flocculation: what brewers should know. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61: 197-205.
- Walker, G. (2011). Yeasts. In: Schaechter, M. (Ed.), *Eukaryotic Microbes*. Ed. Academic Press/Elsevier Science Publishers. Oxford, UK: 3–17.
- Walker, G. and Stewart, G. (2016). Review: *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages* 2, 30: 1-12 pp.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungi ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Ed. Academic Press. San Diego, EE. UU. 315–322 pp.
- Ye, M., Yue, T. y Yuan, Y. (2014). Evolution of polyphenols and organic acids during the fermentation of apple cider. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94: 2951-2957.

Zamora, Q. (2006). Caracterización fenotípica de levaduras presentes durante el proceso de elaboración de la bacanora. Ed. Universidad de Sonora. Sonora, México: 85 p.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Ficha de evaluación sensorial para sidra espumosa tipo Champaña.

Fecha: _____

Sexo: _____

Edad: _____

Instrucciones: marque con el símbolo que corresponde a cada muestra, el grado de aceptación para cada una de las características observadas en la sidra.

X = HF32 * = PL93 ● = DW25 Δ = AS17

• *Visual*



Me disgusta mucho

Me gusta mucho

• *Olfativo*



Me disgusta mucho

Me gusta mucho

• *Gustativo*



Me disgusta mucho

Me gusta mucho

Anexo 2. Ficha de evaluación de la aceptación general para la prueba de preferencia de
Kramer.

Fecha: _____

Sexo: _____

Instrucciones: observe, sienta y pruebe las muestras las veces que sea necesario y, con la ayuda de las tarjetas, clasifique las muestras por orden decreciente (de mayor preferencia a menor). Anote sus resultados en el recuadro apropiado.

--	--	--	--

Comentarios (opcional):

Anexo 3. Tabla de intervalos totales requeridos para una significancia al 5 % ($p < 0.05$).

No. de repeticiones	Número de tratamientos o intervalos de las muestras *										
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2				3-9	3-11	3-13	4-14	4-16	4-18	5-19	5-21
3		4-8	4-11	5-13	6-15	6-18	7-20	8-22	8-25	9-27	10-29
4		5-11	5-15	6-18	6-22	7-25	7-29	8-32	8-36	8-39	9-43
		5-11	6-14	7-17	8-20	9-23	10-26	11-29	13-31	14-34	15-37
5		6-14	7-18	8-22	9-26	9-31	10-35	11-39	12-43	12-48	13-52
	6-9	7-13	8-17	10-20	11-24	13-27	14-31	15-35	17-38	18-42	20-45
6	7-11	8-16	9-21	10-26	11-31	12-36	13-41	14-46	15-51	17-55	18-60
	7-11	9-15	11-19	12-24	14-28	16-32	18-36	20-40	21-45	23-49	25-53
7	8-13	10-18	11-24	12-30	14-35	15-41	17-46	18-52	19-58	21-63	22-69
	8-13	10-18	13-22	15-27	17-32	19-37	22-41	24-46	26-51	28-56	30-61
8	9-15	11-21	13-27	15-33	17-39	18-46	20-52	22-58	24-64	25-71	27-77
	10-14	12-20	15-25	17-31	20-36	23-41	25-47	28-52	31-57	33-63	36-68
9	11-16	13-23	15-30	17-37	19-44	22-50	24-57	26-64	28-71	30-78	32-85
	11-16	14-22	17-28	20-34	23-44	26-46	29-52	32-58	35-64	38-70	41-76
10	12-18	15-25	17-33	20-40	22-48	25-55	27-63	30-70	32-78	35-85	37-93
	12-18	16-24	19-31	23-37	26-44	30-50	34-56	37-63	40-70	44-76	47-83
11	13-20	16-28	19-36	22-44	25-52	28-60	31-68	34-76	36-85	39-93	42-101
	14-19	18-26	21-34	25-41	29-48	33-55	37-62	41-69	45-76	49-83	53-90
12	15-21	18-30	21-39	25-47	28-56	31-65	34-74	38-82	41-91	44-100	47-109
	15-21	19-29	24-36	28-44	32-52	37-59	41-67	45-73	50-82	54-90	58-98
13	16-23	20-32	24-41	27-51	31-60	35-69	38-79	42-88	45-98	49-107	52-117
	17-22	21-31	26-39	31-47	35-56	40-64	45-72	50-80	54-89	59-97	64-105
14	17-25	22-34	26-44	30-54	34-64	38-74	42-84	46-94	50-104	54-114	57-125
	18-24	23-35	28-42	33-51	38-60	44-68	49-77	54-86	59-95	65-103	70-112
15	19-26	23-37	28-47	32-58	37-68	44-79	46-89	50-100	54-111	58-122	63-132
	19-26	25-35	30-45	36-54	42-63	47-73	53-82	59-91	64-101	70-110	75-120
16	20-28	25-39	30-50	35-61	40-72	45-83	49-95	54-106	59-117	63-129	68-140
	21-27	27-37	33-47	39-57	45-67	51-77	57-87	62-98	69-107	75-117	81-127
17	22-29	27-41	32-53	38-64	43-76	48-88	53-100	58-112	63-124	68-136	73-148
	22-29	28-40	35-50	41-61	48-71	54-82	61-92	67-103	74-113	81-123	87-134
18	23-31	29-43	34-56	40-68	46-80	52-92	57-103	61-118	68-130	73-143	79-155
	24-30	30-42	37-53	44-64	51-73	58-86	63-97	72-108	79-119	86-130	93-141
19	24-33	30-46	37-58	43-71	49-84	55-97	61-110	67-123	73-136	78-150	84-163
	25-32	32-44	39-56	47-67	54-79	62-90	69-102	76-114	84-125	91-137	99-148
20	26-34	32-48	39-61	45-95	52-88	58-102	65-113	71-129	77-143	83-157	90-170
	26-34	34-46	42-58	50-70	57-83	65-95	73-107	81-119	89-131	97-143	105-155

