



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

TESIS

**“SOBREVIVENCIA DE *Salmonella enterica* EN SIDRAS
ARTESANALES ELABORADAS CON DOS VARIEDADES DE
MANZANA EN FUNCIÓN DE LA LEVADURA
FERMENTATIVA”**

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

Presenta

Q.A. José Daniel Moreno Icedo

Dirigido por:

Dr. Ramón Álar Martínez Peniche.

CU, Santiago de Querétaro, Qro, Diciembre de 2020.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Sobrevivencia de *Salmonella enterica* en sidras artesanales elaboradas con dos variedades de manzana en función de la levadura fermentativa

Tesis

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

Presenta:

Q.A. José Daniel Moreno Icedo

Dirigido por:

Dr. Ramón Álvar Martínez Peniche

Dr. Ramón Alvar Martínez Peniche
Presidente

Firma

Dra. Sofía María Arvizu Medrano
Secretario

Firma

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar
Vocal

Firma

Dr. Miguel Angel Ramos López
Suplente

Firma

Dra. Rocio Campos Vega
Suplente

Firma

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Director de la Facultad

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

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Diciembre de 2020
México

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE:

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que incluí los detalles metodológicos necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras.

Este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



José Daniel Moreno Icedo

Nombre y Firma del Estudiante

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ramón Martínez Peniche, por compartir conmigo su conocimiento, además de su apoyo a lo largo de este proceso.

A mi comité de tesis, por sus valiosas aportaciones a mi trabajo, y por los consejos brindados.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el financiamiento para llevar a cabo este posgrado.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por la oportunidad de cursar el posgrado, permitiéndome crecer y desarrollarme.

A la Dra. Montserrat Hernández y el equipo de LECRIMA, por permitirme trabajar junto a ellos y por sus invitaciones a participar en diferentes eventos y capacitaciones.

A mis compañeros y amigos de la UAQ, por sus consejos, apoyo, orientación y amistad.

A mis amigos Carlos, Emmy y Regina, que a pesar de la distancia, siempre estuvieron ahí para apoyarme.

A mis familia, especialmente a mis padres y abuelos, por creer en mí, apoyarme, impulsarme y siempre darme esa palabra de aliento para seguir adelante.

Y especialmente a Norma, gracias por acompañarme, brindarme siempre tu apoyo y por compartir y celebrar juntos cada logro.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	1
SUMMARY	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. El Manzano	5
2.1.1. Origen y antecedentes	5
2.1.2. Importancia	5
2.1.3. Botánica.....	7
2.2. La sidra	13
2.2.1. Definición.....	13
2.2.2. Tipos de sidra	14
2.2.3. Proceso de elaboración de sidra espumosa tipo champaña	15
2.3. Levaduras fermentativas	16
2.3.1. Características generales de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
2.3.2. Morfología	17
2.3.3. Criterios de selección	18
2.4. Bacterias relevantes en alimentos fermentados	20
2.4.1. Bacterias fermentativas	20
2.4.2. Bacterias deterioradoras	20
2.5. Patógenos de humanos en bebidas fermentadas	21
2.5.1 Presencia y brotes.....	21
2.5.2. Supervivencia.....	21
2.5.3. Presencia y supervivencia en manzana y sus derivados.....	22
2.6. <i>Salmonella enterica</i>	24
2.6.1. Taxonomía y morfología.....	24
2.6.2. Condiciones de crecimiento	25
2.6.3. Presencia en alimentos	25
2.6.4. Salmonelosis: efectos	26
OBJETIVOS	27
General	27
Específicos	27
III. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. Sitio experimental y material biológico	28
3.2. Elaboración de sidra	28
3.3. Análisis físicos y químicos de las sidras	29
3.3.1. Densidad.....	29
3.3.2. Sólidos solubles totales (°Bx).....	29
3.3.3. Acidez total titulable	30

3.3.4. pH.....	30
3.3.5. Grado alcohólico	30
3.3.6. Azúcares reductores	30
3.3.7. Acidez volátil	31
3.4. Inducción de resistencia a rifampicina a <i>Salmonella enterica</i>.....	32
3.5. Inducción de resistencia a pH ácido y etanol.....	32
3.5.1 Inducción por presión de selección	32
3.5.2 Inducción rápida por exposición a concentración alta de etanol.....	33
3.6. Sobrevivencia de <i>Salmonella enterica</i> durante el proceso de elaboración de las sidras.....	33
3.6.1. Activación de cepas de <i>Salmonella enterica</i> y levaduras	33
3.6.2. Cinética poblacional de <i>Salmonella enterica</i> y levaduras durante la elaboración de sidra.....	33
3.6.3. Detección de <i>S. enterica</i> en sidra tranquila y sidra espumosa	34
3.8. Métodos estadísticos.....	35
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1. Capacidad de sobrevivencia de <i>Salmonella enterica</i> durante la elaboración de la sidra	36
4.2. Adaptación de <i>Salmonella enterica</i> a condiciones de pH y concentración de etanol similares a las de la sidra.....	38
4.3. Cinética poblacional de coctel de cepas de <i>Salmonella enterica</i> adaptadas y sin adaptar durante la fermentación	40
4.3.1. Levadura K1-V116 (K1).....	40
4.3.2. Levadura 436.4 (436).....	44
4.3.3. Microbiota nativa (MB)	47
4.3.4. Análisis estadístico de la sobrevivencia de <i>S. enterica</i> en la primera y segunda fermentación.....	52
4.4. Tasa de inactivación de <i>Salmonella enterica</i> en función de la variedad de manzana, la levadura y la adaptación del patógeno	52
4.4.1. Análisis de varianza	52
4.4.2. Efectos principales	53
4.4.2. Interacciones de primer orden.....	57
4.4.3. Interacción de segundo orden.....	59
4.4. Cinética y detección de cepas individuales de <i>Salmonella enterica</i> adaptadas a dos ácidos.....	61
4.4.1. Cinética de inactivación de cepas de <i>Salmonella</i>	62
4.4.2. Tasa de inactivación.....	64
4.4.3. Detección de las cepas	66
V. CONCLUSIONES.....	69
VI. BIBLIOGRAFÍA	71

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Principales entidades productoras de manzana y volumen de producción	6
Tabla 2.2. Principales productores de manzana del estado de Querétaro	7
Tabla 2.3. Clasificación Taxonómica del manzano	8
Tabla 2.4. Composición nutrimental de la manzana (100 g)	13
Tabla 2.5. Tipos de sidra	14
Tabla 2.6. Brotes de patógenos en distintos productos, reportados en EE. UU.....	23
Tabla 3.1. Condiciones de los pases diarios para adaptación de <i>Salmonella entérica</i> ...	32
Tabla 4.1. Valores de P para los factores e interacciones en la sobrevivencia de <i>S. enterica</i> en primera fermentación y segunda fermentación.	52
Tabla 4.2. Valores de P para los factores e interacciones de la tasa de inactivación en primera y segunda fermentación.	53
Tabla 4.3. Tasas de inactivación de <i>Salmonella enterica</i> en los diferentes tratamientos de primer fermentación de sidra (interacción de segundo orden)	60
Tabla 4.4. Tasas de inactivación de <i>Salmonella enterica</i> en los diferentes tratamientos de segunda fermentación de sidra (interacción de segundo orden).....	61
Tabla 4.5. Valores de P para los factores de estudio y sus interacciones de la tasa de inactivación en primera fermentación	64
Tabla 4.6. Separación de medias de las tasas de inactivación de <i>Salmonella enterica</i> en función de la cepa.....	65
Tabla 4.7. Separación de medias de las tasas de inactivación de <i>Salmonella enterica</i> en función de su método de adaptación a la acidez	65
Tabla 4.8. Detección de <i>Salmonella enterica</i> en las distintas condiciones de la primera fermentación.	66
Tabla 4.9. Recuentos y resultados de detección de <i>Salmonella enterica</i> en las distintas condiciones de la segunda fermentación.	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Morfología de distintas hojas	9
Figura 2.2. Morfología de la flor y fruto del manzano	9
Figura 2.3. Estados fenológicos del manzano.....	12
Figura 2.4. Diagrama de elaboración de sidra espumosa. Método “Champenoise”	15
Figura 2.5. Cultivo de levaduras en medio de cultivo sólido y levadura seca para distintos propósitos.	17
Figura 2.6. Estructura de una levadura	18
Figura 4.1. Cambios poblacionales de la levadura comercial y la levadura de la microbiota nativa (MB).....	36
Figura 4.2. Cambios poblacionales de <i>S. enterica</i> inoculada en sidra fermentada con levadura comercial y en sidra fermentada con la microbiota nativa.....	37
Figura 4.3. Cambios en la población de <i>S. enterica</i> durante el proceso de adaptación a pH ácido y etanol.	39
Figura 4.4. Evolución de poblaciones de levadura K1 y <i>Salmonella enterica</i> en sidra ‘Golden Delicious’.	40
Figura 4.5. Evolución de las poblaciones de levadura K1 y <i>Salmonella enterica</i> en sidra ‘Red Delicious’.....	41
Figura 4.6. Evolución en segunda fermentación de poblaciones de levadura K1 y <i>S. enterica</i> en sidra ‘Red Delicious’.....	43
Figura 4.7. Evolución en segunda fermentación de poblaciones de levadura K1 y <i>S. enterica</i> en sidra ‘Golden Delicious’.	43
Figura 4.8. Evolución de poblaciones de levadura 436 y <i>Salmonella enterica</i> en sidra ‘Golden Delicious’.	45
Figura 4.9. Evolución de poblaciones de levadura 436 y <i>Salmonella enterica</i> en sidra ‘Red Delicious’.....	45
Figura 4.11. Evolución en segunda fermentación de poblaciones de levadura 436 y <i>S. enterica</i> en sidra ‘Red Delicious’.....	46
Figura 4.10. Evolución en segunda fermentación de poblaciones de levadura 436 y <i>S. enterica</i> en sidra ‘Golden Delicious’.	46
Figura 4.12. Evolución de las poblaciones de levadura MB y <i>Salmonella enterica</i> en sidra ‘Golden Delicious’.	48