* Los números superiores en una casilla son los rangos para los tratamientos no determinados mientras los números inferiores son los rangos para los tratamientos determinados. El rango utilizado está marcado con letras negritas.

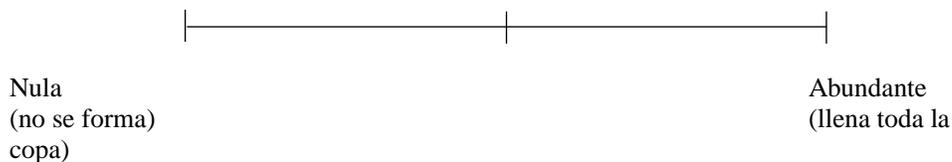
Anexo 4. Ficha de evaluación visual para sidra espumosa tipo Champaña.

Fecha: _____ Sexo: _____

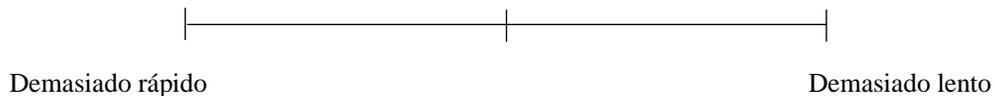
Instrucciones: marque con el símbolo que corresponde a cada muestra, el grado de aceptación para cada una de las características observadas en la sidra.

X = MT45 * = YF33 ● = GA52 Δ = HI97

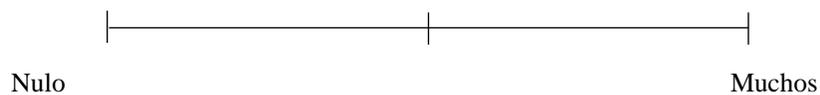
- *Altura máxima de la corona*



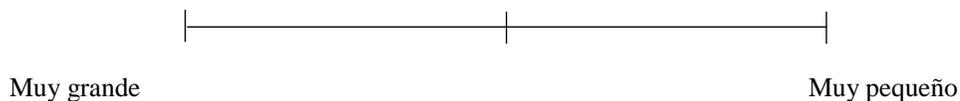
- *Tiempo en que se reduce la corona*



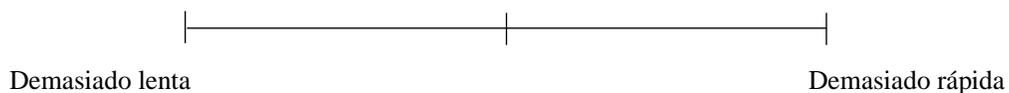
- *Número de trenes*



- *Diámetro de las burbujas*



- *Velocidad de efervescencia*



Anexo 5. Lista de levaduras aisladas de la fermentación espontánea de 14 variedades de manzana. Clave y género comprobado mediante tres pases en medio lisina.

No.	Clave de cepa	Género comprobado en medio lisina	Variedad de manzana
1	429a.1	<i>Saccharomyces</i>	'429a'
2	429a.2	<i>Saccharomyces</i>	'429a'
3	429a.3	<i>Saccharomyces</i>	'429a'
4	429a.4	<i>Saccharomyces</i>	'429a'
5	429a.5	<i>Saccharomyces</i>	'429a'
6	429a.6	<i>Saccharomyces</i>	'429a'
7	429a.7	<i>Saccharomyces</i>	'429a'
8	429a.8	<i>Saccharomyces</i>	'429a'
9	429a.9	<i>Saccharomyces</i>	'429a'
10	429a.10	<i>Saccharomyces</i>	'429a'
11	RY1	<i>Saccharomyces</i>	'Rayada'
12	RY2	<i>Saccharomyces</i>	'Rayada'
13	RY3	<i>Saccharomyces</i>	'Rayada'
14	RY4	<i>Saccharomyces</i>	'Rayada'
15	RY5	<i>Saccharomyces</i>	'Rayada'
16	RY6	<i>Saccharomyces</i>	'Rayada'
17	RY7	<i>Saccharomyces</i>	'Rayada'
18	RY8	<i>Saccharomyces</i>	'Rayada'
19	RY9	<i>Saccharomyces</i>	'Rayada'
20	RY10	<i>Saccharomyces</i>	'Rayada'
21	RD1	<i>No-Saccharomyces</i>	'Red Delicious'
22	RD2	<i>Saccharomyces</i>	'Red Delicious'
23	RD3	<i>Saccharomyces</i>	'Red Delicious'
24	RD4	<i>Saccharomyces</i>	'Red Delicious'
25	RD5	<i>Saccharomyces</i>	'Red Delicious'
26	RD6	<i>Saccharomyces</i>	'Red Delicious'
27	RD7	<i>Saccharomyces</i>	'Red Delicious'
28	RD8	<i>No-Saccharomyces</i>	'Red Delicious'
29	RD9	<i>Saccharomyces</i>	'Red Delicious'
30	RD10	<i>No-Saccharomyces</i>	'Red Delicious'
31	428.1	<i>Saccharomyces</i>	'428'
32	428.2	<i>Saccharomyces</i>	'428'
33	428.3	<i>Saccharomyces</i>	'428'
34	428.4	<i>Saccharomyces</i>	'428'
35	428.5	<i>Saccharomyces</i>	'428'

36	428.6	<i>Saccharomyces</i>	'428'
37	428.7	<i>Saccharomyces</i>	'428'
38	428.8	<i>Saccharomyces</i>	'428'
39	428.9	<i>Saccharomyces</i>	'428'
40	428.1	<i>Saccharomyces</i>	'428'
41	424.1	<i>No-Saccharomyces</i>	'424'
42	424.2	<i>No-Saccharomyces</i>	'424'
43	424.3	<i>Saccharomyces</i>	'424'
44	424.4	<i>Saccharomyces</i>	'424'
45	424.5	<i>Saccharomyces</i>	'424'
46	424.6	<i>No-Saccharomyces</i>	'424'
47	424.7	<i>Saccharomyces</i>	'424'
48	424.8	<i>No-Saccharomyces</i>	'424'
49	424.9	<i>Saccharomyces</i>	'424'
50	424.1	<i>No-Saccharomyces</i>	'424'
51	MM1	<i>No-Saccharomyces</i>	' <i>Malus x Micromalus</i> '
52	MM2	<i>Saccharomyces</i>	' <i>Malus x Micromalus</i> '
53	MM3	<i>No-Saccharomyces</i>	' <i>Malus x Micromalus</i> '
54	MM4	<i>Saccharomyces</i>	' <i>Malus x Micromalus</i> '
55	MM5	<i>No-Saccharomyces</i>	' <i>Malus x Micromalus</i> '
56	MM6	<i>No-Saccharomyces</i>	' <i>Malus x Micromalus</i> '
57	MM7	<i>Saccharomyces</i>	' <i>Malus x Micromalus</i> '
58	MM8	<i>Saccharomyces</i>	' <i>Malus x Micromalus</i> '
59	MM9	<i>No-Saccharomyces</i>	' <i>Malus x Micromalus</i> '
60	MM10	<i>Saccharomyces</i>	' <i>Malus x Micromalus</i> '
61	467.1	<i>Saccharomyces</i>	'467'
62	467.2	<i>Saccharomyces</i>	'467'
63	467.3	<i>Saccharomyces</i>	'467'
64	467.4	<i>Saccharomyces</i>	'467'
65	467.5	<i>Saccharomyces</i>	'467'
66	467.6	<i>Saccharomyces</i>	'467'
67	467.7	<i>Saccharomyces</i>	'467'
68	467.8	<i>Saccharomyces</i>	'467'
69	467.9	<i>Saccharomyces</i>	'467'
70	467.1	<i>Saccharomyces</i>	'467'
71	JY1	<i>Saccharomyces</i>	'Joya'
72	JY2	<i>No-Saccharomyces</i>	'Joya'
73	JY3	<i>Saccharomyces</i>	'Joya'
74	JY4	<i>Saccharomyces</i>	'Joya'
75	JY5	<i>No-Saccharomyces</i>	'Joya'