Figura 4.13. Evolución de poblaciones de levadura MB y <i>Salmonella enterica</i> en sidra ‘Red Delicious’	49
Figura 4.14. Evolución en segunda fermentación de poblaciones de levadura MB y <i>Salmonella enterica</i> en sidra ‘Red Delicious’	50
Figura 4.15. Evolución en segunda fermentación de poblaciones de levadura MB y <i>Salmonella enterica</i> en sidra ‘Golden Delicious’	50
Figura 4.16. Efecto de la variedad de manzana en la velocidad de inactivación de <i>Salmonella enterica</i>	54
Figura 4.17. Efecto del factor “levadura” sobre la velocidad de inactivación de <i>Salmonella enterica</i>	55
Figura 4.18. Efecto del factor “adaptación” sobre la velocidad de inactivación de <i>Salmonella enterica</i>	56
Figura 4.19. Tasa de inactivación de <i>Salmonella enterica</i> en función de la cepa de levadura y la variedad de manzana	57
Figura 4.20. Tasa de inactivación de <i>Salmonella enterica</i> en función de la adaptación del patógeno y la variedad de manzana	58
Figura 4.21. Tasa de inactivación de <i>Salmonella enterica</i> en función de la levadura y la adaptación de las cepas	59
Figura 4.22. Cinética de poblaciones de cepas de <i>Salmonella enterica</i> adaptadas con HCl y alcohol durante la fermentación del mosto ‘Golden Delicious’ y MB	62
Figura 4.23. Cinética de poblaciones de cepas de <i>Salmonella enterica</i> adaptadas con ácido málico y alcohol durante la fermentación del mosto ‘Golden Delicious’ y MB	63
Figura 4.24. Cinética de poblaciones de cepas de <i>Salmonella enterica</i> sin adaptar durante la fermentación del mosto ‘Golden Delicious’ y MB	64

RESUMEN

Querétaro posee zonas favorables para el cultivo del manzano, sin embargo, una parte de la manzana producida no cumple los estándares para su comercialización en fresco. Una alternativa es elaborar subproductos como la sidra. Investigaciones locales relacionadas con la optimización del proceso de sidra y selección de levadura fermentativa nativa se han realizado, sin embargo, aún no se ha estudiado la supervivencia de patógenos de humanos durante este proceso. El objetivo de esta investigación fue evaluar la sobrevivencia de *Salmonella enterica* durante la elaboración de sidra en función de la levadura y la variedad de manzana. Se utilizaron los cultivares 'Golden Delicious' y 'Red Delicious', cuatro cepas ATCC de *S. enterica* con y sin adaptación y dos levaduras fermentativas (K1, 436) además de la fermentación con microbiota nativa (MB). Los resultados señalan que las cepas de *Salmonella* mostraron diferente capacidad de adaptación, sin embargo, todas sobrevivieron a las condiciones más severas evaluadas (8% de etanol y pH 4.56), con recuentos de población de ~4 a ~6 Log CFU mL⁻¹. Las cepas adaptadas y no adaptadas permanecieron cuantificables en los mostos 'Golden Delicious' al final de la primera fermentación (día 7) para levaduras K1 y 436, y en ambas variedades para MB, sin embargo, no fueron detectables después de 16 d de la segunda fermentación. *Salmonella* adaptada, inoculada en mosto 'Golden Delicious' fermentado con MB generó la tasa de inactivación más baja (-5.29 ± 2.42 Log CFU h⁻¹) en la primera fermentación, sin observarse diferencias en la segunda fermentación. Las cepas inoculadas individualmente se mostraron discretas, con recuentos por debajo del límite de detección en ambas fermentaciones, sin embargo, siendo detectadas en los dos casos. Se concluye que *S. enterica* fue capaz de sobrevivir durante el proceso de elaboración de la sidra cuando no se emplea una levadura seleccionada como inóculo.

(Palabras clave: Adaptación, *Salmonella enterica*, sobrevivencia, bebidas fermentadas.)

SUMMARY

Querétaro state counts on favorable areas apple tree cultivation, however, a part of the apple produced does not meet the standards for in-fresh marketing. An alternative is to make by-products like cider. Local investigations related to the optimization of the cider process and selection of native fermentative yeast have been carried out, however, the survival of human pathogens during this process has not yet been studied. The objective of this research was to evaluate the survival of *Salmonella enterica* during the production of cider based on the yeast and the apple variety. The cultivars 'Golden Delicious' and 'Red Delicious', four ATCC strains of *S. enterica* with and without adaptation and two fermentative yeasts (K1, 436) were used in addition to fermentation with native microbiota (MB). Results indicate that the *Salmonella* strains showed different adaptability, however, all survived the most severe conditions evaluated (8% ethanol and pH 4.56), with population counts of ~4 to ~6 Log CFU mL⁻¹. The adapted and non-adapted strains remained quantifiable in the 'Golden Delicious' musts at the end of the first fermentation (day 7) for K1 and 436 yeasts, and in both varieties for MB, however, they were not detectable after 16 d of the second fermentation. Adapted *Salmonella*, inoculated in 'Golden Delicious' must fermented with MB, generated the lowest inactivation rate (-5.29 ± 2.42 Log CFU h⁻¹) in the first fermentation, with no differences observed in the second fermentation. The individually inoculated strains were discrete, with counts below the detection limit in both fermentations, however, being detected in both cases. We conclude that *S. enterica* was able to survive during the cider making process when a selected yeast is not used as inoculum.

(**Keywords:** Adaptation, *Salmonella enterica*, survival, fermented beverages.)

I. INTRODUCCIÓN

La manzana es uno de los productos cosechados y consumidos más importantes alrededor del mundo, debido a sus características nutricionales y su versatilidad para consumirse en fresco, en alimentos preparados y en otros derivados alimenticios. México ocupa el 20° lugar a nivel mundial en producción de manzana, siendo los principales cultivares establecidos ‘Golden Delicious’, ‘Red Delicious’, ‘Gala’, ‘Rome Beauty’ y ‘Starking Delicious’, entre otras, con un consumo anual *per capita* de alrededor de 7.5 Kg (SAGARPA, 2017; SIAP, 2019).

En el estado de Querétaro, México, existen zonas con características ecológicas favorables para el cultivo de manzano (Flores-Lui *et al.*, 2017). Sin embargo, la presencia de fenómenos climáticos poco comunes y la deficiente aplicación de las técnicas de cultivo traen como consecuencia una mala calidad de la manzana para su comercialización en fresco (coloración no homogénea, frutos pequeños, además de mala apariencia), que aunado a la gran producción por parte de otros estados, saturando el mercado nacional, propicia pérdidas económicas importantes para el estado (Mendoza *et al.*, 2006; León-Teutli *et al.*, 2020). Por tal motivo es necesaria la búsqueda de alternativas para un mejor aprovechamiento del fruto, como la elaboración de derivados que le aporten un valor agregado, siendo la producción de sidra una opción prometedora (León-Teutli *et al.*, 2020).

Ésta se obtiene a partir de la fermentación por levaduras del mosto de manzana y, cuando es espumosa tipo champaña, se realiza una segunda fermentación de la sidra base embotellada, llamada “carbónica”. Esta segunda fermentación genera dióxido de carbono (CO₂) en el recipiente hermético, lo que incrementa la presión interna, causando que este gas se difunda al medio líquido, generando la efervescencia del producto final al momento del descorche y el servido (Soto-Herrera *et al.*, 2008).

Las levaduras del género *Saccharomyces* son las principales responsables de estas fermentaciones, por lo cual dominan en el medio fermentativo (Cousin *et al.*, 2017), aunque se sabe que otros géneros de levaduras (Casas-Acevedo *et al.*, 2015), así como bacterias lácticas participan en este proceso (Chen *et al.*, 2019).

Debido a las condiciones propias de la sidra, puede existir también un desarrollo de bacterias ácido-lácticas (BAL) deterioradoras. Éstas pueden generar diferentes alteraciones en el producto, como la degradación de glicerina, defecto conocido como

picado alílico/acroleínico, derivado del metabolismo de la glicerina, dando como resultado la acroleína generando amargor y pérdida importante de compuestos fenólicos, además de otros defectos relevantes (Mangas-Alonso *et al.*, 2010).

Aunado a lo anterior, existen reportes de cinco brotes de *Salmonella enterica* en EE.UU. entre 1998 y 2016, ambos en jugo de manzana, tanto pasteurizada como sin pasteurizar (Cody *et al.*, 1999; NORS CDC, 2019). De la misma forma, existe evidencia de la presencia de patógenos en bebidas fermentadas comerciales, tales como el vino y la cerveza (Jeon *et al.*, 2015).

A nivel local se han realizado trabajos relacionados con la implementación de métodos de elaboración de sidra espumosa tipo Champaña (Soto-Herrera *et al.*, 2007), así como de la selección de levaduras del género *Saccharomyces* para la elaboración de sidras espumosas a partir de variedades de manzana de la región (León-Teutli *et al.*, 2020), sin embargo, aparentemente no existen estudios que evalúen la sobrevivencia de patógenos de humanos durante el proceso de elaboración de sidra, menos aún la relación que pueda existir entre las levaduras fermentativas y los patógenos.

El objetivo del presente trabajo se centra en evaluar los cambios poblacionales de *Salmonella enterica* en función de la cepa de levadura durante la elaboración de la sidra espumosa tipo champaña.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. El Manzano

2.1.1. Origen y antecedentes

Existe evidencia de la recolección de manzanas silvestres que datan del Neolítico (alrededor de 13,200 años) y de la era del Bronce (alrededor de 6,500 años), a través de toda Europa, además de evidencia de su cultivo en Israel alrededor del año 1000 d.C. Uno de los factores más importantes en la distribución geográfica que tuvo este frutal en la antigüedad es la famosa “Ruta de la Seda” la cual, debido a los diversos recorridos, atravesando desde el Mar Negro, pasando por Samarcanda y Tashkent, hasta la China occidental, dieron origen a una extensa variedad de cultivares adaptados a diversas condiciones climatológicas y de suelo (Juniper *et al.*, 1998).

Esta diversificación del género *Malus* fue debida a los rumiantes empleados por los comerciantes, pues éstos fueron alimentados con diversos frutos, incluyendo la manzana. Al ser animales carentes de “molleja”, las semillas pudieron pasar por sus tractos gastrointestinales sufriendo un daño mínimo, de tal manera que pudieron ser dispersadas en tierras fértiles (Juniper *et al.*, 1998).

2.1.2. Importancia

2.1.2.1. Importancia mundial

La producción de manzana a nivel mundial ha tenido tendencia al alza durante las temporadas más recientes, habiéndose obtenido poco más de 86 millones de toneladas en 2018, comparando con las 83 millones de toneladas en reportadas al 2017. A la fecha, la lista de principales productores de manzana en el mundo es encabezada por China, con más de 39.2 millones de toneladas (cerca del 45.5 % de la producción mundial), seguida de Estados Unidos con 4.6 millones de toneladas, Polonia con casi 4 millones de toneladas, Turquía con cerca de 3.6 millones de toneladas, e Irán, con 2.5 millones de toneladas aproximadamente. (FAO, 2018)

2.1.2.2. Importancia nacional

En el periodo de 2012-2017 hubo un aumento en el volumen cosechado de aproximadamente 13.7 % cada año, con un promedio de 642 miles de toneladas en su

volumen de producción (SIAP, 2018), sin embargo, hubo una reducción de alrededor de 7.7 % en la producción de 2018 (659 mil toneladas) en comparación con la de 2017 (714 mil toneladas) (SIAP, 2019). En la Tabla 2.1 se enlistan las principales entidades productoras de manzana del país.

Tabla 2.1. Principales entidades productoras de manzana y volumen de producción

Lugar	Entidad federativa	Volumen (Toneladas)	Variación (%) 2017-2018
		2018	
Total nacional		659,451	-7.7
1	Chihuahua	596,580	-3.3
2	Puebla	35,713	-2.9
3	Durango	11,146	-65.9
4	Coahuila	10,165	-55.1
5	Veracruz	9,236	-2.1
6	Zacatecas	4,442	30.2
7	Chiapas	3,370	4.1
8	Hidalgo	3,353	2.5
9	Nuevo León	2,760	-30.4
10	Oaxaca	2,281	7.3
Resto		7,404	0.04

(SIAP, 2019b)

2.1.2.3. Importancia regional

Se conoce que el estado de Querétaro goza de condiciones climáticas y de suelo propicias para la producción de manzana, siendo principalmente las zonas altas o de serranías las más aptas para ello. En estas regiones, las altitudes varían desde los 1700 hasta los 2700 msnm, generando las condiciones óptimas de frío (de entre 2 y 10 °C) y cumpliendo con el requerimiento de entre 200-2000 horas frío o HF (horas acumuladas

por debajo de los 7 °C, requeridas para terminar el “reposo invernal”), los cuales son requeridos para producir fruto de buena calidad (Flores-Lui *et al.*, 2017).

En la Tabla 2.2 se muestran los principales municipios productores en el estado, al mes de diciembre de 2019.

Tabla 2.2. Principales productores de manzana del estado de Querétaro

Región	Municipio	Superficie (ha)		Producción (Ton)	Rendimiento (Ton ha ⁻¹)
		Plantada	Cosechada		
Cadereyta	Cadereyta de Montes	139	139	239	1.720
	Peñamiller	5	5	11	2.180
	San Joaquín	200	199	298	1.500
Jalpan	Pinal de Amoles	45	45	112	2.500
San Juan del Río	Amealco de Bonfil	32	19	53	2.770
Total		421	407	714	1.753

(SIAP, 2019a)

2.1.3. Botánica

2.1.3.1. Taxonomía

El manzano (*Malus domestica* Borkh) es una especie perteneciente a la familia Rosaceae, a la subfamilia Amygdaloideae, siendo en esta última en donde se han reconocido hasta 78 especies primarias. Esta especie no es encontrada en la naturaleza de manera silvestre, y se sabe que se deriva de la hibridación interespecífica de *Malus pumila* x *Malus baccata* (L.) Borkh, además de otras especies silvestres involucradas, como *Malus sylvestris*, que es una especie proveniente de Europa, principalmente (Tabla 2.3) (Cárdenas y Fischer, 2013).

Tabla 2.3. Clasificación Taxonómica del manzano

Categoría Taxonómica	Nombre
Dominio	Eukarya
Reino	Viridiplantae
Filo	Streptophyta
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Subfamilia	Amygdaloideae
Tribu	Maleae
Género	<i>Malus</i>
Especie	<i>M. domestica</i> , <i>M. pumila</i> , <i>M. baccata</i> , <i>M. sylvestris</i>

(NCBI, 2019; txid3750)

2.1.3.2. Morfología

El manzano es un árbol cuya altura oscila entre 1.5 m y los 7 m, además de poseer una anchura en su copa de 1 m (hasta 4.5 m aproximadamente) (Jackson y Palmer, 1999). La forma habitual bajo condiciones naturales varía de ser redonda en la copa, hasta una forma piramidal, sin embargo, bajo ciertas condiciones (como las de los trópicos), el manzano tiende de manera significativa a generar un crecimiento recto en sus ramas, debido a la llamada “dominancia apical aguda” (Cárdenas y Fischer, 2013).

El manzano presenta hojas de forma elíptica, además de lanceoladas, lobuladas, oblongas o aserradas, representadas en la Figura 2.1. Las yemas presentan formas ovoides con escamas pequeñas que alcanzan a sobresalir. Las yemas florales se encuentran insertadas sobre dardos en la mayoría de las variedades, siendo estas yemas mixtas terminales (Baugher, 2003, Cárdenas y Fischer, 2013).

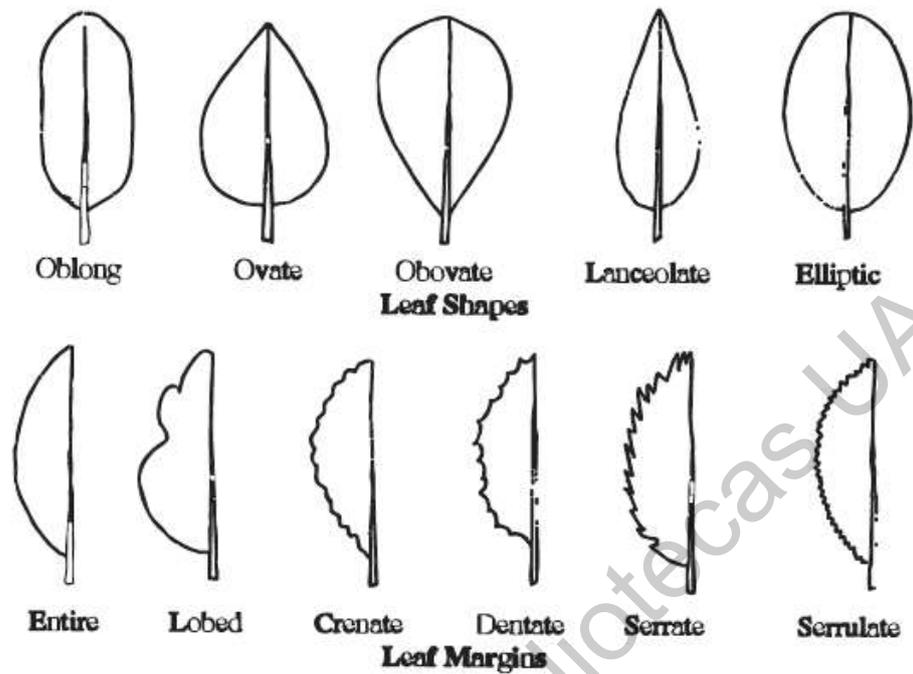


Figura 2.1. Morfología de distintas hojas (Fuente: Baugher, 2003)

Las flores presentan una coloración de blanco a rosa, incluso carmín, organizándose en cimas, llamadas corimbos. Las partes del hipanto y el gineceo permanecen juntos formando un ovario ínfero, en donde después se procederá a formar el fruto. El fruto es un pomo, caracterizado por provenir de un ovario ínfero. En la Figura 2.2 es posible observar las morfologías antes mencionadas (Cárdenas y Fischer, 2003).

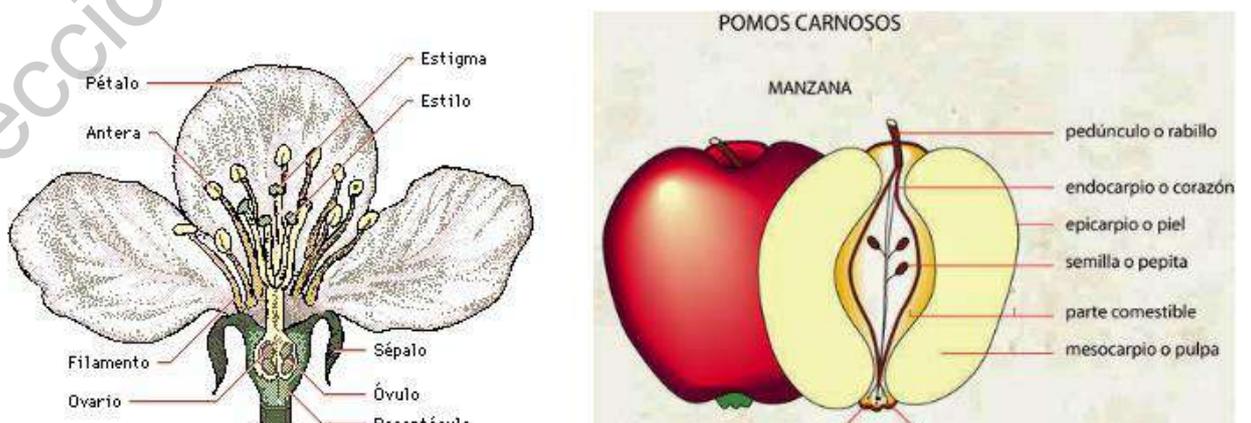


Figura 2.2. Morfología de la flor (izquierda) y fruto (derecha) del Manzano (*Malus domestica* Borkh) (Fuente: Domínguez, 2008; infovisual.info, s.f.)