76	JY6	<i>Saccharomyces</i>	‘Joya’
77	JY7	<i>No-Saccharomyces</i>	‘Joya’
78	JY8	<i>Saccharomyces</i>	‘Joya’
79	JY9	<i>No-Saccharomyces</i>	‘Joya’
80	JY10	<i>No-Saccharomyces</i>	‘Joya’
81	429b.1	<i>Saccharomyces</i>	‘429b’
82	429b.2	<i>Saccharomyces</i>	‘429b’
83	429b.3	<i>Saccharomyces</i>	‘429b’
84	429b.4	<i>Saccharomyces</i>	‘429b’
85	429b.5	<i>Saccharomyces</i>	‘429b’
86	GD1	<i>No-Saccharomyces</i>	‘Golden Delicious’
87	GD2	<i>Saccharomyces</i>	‘Golden Delicious’
88	GD3	<i>Saccharomyces</i>	‘Golden Delicious’
89	GD4	<i>No-Saccharomyces</i>	‘Golden Delicious’
90	GD5	<i>Saccharomyces</i>	‘Golden Delicious’
91	GD6	<i>Saccharomyces</i>	‘Golden Delicious’
92	GD7	<i>No-Saccharomyces</i>	‘Golden Delicious’
93	GD8	<i>Saccharomyces</i>	‘Golden Delicious’
94	GD9	<i>No-Saccharomyces</i>	‘Golden Delicious’
95	GD10	<i>Saccharomyces</i>	‘Golden Delicious’
96	AN1	<i>Saccharomyces</i>	‘Aguanueva’
97	AN2	<i>Saccharomyces</i>	‘Aguanueva’
98	AN3	<i>Saccharomyces</i>	‘Aguanueva’
99	AN4	<i>Saccharomyces</i>	‘Aguanueva’
100	AN5	<i>Saccharomyces</i>	‘Aguanueva’
101	AN6	<i>Saccharomyces</i>	‘Aguanueva’
102	AN7	<i>Saccharomyces</i>	‘Aguanueva’
103	AN8	<i>Saccharomyces</i>	‘Aguanueva’
104	AN9	<i>Saccharomyces</i>	‘Aguanueva’
105	AN10	<i>Saccharomyces</i>	‘Aguanueva’
106	436.1	<i>Saccharomyces</i>	‘436’
107	436.2	<i>Saccharomyces</i>	‘436’
108	436.3	<i>Saccharomyces</i>	‘436’
109	436.4	<i>Saccharomyces</i>	‘436’
110	436.5	<i>Saccharomyces</i>	‘436’
111	436.6	<i>Saccharomyces</i>	‘436’
112	436.7	<i>Saccharomyces</i>	‘436’
113	436.8	<i>Saccharomyces</i>	‘436’
114	436.9	<i>Saccharomyces</i>	‘436’
115	436.1	<i>Saccharomyces</i>	‘436’

116	RG1	<i>Saccharomyces</i>	‘Royal Gala’
117	RG2	<i>No-Saccharomyces</i>	‘Royal Gala’
118	RG3	<i>Saccharomyces</i>	‘Royal Gala’
119	RG4	<i>Saccharomyces</i>	‘Royal Gala’
120	RG5	<i>No-Saccharomyces</i>	‘Royal Gala’
121	RG6	<i>Saccharomyces</i>	‘Royal Gala’
122	RG7	<i>Saccharomyces</i>	‘Royal Gala’
123	RG8	<i>Saccharomyces</i>	‘Royal Gala’
124	RG9	<i>Saccharomyces</i>	‘Royal Gala’
125	RG10	<i>Saccharomyces</i>	‘Royal Gala’
126	RS1	<i>No-Saccharomyces</i>	‘Rosada’
127	RS2	<i>No-Saccharomyces</i>	‘Rosada’
128	RS3	<i>No-Saccharomyces</i>	‘Rosada’
129	RS4	<i>No-Saccharomyces</i>	‘Rosada’
130	RS5	<i>No-Saccharomyces</i>	‘Rosada’
131	RS6	<i>No-Saccharomyces</i>	‘Rosada’
132	RS7	<i>No-Saccharomyces</i>	‘Rosada’
133	RS8	<i>Saccharomyces</i>	‘Rosada’
134	RS9	<i>No-Saccharomyces</i>	‘Rosada’
135	RS10	<i>Saccharomyces</i>	‘Rosada’