2.1.3.3. Fisiología

El árbol de manzano es caracterizado por ser caducifolio, es decir, se despoja completamente de sus hojas durante el invierno (en raras ocasiones, puede ser observable un “siempre verde”) (Baugher, 2003). Según Fernández *et al.* (2010), el manzano es una especie capaz de inducir diferentes respuestas fisiológicas, por lo que se adapta a las variaciones climáticas propias de cada estación según los cambios estacionales a los que se ve enfrentado.

Su ciclo de desarrollo es anual, y está determinado por dos etapas: vegetativa y reproductiva. Dentro del ciclo vegetativo (en el hemisferio Norte) inicia con la pérdida de las hojas durante octubre hasta noviembre, en sucesión del reposo del árbol durante todo el invierno. Durante el reposo y debido a las bajas temperaturas, la brotación de las yemas florales y vegetativas es posible, manifestándose normalmente en marzo, pudiendo observarse de manera general en la Figura 2.3 (Ramírez *et al.*, 2002).

En cuanto al crecimiento del fruto, primeramente hay un período de multiplicación celular con una duración aproximada de cinco semanas, dando como resultado un notable crecimiento longitudinal del fruto, no así de su diámetro. En la segunda etapa existe un crecimiento acelerado, pudiendo durar de cinco a diez semanas aproximadamente. Es durante este período cuando se forman “burbujas” o espacios intercelulares, los cuales facilitan el intercambio de gases entre las células, pues estos espacios se encuentran interconectados. Es en esta fase cuando se puede observar un aumento considerable de materia seca en el fruto. Una vez concluida la diferenciación celular, comienza el proceso de maduración, en el cual existen una serie de cambios bioquímicos a causa de distintas reacciones físicas y químicas, dando como resultado la aparición de las propiedades distintivas de cada variedad, como lo son su color, textura, sabor, acidez, entre otros (Casierra-Posada *et al.*, 2003).



Estado A. Yema de invierno



Estado B. Yema hinchada



Estado C. Yema bicolorada (punta verde)



Estado D. Aparición del corimbo floral
Tipo sin hojas desarrolladas



Estado D2. Aparición del corimbo floral
Tipo sin hojas desarrolladas



Estado E. Pétalos visibles (puntas rojas)



Estado E2. Los sépalos dejan ver los pétalos



Estado F. Comienzo de floración (1 a 2 flores abiertas)



Figura 2.3. Estados fenológicos del manzano (Diputación Foral de Bizkaia, 2017)

2.1.3.4. Variedades y composición

La clasificación dada a las distintas variedades de manzano es generalmente: a) de consumo en fresco (*M. domestica*), b) manzana sidrera (*M. pumila* y *M. domestica*), y c) manzana silvestre (*M. pumila*, *M. sylvestris*, entre otras) (Bauchard, 1994).

De igual forma, es posible clasificarlas con base en el sabor del fruto; manzanas dulces, ácidas o amargas, donde generalmente se clasifican las manzanas de mesa, manzanas sidreras y las silvestres (respectivamente). Actualmente, algunos de los principales cultivares producidos a nivel mundial son ‘Red Delicious’, ‘Golden Delicious’, ‘Gala’, ‘Granny Smith’, ‘Jonagold’, ‘Braeburn’, ‘Pink Lady’, ‘McIntosh’, entre otras (Hubert, 1999; Belrose, 2012).

Las principales características que el consumidor busca en una manzana de consumo en fresco son el tamaño, su apariencia (libre de daño mecánico o de microorganismos), además de su sabor. Sin embargo, dependiendo de la región, pueden buscarse frutos de distinto grado de firmeza, además del sabor dulce o acidulado (Coque *et al.*, 2012).

El principal componente de la manzana es el agua, con 85 % del total de la composición. Si bien el fruto es bajo en grasas (aproximadamente 0.2 g de grasa por porción de 100 g), posee alrededor de 43.0 mg de ácidos grasos Omega-6, y en menor proporción, 9.0 mg de Omega-3. En la Tabla 2.4 se muestran algunos de los principales componentes de la manzana (USDA, 2018).

Tabla 2.4. Composición nutricional de la manzana (100 g)

Componente	Cantidad
Proteína (g)	0.3
Grasas (g)	0.2
Carbohidratos (g)	13.8
Fibra (g)	2.4
Azúcares totales (g)	10.4
Calcio (mg)	6.0
Magnesio (mg)	5.0
Hierro (mg)	0.1
Fósforo (mg)	11.0
Potasio (mg)	107.0
Vitamina C (mg)	4.6
Vitamina A	54.0

(USDA, 2018)

2.2. La sidra

2.2.1. Definición

Se conoce a la sidra como una bebida proveniente de la fermentación del mosto de manzana, con una ligera graduación alcohólica de alrededor de 6.5 % abv hasta 12 % en sidras elaboradas solamente con jugo de manzana, mismas que pueden ser mezcladas, dando como resultado sidras más comerciales de 1.2 a 8.5 % abv. Posee una coloración ámbar, con un sabor que tiende al agrisado, debido a las características del mosto del cual es obtenida, misma que depende de los niveles de taninos y ácidos (Jarvis, 2014).

2.2.2. Tipos de sidra

Debido a su naturaleza pueden existir diferentes tipos de sidra; incluso hay países productores que tienen sus propios tipos (como Francia o Gran Bretaña). Por ejemplo, la sidra francesa es producida regularmente de una manera más natural, sin la presencia de aditivos y sin la aplicación de métodos modernos de elaboración, por lo cual posee un sabor más afrutado, en comparación con la sidra inglesa (que posee mayor grado alcohólico). Existe también una gran diferencia con respecto a lo que se le denomina “sidra”, pues, en Norteamérica y Australia, se le denomina de esa forma al jugo de manzana obtenido por prensado en crudo, mientras que *hard cider*, traducido literalmente como “sidra dura”, es el término que se utiliza para referirse a la bebida alcohólica (Heikefelt, 2011).

En la Tabla 2.5 se describen los tipos de sidra más comunes, en su clasificación general y en base a la cantidad de azúcar presentes.

Tabla 2.5. Tipos de Sidra

Clasificación General	Sidra dulce	Mosto obtenido directamente del exprimido de la manzana posterior a la recolección; sin fermentación (jugo de manzana).
	Sidra de Hielo	Se obtiene a partir de mosto congelado de manzana (congelación natural). Mayor concentración de azúcar y mayor grado alcohólico causado por eliminación de agua.
	Sidra Achampañada o Gasificada	Producto de creación reciente (no requiere escanciado). Su graduación alcohólica va de 6 a 8 °G.L. En su proceso de elaboración, es sometida a filtración, la cual elimina gran cantidad de impurezas y sedimentos. Gasificación es llevada a cabo en botella o en cuba, mediante una segunda fermentación
Clasificación con base en dulzor.	Seca	Concentración < 30 g azúcar L ⁻¹ . Grado alcohólico >5 ° G.L.
	Semiseca	Concentración de 30 a 50 g azúcar L ⁻¹ . Grado alcohólico de 3-5 ° G.L.
	Dulce	Concentración > 50 g azúcar L ⁻¹ . Límite máximo 80 g L ⁻¹ . Grado alcohólico < 3 ° G.L.

(Gutiérrez *et al.*, 2016).

2.2.3. Proceso de elaboración de sidra espumosa tipo champaña

El proceso de elaboración de la sidra espumosa es semejante al realizado en vinos espumosos, pues ambos obtienen su presión característica, ya sea por la fermentación parcial de sus azúcares naturales, o por acción de la segunda fermentación (fermentación carbónica) del azúcar añadido a la sidra o vino base. Dentro de los métodos más utilizados, destaca el método clásico o tradicional *champenoise* (León-Teutli *et al.*, 2020).

El método *champenoise* es llevado a cabo mediante una primera fermentación a presión atmosférica, dando como resultado una sidra base, seguida de una fermentación en la botella, donde inicialmente es añadido el denominado licor de *tirage* (conteniendo azúcar y levaduras) y la sidra se cierra herméticamente, lo que causa una generación de espuma al momento del servido (Mangas-Alonso *et al.*, 2010). En la Figura 2.4 se aprecia el diagrama general del proceso de elaboración.



Figura 2.4. Diagrama de elaboración de Sidra espumosa. Método “Champenoise” (Fuente: Gustorotondo, 2018)

En la primera fase de la elaboración, el jugo de manzana es extraído, se adiciona metabisulfito de potasio para su conservación, además de que se mejora el color del mosto. Posteriormente, el mosto es desfangado e inoculado con la cepa seleccionada de levadura, para su fermentación a temperatura de entre 15 y 18 °C, dando por finalizada esta parte al presentarse una disminución de °Bx y densidad suficientes. Después de un tiempo de reposo (aproximadamente una semana), se logra una preclarificación a causa de los trasiegos realizados, obteniéndose una sidra tranquila, la cual se vierte en botellas para la adición del licor de *tirage* compuesto de una mezcla de azúcar disuelto en una porción de sidra base, además del cultivo iniciador de levaduras. Finalizando la segunda fermentación, se realiza una clarificación mediante el acomodo de las botellas en pupitre, para la remoción de lías (desplazando sedimentos al cuello de la botella para eliminarse), llevando progresivamente de una posición casi horizontal (20 a 25 °) hasta una posición de entre 60 y 75 °, para así eliminar los sedimentos al formar un tapón de hielo al sumergirse en una solución de agua y anticongelante a -25 °C, expulsando dicho tapón por acción de la presión en la botella (Hidalgo, 2002; Flanzy, 2003; León-Teutli *et al.*, 2020).

2.3. Levaduras fermentativas

El nombre de “levadura” es utilizado para agrupar un gran número de microorganismos, tanto patógenos como especies útiles. Las levaduras son microorganismos unicelulares pertenecientes al reino Fungi, con formas y tamaños muy diversos, dependiendo de la especie y condiciones en las que se encuentren. Su reproducción es normalmente por gemación (generalmente, divisiones asimétricas) (Montoya, 2008). Debido a su versatilidad, estos microorganismos han sido utilizados para la elaboración de muchos de los productos que con cotidianidad consumimos, como pan, cerveza y vino, elaborando cada producto con una cepa específica, pues durante su desarrollo tecnológico se han ido modificando para obtener productos con características muy particulares (Suárez *et al.*, 2016).

2.3.1. Características generales de *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura por excelencia tanto para la elaboración de productos de panificación como de bebidas alcohólicas (Figura 2.5) (aun cuando el hombre ignoraba la participación de las mismas en estos procesos) ha sido la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Su nombre es derivado de diversos vocablos en latín: *Saccharo* significa azúcar; *myces*, hongo; y *cerevisiae*, cerveza. Su metabolismo es quimioheterótrofo, además de poseer una elevada capacidad fermentativa. Estos microorganismos se reproducen por fisión binaria o gemación; además, debido a su naturaleza, estos organismos unicelulares son resistentes a antibióticos, sulfamidas y demás agentes antibacterianos (Suárez *et al.*, 2016).



Figura 2.5. Cultivo de levaduras en medio de cultivo sólido (izquierda) y levadura seca para distintos propósitos (derecha). (Fuente: cerveceroscaseros.com, 2015; cerveza-artesanal.co, s.f.).

2.3.2. Morfología

Saccharomyces cerevisiae presenta características celulares, en estructura y función, de las células eucariotas (Figura 2.6) y poseen gran variedad de tamaños y formas, que van desde las ovaladas, esféricas, incluso cilíndricas y elípticas, las cuales tienen un diámetro de entre 5 y 10 μm (Feldmann, 2010).

Los componentes mayoritarios de las levaduras incluyen proteínas, glucoproteínas además de algunos polisacáridos y polifosfatos (Suárez *et al.*, 2016).

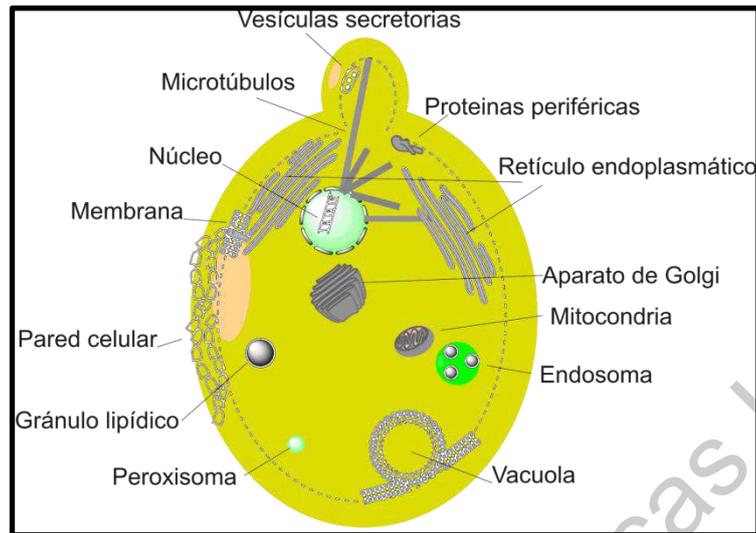


Figura 2.6. Estructura de una levadura (Fuente: caeliacerea.blogspot.com, 2015)

2.3.3. Criterios de selección

El uso de cepas seleccionadas ha resultado ser una de las mejores estrategias en la obtención de productos de calidad en bebidas como la sidra, especialmente con procesos muy especializados como el método *champenoise*, esto debido a que, por las características a las que se han visto expuestas, las cepas aisladas poseen una adaptación a las condiciones ambientales potencialmente más alta a las cepas comerciales, lo que hace a las cepas endémicas una mejor opción (Suárez-Valles *et al.*, 2008; León-Teutli *et al.*, 2020).

La velocidad de fermentación, la tolerancia a etanol y a sulfitos son características de suma importancia para la selección de las cepas, pues existe la posibilidad de usar una cepa con muy poca producción de etanol, muy poco tolerante o de igual manera, muy lenta en su metabolismo, lo cual podría causar una contaminación en la matriz alimentaria. (Domenech *et al.*, 1992). De igual forma, algunas otras de las características de selección de levadura más recientes han sido la tolerancia a altas presiones de CO₂, además de una buena capacidad de floculación y sedimentación, actividad β -glucosidasa, en incluso, la expresión del fenotipo *killer* (León-Teutli *et al.*, 2020).

2.3.3.4. Algunas investigaciones relacionadas con la selección de levaduras fermentativas en sidra

Distintas investigaciones han sido realizadas con el fin de aislar y seleccionar levaduras con ciertas deseables para elaborar sidras de calidad.

Ejemplo de ello ha sido el trabajo de Suárez-Valles *et al.* (2008), quienes aislaron levaduras del género *Saccharomyces* de una bodega de sidras localizada en Asturias, determinando su capacidad de tolerancia al etanol y capacidad de floculación, además de evaluar su producción de ácido acético y ácido sulfhídrico, con el fin de utilizar dichas levaduras en el proceso de elaboración de sidras espumosas por el método *champenoise*, mismas que fueron evaluadas en un análisis sensorial, obteniendo resultados positivos en cuanto a aceptación.

Otra investigación relacionada a la selección de levaduras es la realizada por Pando-Brediñana *et al.* (2010), en la cual aislaron distintas cepas de levaduras a lo largo del proceso fermentativo de sidra elaborada con manzanas asturianas en una bodega sidrera de Villaviciosa (Asturias), caracterizando las levaduras en cuanto a su actividad β -glucosidasa, producción de ácido sulfhídrico y la expresión del fenotipo *killer*, encontrando cepas de levaduras tanto sensibles como neutrales a la toxina producida por fenotipos *killer*, además de encontrarse fenotipos productores de toxina y actividad β -glucosidasa por primera vez en levaduras autóctonas.

Dentro del grupo de trabajo, se realizó un estudio relacionado con el aislamiento, selección e identificación de levaduras nativas provenientes de fermentaciones espontáneas de distintas variedades establecidas regionalmente, evaluando su capacidad fermentativa en la producción de sidras espumosas, evaluando su velocidad de fermentación, actividad β -glucosidasa, además de la presencia del fenotipo *killer* en las mismas, además de su tolerancia a altas presiones y condiciones como presencia de etanol y bajos pH, comparándose con una cepa comercial (K1-V1116). Las cepas aisladas con las mejores características fermentativas fueron las nombradas 'MM7' y '436.4' (León *et al.*, 2020).

2.4. Bacterias relevantes en alimentos fermentados

2.4.1. Bacterias fermentativas

Si bien la fermentación alcohólica (FA) es una parte sumamente importante en la producción de sidras, el proceso de la fermentación maloláctica (FML) es fundamental para la calidad final de este producto, sin embargo, en la industria sidrera aún no se cuenta con un cultivo iniciador de este proceso, a diferencia de lo que ocurre con la industria del vino (Sánchez *et al.*, 2010).

La fermentación maloláctica (conversión de ácido málico en ácido láctico) en la producción de sidra es un proceso complejo, además de difícil de controlar, pues se conoce que factores tanto nutricionales como físicos y químicos tienen un efecto en el metabolismo de los microorganismos encargados de éste proceso (las bacterias ácido lácticas o BAL). Se ha observado que productos del mismo metabolismo de las levaduras en el proceso de FA, como ácidos grasos y etanol, inhiben el crecimiento de BAL, pero también existen factores esenciales de crecimiento que lo promueven (Herrero *et al.*, 2001; Miranda-Castilleja *et al.*, 2018).

Según Herrero *et al.* (1999) la FML puede ocurrir de manera espontánea debido a la presencia de diversos géneros de BAL, como *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* principalmente. Estos microorganismos pueden provenir del mosto o de la bodega, y sobrevivir durante la FA; sin embargo, la sidra no es una matriz favorable para el desarrollo de BAL, lo que genera un proceso impredecible.

2.4.2. Bacterias deterioradoras

Si bien el desarrollo de algunas especies bacterianas es necesario para la FML, también existe el riesgo de que se genere un desarrollo de bacterias ácido-acéticas (BAA), entre las que se encuentran principalmente los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* y *Gluconacetobacter*, (presentes en manzanas y uvas). Estas bacterias son las responsables (mayoritariamente), de la oxidación del etanol a ácido acético (Bartowsky y Henschke, 2008; Joshi y Sharma, 2009; Fernández-Pérez *et al.*, 2010).

Además de la generación de este ácido en la sidra, lo cual recibe el nombre de *picado*, pueden darse otros defectos causados por bacterias, en este caso BAL, como el *filado*, y la degradación de glicerina, defecto conocido como *picado alílico/acroleínico* (ambos defectos producidos por *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y

Streptococcus, principalmente); el primero se caracteriza por un aumento en la viscosidad, dando como resultado una apariencia aceitosa en la sidra debido a la generación de polisacáridos, estructurados de unidades de galactosa, glucosa, manosa, arabinosa y ácido galacturónico, mientras que el segundo (picado alílico/acroleínico) es provocado por el metabolismo de la glicerina, dando como resultado la acroleína, que al interactuar con polifenoles presentes en la sidra, genera amargor y pérdida importante de compuestos fenólicos (Mangas-Alonso *et al.*, 2010).

2.5. Patógenos de humanos en bebidas fermentadas

2.5.1 Presencia y brotes

Las bebidas alcohólicas fermentadas han sido consideradas seguras en lo referente a aspectos microbiológicos, esto debido a sus características de acidez, así como su contenido alcohólico, sin embargo, patógenos transmitidos por alimentos, de alta relevancia epidemiológica, han sido detectados en diferentes bebidas.

La presencia de ácido málico (alrededor de 5 g L^{-1}) y ácido láctico ($3 - 4 \text{ g L}^{-1}$) tanto en jugo de manzana como en sidra, que a su vez generan pH de 3 - 4 son suficientes para prevenir el crecimiento y desarrollo de patógenos como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, entre otros (Millard *et al.*, 2017).

Rao *et al.* (2018) reportan la presencia de *Clostridium botulinum* en una bebida ilegal producida dentro de las prisiones de EE.UU., llamada pruno. Dicha bebida provocó síntomas de botulismo en un interno a las 12 h de su consumo, posteriormente presentando signos de la misma enfermedad, causando su ingreso a un hospital, procediendo a la investigación del origen de la enfermedad, además de identificar posibles casos adicionales, resultando en ocho internos de la misma sección presentando los mismos signos y síntomas.

2.5.2. Sobrevivencia

Jeon *et al.* (2015) encontraron que, tanto las esporas de *Bacillus cereus*, además de microorganismos como *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* Typhimurium son capaces de sobrevivir hasta 28 d en bebidas como cerveza y “vino refinado de arroz” (conocido como *sake* en Japón, y como *cheongju* en Corea).

Menz *et al.*, en el 2011 observaron que patógenos como *E. coli* y *Salmonella* Typhimurium son capaces de sobrevivir, e incluso desarrollar, durante las primeras fases (alrededor de 24 h) del proceso de elaboración de una bebida fermentada llamada “mosto lupulado”, el cual es un producto parecido a la cerveza.

Kim *et al.*, en 2014 inocularon células de *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus* y *S. enterica* además de esporas de *B. cereus* en cerveza (4.6 – 5 % abv) y la mencionada bebida “vino refinado de arroz” (13 – 14 % abv) a diferentes temperaturas, encontrando que durante el almacenamiento de las bebidas inoculadas, la mayoría de los microorganismos descendieron rápidamente sus poblaciones hasta ser indetectables por su metodología (de 1 a 3 d), sin embargo, fueron recuperables con métodos de enriquecimiento, indicando que no estaban ausentes.

Gómez-Aldapa *et al.*, en 2011 reportan una reducción significativa de poblaciones de algunos microorganismos patógenos de humanos inoculados en aguamiel durante el proceso fermentativo para producción de pulque, como *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei*. Dicha reducción es más rápida cuando los microorganismos son inoculados en el denominado “pulque semilla”, en comparación con los néctares o aguamiel, mismos que son productos altos en azúcares, pero carentes de alcohol, caso contrario al pulque semilla, donde el medio es ácido y existe presencia de etanol, inactivando a los microorganismos patógenos antes mencionados al final del proceso fermentativo.

En otro estudio realizado en pulque por Gómez-Aldapa *et al.* (2012), se estudió la capacidad de *E. coli* de adaptarse a productos del proceso de elaboración. Se advierte que el patógeno es capaz de sobrevivir, e incluso desarrollar en el aguamiel los primeros días, seguido de un descenso en sus poblaciones; contrario a lo ocurrido al inocularse en pulque semilla, donde *E. coli* pudo sobrevivir a las condiciones iniciales de bajo pH y concentración de etanol en menor medida que en el caso de la semilla.

2.5.3. Presencia y sobrevivencia en manzana y sus derivados

En el trabajo realizado por González-López *et al.* (2018), se encontró que cepas de *Salmonella* spp. aisladas de una huerta de manzana fueron capaces de colonizar la superficie de manzanas (desarrollando a temperaturas de almacenamiento de 15 y 22

°C, pero no en 5 °C). La formación de biopelículas en ella se evidenció mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés).

Según el Sistema Nacional de Reporte de Brotes de la CDC (NORS CDC, por sus siglas en inglés), 79 brotes han sido reportados en EE. UU., a la fecha, en lo referente a productos de manzana (manzana fresca, jugos y sidras pasteurizados y sin pasteurizar), además de algunas bebidas alcohólicas como vino y cerveza, en los cuales *S. enterica* y *E. coli* destacan como agentes patógenos (Tabla 2.6).

Tabla 2.6. Brotes de patógenos en productos de manzana y bebidas alcohólicas, reportados en EE. UU (1971 – 2020)

Brotes de patógenos en productos de manzana y bebidas alcohólicas	
Brotes	79
Enfermos	1913
Hospitalizaciones	110
Muertes	7
Brotes asociados a <i>Salmonella enterica</i> y <i>E. coli</i>	
Brotes	15
Enfermos	401
Hospitalizaciones	46
Muertes	0

(NORS CDC, 2020)

Aun cuando se han considerado a las infecciones de *E. coli* patógena, como asociadas a productos animales, los reportes de brotes en relación con otros productos han ido en aumento. Ejemplo de lo anterior es la asociación de dichos brotes con el consumo de jugo de manzana sin pasteurizar, aun cuando las características propias de la matriz alimentaria generen poca probabilidad de convertirse en vehículo de contaminantes microbiológicos (Cody *et al.*, 1999). Además de estos patógenos, existen reportes de la presencia de *Cryptosporidium* sp. en una “feria de la cosecha” en EE. UU. debido a la contaminación de jugo de manzana recién exprimido, motivo por el cual se dio un brote de criptosporidiosis. (Millard, 1994).

Para Vojdani *et al.* (2007) se han presentado brotes causados por bacterias y parásitos relacionados a productos como sidras y jugos durante años. Aun cuando los

agentes causales han sido reportados como poco comunes, la contaminación por lo general ocurre en las últimas etapas de los procesos. Se conoce también que una de las principales barreras para la inocuidad de jugos de fruta ha sido su acidez y el pH, sin embargo, en 1991 se registró un brote de *E. coli* O157:H7, causando infecciones y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH); éste patógeno, además de otros como *Salmonella* spp., parásitos, entre otros, han mostrado una supervivencia en jugo de manzana fresco (*apple cider*) a pH entre 3.6 y 4, rango que se pensaba que era inhibitorio.

Xiong *et al.* (2020) reportaron durante el almacenamiento de vinos y sidras elaborados por procedimientos artesanales, una reducción de 5 Log (establecido por la FDA) de cocteles de distintas cepas de *E. coli*, *S. enterica* y *Listeria monocytogenes*. Dicha reducción se logra (dependiendo del pH y concentración de alcohol en la bebida, además de la fruta de procedencia, ya sea uva o manzana) a distintos tiempos para la mayoría de los casos, evidenciándose que incluso con las condiciones de pH (entre 3 y 5) y altas concentraciones de etanol (desde 0 % hasta 14%), 96 h de almacenamiento no fueron suficientes para llevar a cabo dicha reducción en todos los tratamientos, concluyendo en la necesidad de realizar más estudios de validación, así como regulaciones en los procedimientos con los que se realizan dichas bebidas fermentadas.

2.6. *Salmonella enterica*

2.6.1. Taxonomía y morfología

El género *Salmonella*, perteneciente a la familia de Enterobacteriaceae, es un bacilo Gram (-), anaerobio facultativo, flagelado, cuyo comportamiento es de patógeno intracelular facultativo.

Este patógeno se divide en dos especies: *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica* (constituida por más de 2000 serovares), siendo esta última la de mayor relevancia en cuanto a la inocuidad de alimentos. *Salmonella enterica* se divide a su vez en seis subespecies: *enterica*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica*, *salamae* y *houtenae*, siendo las más importantes a considerar las pertenecientes a las subespecies *enterica* y *arizonae*, dentro de los cuales se encuentran serovares de alta relevancia como *S. Typhi* (la cual afecta sólo a humanos), y *Salmonella* Typhimurium (misma que puede causar infecciones a humanos y a algunos mamíferos) (Figueroa y Verdugo, 2005).

2.6.2. Condiciones de crecimiento

Salmonella es capaz de desarrollar en pH desde 3.8 – 9.5, y en temperaturas desde 5.2 hasta 46.2 °C, siendo el rango de crecimiento óptimo de pH 7 - 7.5, y una temperatura de 35 - 43 °C. Si la temperatura es superior a 20 °C, es posible que *S. enterica* duplique su número cada 15 – 20 min (Elika, 2013).

2.6.3. Presencia en alimentos

Algunos de los serovares mencionados, son encontrados mayoritariamente en animales domésticos (principal reservorio en el sistema gastrointestinal), pudiendo causar un esparcimiento del patógeno a través de sus heces. Este material puede contaminar cultivos, además del agua de riego, e incluso durante el sacrificio de animales para producción de carne, donde un mal manejo de equipo o malas prácticas pueden causar una contaminación de la carne, contribuyendo así a la alta incidencia de infecciones de *Salmonella* no tifoidea en el mundo (McClelland *et al.*, 2001; Figueroa y Verdugo, 2005).

Se asocia a *S. enterica* a productos crudos o poco cocinados, esto debido a su sensibilidad a tratamientos térmicos. Los alimentos de riesgo a considerar son aquellos derivados de huevo, así como el huevo crudo o contaminado en sí. De igual forma, es importante considerar la carne de aves, cerdo y ganado vacuno, pues al ser consumidas sin una cocción completa, o encontrarse sólo fermentadas, elevan las posibilidades de la sobrevivencia de dicho patógeno. Productos como leche no pasteurizada, frutas, verduras regadas con aguas contaminadas y sus subproductos se han reportado como vehículo de *S. enterica* (Elika, 2013).

Existe evidencia de brotes de *Salmonella* asociados al consumo de distintos frutos, ejemplo de ello fue un brote en Singapur en el año 1996, donde 116 trabajadores enfermaron, encontrándose la cepa de *S. enterica* causante del brote en diversas frutas frescas, donde se incluye la papaya y la piña, encontrándose como posible fuente de contaminación el agua utilizada (Strawn *et al.*, 2010).

2.6.4. Salmonelosis: efectos

La enfermedad producida por *Salmonella* comúnmente produce dolor abdominal, acompañado de diarrea y fiebres, aunque puede ser de igual forma acompañada con cefalea, náuseas y vómitos, sin embargo, pueden existir pequeñas poblaciones donde se generen complicaciones como infecciones sistémicas, y otras complicaciones que pueden causar discapacidad. Aun cuando se conoce que la tasa de mortalidad es baja en humanos, es importante señalar que puede aumentar significativamente dependiendo de la cepa a la que se enfrente (Elika, 2013; FDA, 2019).

Las poblaciones de riesgo a estas enfermedades abarcan a infantes, posteriormente a personas de la tercera edad e inmunocomprometidos. Es importante mencionar que existe evidencia en la que se señalan dosis infectantes muy pequeñas (alrededor de 20 células) pueden llegar a generar complicaciones en humanos (FDA, 2019).

Como conclusión del presente estudio bibliográfico, podemos señalar que si bien es importante considerar diversos factores de calidad durante la producción de alimentos, y en este caso, de bebidas fermentadas, tales como la graduación alcohólica, acidez o dulzor que pueden resultar, el perfil aromático que puedan presentar, entre muchos otros, uno de los factores menos considerados en la producción de bebidas alcohólicas fermentadas es la calidad microbiológica, es decir, la posibilidad de la existencia de bacterias de alteración o de patógenos en el producto. Se tiene la creencia de que las condiciones inherentes de la bebida en cuestión son capaces de inactivar por completo a dichos microorganismos, como *S. enterica* o *E. coli*, incluso algunos parásitos, sin embargo es importante estudiar la presencia, sobrevivencia o tendencia a la inactivación de los patógenos en dichos productos, y evaluar qué factores tienen mayor impacto en su desarrollo o inactivación.

OBJETIVOS

General

Determinar la sobrevivencia de *Salmonella enterica* durante la elaboración de sidra espumosa tipo champaña elaborada con dos cultivares de manzana en función de la cepa de levadura fermentativa utilizada.

Específicos

1. Evaluar la capacidad de sobrevivencia/desarrollo de *S. enterica* en función de la cepa de levadura fermentativa durante el proceso de elaboración de la sidra.
2. Adaptar cepas de *S. enterica* a condiciones similares a las de la sidra (pH ácido y alcohol).
3. Estudiar la cinética poblacional, la sobrevivencia y la tasa de inactivación de consorcios de cepas de *S. enterica* adaptada y sin adaptar en función de la levadura y el cultivar de manzana durante la fermentación de sidra espumosa.
4. Estudiar la cinética poblacional y estimar la velocidad de inactivación de distintas cepas individuales de *S. enterica* adaptada y sin adaptar en condiciones específicas obtenidas de la cinética anterior.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Sitio experimental y Material biológico

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Fermentaciones y Fisiología de Frutas de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Se utilizaron manzanas provenientes de Chihuahua obtenidas del mercado local, de los cultivares: a) ‘Golden Delicious’, variedad mejorada, de origen americano, cruza de ‘Golden Reineta’ x ‘Grimes Golden’, caracterizada por su forma redonda y color amarillo, alta concentración de fructosa, consistencia crujiente y jugosa, con acidez ligera (Baugher, 2003) y b) ‘Red Delicious’ variedad mejorada de origen americano, proveniente de una selección de Madison, caracterizada por su forma “alargada” y gran tamaño, moderadamente crujiente y con mucho jugo, de sabor suave, ligeramente ácido y dulce, además de contener antioxidantes (Martínez-Peniche *et al.*, 2014; Mancera-López *et al.*, 2018). Las manzanas fueron adquiridas del mercado local, para la elaboración de las sidras espumosas.

Como microorganismos fermentativos, se utilizaron: a) la cepa de referencia comercial K1-V1116 (K1) de la marca Lallemand®, la cual es productora de esteres florales, además de poseer el fenotipo *killer* y de soportar condiciones de fermentación difíciles (Lallemand Brewing, 2014) b) la levadura seleccionada 436.4 (436), la cual posee alta capacidad de floculación además de velocidad de fermentación aceptable (León-Teutli *et al.*, 2020) y c) una levadura comercial Fermentis SafAle® S-04, asimismo, se utilizó la microbiota nativa (MB) presente en la manzana.

Las cepas de referencia de *S. enterica* utilizadas fueron: *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 (cepa 1), *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (cepa 3), *Salmonella* Thompson ATCC 8391 (cepa 4) y *Salmonella* Montevideo ATCC 8381 (cepa 5).

3.2. Elaboración de Sidra

Para la elaboración de la sidra espumosa artesanal, se siguió la metodología descrita por Soto-Herrera *et al.* (2008) con algunas modificaciones. El procedimiento consistió en limpiar la manzana de residuos visibles (tierra, partes de insecto, etc.), evitando la desinfección (conservando carga microbiana). Posteriormente se descorazonó para evitar extraer compuestos indeseables de las semillas. El jugo de la

manzana se obtuvo con un extractor estándar Black and Decker®, filtrando con manta estéril. La obtención de la sidra base (primera fermentación) se realizó en matraces Erlenmeyer con capacidad de 1 L a 20 °C.

En el primer experimento se inocularon entre 80 g hL⁻¹ de levadura seca (levadura comercial Fermentis SafAle® S-04), previamente hidratada en un recipiente con agitación hasta la formación de una crema, en un volumen de mosto 10 veces superior al peso utilizado, a temperatura de 25 – 29 °C, incorporando a los recipientes de fermentación una vez formada la crema en el mosto para el primer experimento.

En los experimentos ulteriores se inocularon las levaduras (K1-V1116 y 436.4) a una concentración de 7 Log UFC mL⁻¹. La temperatura en la cual se llevó a cabo la primera fermentación para la obtención de la sidra de base fue de 20±2 °C hasta obtener una sidra tranquila, con una densidad menor a 1,000 g L⁻¹.

Una vez alcanzada esta densidad, se llevó a cabo una segunda fermentación (fermentación carbónica) en botellas de vidrio ámbar de 355 mL a una temperatura de 15±1 °C, adicionando licor de tiraje, el cual consistió una concentración de levadura de 6 Log UFC mL⁻¹ (con relación al volumen del licor) y sacarosa (azúcar de mesa) (20 g L⁻¹), además de reinocular 7 Log UFC mL⁻¹ de *S. enterica* (a excepción del primer experimento) y fermentando por 28 d a 15 °C.

3.3. Análisis físicos y químicos de las sidras

3.3.1. Densidad

Se midió de acuerdo con la OIV (2011), en función de la masa por unidad de volumen de sidra o mosto, a una temperatura de 20°C, expresándose en g mL⁻¹. Se utilizó un picnómetro de 25 mL de capacidad.

3.3.2. Sólidos solubles totales (°Bx)

Se tomaron alícuotas de 1 mL de mosto de manzana, para analizarse en un refractómetro Atago, modelo SPR-N, con el fin de determinar la cantidad de sólidos solubles totales presente en 100 g de mosto.

3.3.3. Acidez total titulable

La acidez de la sidra se determinó según la OIV (2016), mediante la titulación con solución de NaOH 0.1M, con una valoración previa con solución patrón de ftalato ácido de potasio. Se midieron alícuotas de 5 mL de sidra por triplicado (previamente agitada durante 10 min con agitador magnético para la eliminación de CO₂), se aforaron hasta 50 mL con agua destilada, se midió el pH a cada solución y se titularon con la solución de NaOH. Se finalizó la titulación cuando la solución alcanzó un pH de 8.2, expresando la acidez en g L⁻¹ de ácido málico, utilizando la ecuación:

$$g L^{-1} \text{ác. málico} = \frac{(0.1 M NaOH)(Vol. gastado)(67.04)}{\text{alícuota de sidra}}$$

3.3.4. pH

Se utilizó un potenciómetro marca Hanna modelo PH211 calibrado con soluciones amortiguadoras de pH 4 y pH 7 (OIV, 2011).

3.3.5. Grado alcohólico

Se utilizó el método de destilación directa descrito en la OIV (2017). Se midieron 50 mL de sidra (previamente agitada para la eliminación de CO₂) con un matraz aforado, se vertió en un matraz de destilación y se agregó 2.5 mL de solución de Ca(OH)₂ 2 M, así como perlas de ebullición. Se destiló aproximadamente $\frac{3}{4}$ partes del volumen. La mezcla resultante a 20 °C se aforó a 50 mL con agua destilada y se determinó su densidad en un picnómetro de 25 mL, determinando el grado alcohólico consultando las tablas correspondientes de la OIV.

3.3.6. Azúcares reductores

Se valoró por triplicado el reactivo de Fehling-Causse Bonnans (FCB), colocando en un matraz Erlenmeyer 15 mL del reactivo, 50 mL de agua destilada y perlas de ebullición. El matraz se calentó hasta la ebullición de la mezcla y se agregó una solución patrón de azúcar (1.25 g de glucosa anhidra aforada a 250 mL con agua destilada) a una velocidad controlada (dos a tres gotas por segundo) con ayuda de una bureta. Cuando la coloración azul del reactivo disminuyó de intensidad o alcanzó un

tono verde tenue, se agregaron dos gotas de azul de metileno a 1 % y se continuó agregando solución patrón de manera más lenta (una gota por segundo). La primera gota que viró la solución a un color amarillo-dorado, indicó el punto final de la titulación.

Posteriormente, a 50 mL de sidra (libre de CO₂) se adicionaron 8 mL de solución de acetato de plomo [Pb(CH₃COO)₂] al 25 % y 0.5 g carbón activado, filtrando posteriormente con papel Whatman #2.

Finalmente, se llenó la bureta con la sidra decolorada y se titularon 10 mL del reactivo FCB de la misma manera en que se procedió para su valoración. La concentración de azúcar se determinó utilizando los siguientes cálculos:

$$X_1(\text{Factor de Fehling}) = \frac{(\text{mL gastados en valoración})(1.25 \text{ g glucosa})}{250 \text{ mL solución}}$$

$$X_2(\text{g L}^{-1}\text{azúcar}) = \left(\frac{(X_1)(100 \text{ mL})}{\text{mL gastados en titulación}} \right) (10)$$

3.3.7. Acidez volátil

Se determinó por el método García-Tena: Se vertieron 11 mL de la muestra de sidra en un matraz bola de 25 mL y se agregaron 3 perlas de ebullición. Los primeros 5.1 mL del destilado y por separado, los siguientes 3.2 mL. Ambos destilados se titularon con de NaOH (0.02 N) usando fenolftaleína para indicar la neutralización al observar el vire a color rosa.

El valor de acidez volátil real (expresada en ácido acético) se obtuvo sustituyendo en la siguiente formula los mL gastados para valorar los 3.2 mL de destilado.

$$\text{acético real (g L}^{-1}\text{)} = (\text{mL gastados}) (0.366)$$

La acidez volátil aparente (expresada en ácido acético) se obtiene sustituyendo en la siguiente ecuación la cantidad utilizada de NaOH para titular los 5.1 mL de destilado, sumándole lo obtenido en la ecuación anterior:

$$\text{acético aparente (g L}^{-1}\text{)} = (\text{mL gastados}) (0.122) + \text{acético real}$$

3.4. Inducción de resistencia a rifampicina a *Salmonella enterica*

El procedimiento consistió en una extensión en placa de 1 mL de suspensión de la cepa con aproximadamente 10^{10} UFC mL⁻¹, en placas de Agar Soya Tripticasa (AST) con 1 % adicional de NaCl (N) conteniendo 200 ppm de rifampicina (R). Las placas inoculadas se incubaron a temperatura ambiente por 48 h, posterior a esto, las colonias resultantes se sembraron en placas de ASTNR durante dos días consecutivos para asegurar la resistencia a RIF (Kaspar y Tamplin, 1993).

3.5. Inducción de resistencia a pH ácido y etanol

3.5.1 Inducción por presión de selección

Para uno de los experimentos se realizó el procedimiento de adaptación de las cepas de *S. enterica* mediante un procedimiento diseñado en el laboratorio, el cual consiste en la exposición a condiciones de estrés causadas por bajo pH y concentración de etanol en CST, de manera creciente, realizando pases consecutivos diarios de las cepas a CST con concentraciones de etanol desde 0 hasta 8% de etanol (aumento de 1% cada 24 h), y pH de 7.2 hasta 4.56 (disminución de 0.33 unidades cada 24 h), simulando un proceso de fermentación, de tal forma que la presión de selección ejercida sobre las cepas cause que sólo las células más resistentes sobrevivan al proceso, denominando éstas últimas, para efectos de éste trabajo, “cepas adaptadas”.

Tabla 3.1. Condiciones de los pases sucesivos para adaptación de *S. entérica*

Día	% etanol	pH
0 (inóculo)	0	7.2
1	0	7.2
2	1	6.87
3	2	6.54
4	3	6.21
5	4	5.88
6	5	5.55
8	6	5.22
10	7	4.89
12	8	4.56

3.5.2 Inducción rápida por exposición a concentración alta de etanol

Para el experimento referente al estudio de tasa de inactivación de cepas individuales de *S. enterica*, se realizó el procedimiento de adaptación siguiendo la metodología de He *et al.* (2018) con modificaciones, la cual consiste en exponer las cepas de *S. enterica* durante 1 h en CST con pH ajustado a 5.55 de manera independiente con ácido clorhídrico (HCl) y con ácido málico (AM), ambos en presencia de 5 % de etanol. Posteriormente, las cepas adaptadas se centrifugaron a 5000 rpm durante 4 min, y se resuspendieron en mosto de manzana para su inoculación, con un control sin adaptar (SA) siguiendo la misma metodología de centrifugación y resuspensión para su posterior inoculación en las sidras.

3.6. Sobrevivencia de *S. enterica* durante el proceso de elaboración de las sidras

3.6.1. Activación de cepas de *S. enterica* y levaduras

Las cepas de *S. enterica* almacenadas en ultracongelación a -80 °C, fueron activadas en CST (DIBICO®), mientras que las cepas de levadura, almacenadas en las mismas condiciones, fueron activadas en caldo nutritivo con dextrosa para levaduras (NYDB por sus siglas en inglés); preparado con caldo nutritivo (DIBICO®) al 0.8 %, extracto de levadura (DIBICO®) al 0.5% y dextrosa (CTR scientific®) al 1%. La activación se llevó a cabo inoculando 100 µL de la cepa en 3 mL del medio de cultivo respectivo e incubando por 24 h a 35 °C para ambos casos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a centrifugar a 5000 rpm durante 4 min, lavando con solución salina isotónica a 0.85% (SSI) en tres ocasiones y resuspendiendo las células en el último lavado con jugo de manzana. Las suspensiones de las cuatro cepas se mezclaron en volúmenes iguales para conformar un coctél que se empleó para la inoculación del mosto.

3.6.2. Cinética poblacional de *S. enterica* y levaduras durante la elaboración de sidra

La inoculación de *S. enterica* se llevó a cabo al inicio de la fermentación, simulando una contaminación del mosto, siguiendo la metodología descrita en 3.2 para la elaboración de la sidra. Se colectaron alícuotas de 1 mL periódicamente, según se tratara de la primera (días 0, 1, 4 y 7) o segunda fermentación (días 0, 8 y 16) utilizando

para los muestreos de esta última una botella por muestra. En cada tiempo, se realizaron diluciones decimales seriadas de sidra en solución salina isotónica a 0.85 % (SSI 0.85 %) utilizando las diluciones pertinentes para cada recuento, mismo que se llevó a cabo mediante la técnica de extensión en superficie de placa. Para los recuentos de *S. enterica* se utilizó ASTR suplementado con 100 ppm de cicloheximida (C) (ASTRC).

Para los recuentos de levaduras, se utilizó el Agar Nutritivo-Dextrosa para Levaduras (NYDA, por sus siglas en inglés), preparado caldo nutritivo a 0.8 % (DIBICO®), extracto de levadura al 0.5 % (DIBICO®), dextrosa al 1 % (CTR scientific®) y 2 % de agar bacteriológico (DIBICO®), suplementado con 100 ppm de cloranfenicol.

De los resultados obtenidos se tomaron las condiciones de mayor tasa de inactivación de *S. entérica*, para así proceder al experimento con cepas individuales de *S. enterica*, donde se realizará la detección al final de cada fermentación.

3.6.3. Detección de *Salmonella enterica* en sidra tranquila y sidra espumosa

Para la detección de *S. enterica* al final de las fermentaciones de las sidras inoculadas con cepas individuales, se siguió la metodología establecida por el Bacteriological Analytical Manual (FDA, 2020) para jugo de naranja (pasteurizado y sin pasteurizar), sidra de manzana (pasteurizada y sin pasteurizar) y jugo de manzana pasteurizado, realizando algunas modificaciones. El procedimiento consistió en agregar en condiciones asépticas, 25 mL de muestra de sidra a 225 mL de Caldo de Preenriquecimiento Universal (CPU), dentro de un frasco estéril de boca ancha y de rosca, mezclando posteriormente, cerrando completamente el frasco y dejándolo reposar por 60 ± 5 min a temperatura ambiente (evitando ajustar pH). Una vez transcurrido el tiempo de reposo, se aflojó la rosca del frasco y se incubó a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h. Posterior a la incubación, se inocularon tubos con 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) con 0.1 mL de muestra, incubándose en un termobañó a $42 \pm 0.1 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h, y tubos con 10 mL de caldo Tetrionato (TT) con 1 mL de muestra, incubándose a $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 h. Finalizado el tiempo de incubación, se estriaron placas con medio Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD) y Sulfito de Bismuto (SB) tomando una asada de los medios de cultivo antes incubados (caldo RV y TT). Una vez

estriadas, las placas se incubaron a 35 °C por 24 ± 2 h después de lo cual se procedió a la observación de las placas para constatar la presencia o ausencia del patógeno.

3.8. Métodos estadísticos

El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones en un arreglo trifactorial $2 \times 3 \times 2$, siendo los factores de estudio: a) cultivar de manzana (Red Delicious y Golden Delicious); b) cepa de levadura (K1, 436 y MB); y c) adaptación de *S. enterica* (cepas adaptadas y no adaptadas). Como variable respuesta se consideró la tasa de inactivación de *S. enterica* durante el proceso fermentativo, misma que se obtuvo mediante el complemento DMFit para Excel, y de igual forma, la sobrevivencia, utilizando los recuentos del día correspondiente como variable respuesta.

Para evaluar la sobrevivencia de las cepas inoculadas individualmente, se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo bifactorial 3×4 , siendo los factores de estudio: a) cepa de levadura (cepa 1, cepa 3, cepa 4 y cepa 5); y b) adaptación de *S. enterica* (HCl, ácido málico (AM) y no adaptadas). Se consideró igualmente la tasa de inactivación para la primera fermentación, y la presencia o ausencia (detección) de *S. enterica* al final de la primera y la segunda fermentación.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) de dos vías de Fisher y una comparación de medias de Tukey ($\alpha=0.05$) utilizando el programa Minitab en su versión 17.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Capacidad de sobrevivencia/desarrollo de *Salmonella enterica* durante la elaboración de la sidra

Recordemos que para este primer experimento, se elaboró una sidra espumosa con manzana ‘Red Delicious’, utilizando una levadura comercial Fermentis SafAle® S-04.

En la Figura 4.1 se puede observar que, aun cuando existe una diferencia en la carga inicial de levadura fermentativa, con un recuento de 6.57 ± 0.08 Log UFC mL⁻¹ para la levadura comercial inoculada, y 5.36 ± 0.09 Log UFC mL⁻¹ para las levaduras presentes en la microbiota nativa (MB), las tendencias que se observaron en ambos tratamientos fueron similares a partir del quinto día, tanto en la primera como en la segunda fermentación. Si bien se observa un decremento en las poblaciones de levadura al final de la primera fermentación (entre 4.5 y 5 Log UFC mL⁻¹ en ambos casos), los recuentos son similares a los encontrados en los experimentos en fermentación de sidra con levadura *S. cerevisiae* realizados por Liu *et al.* (2015). Para la segunda fermentación, llevada a cabo en botella, los recuentos de levaduras se mantuvieron alrededor de 5 Log UFC mL⁻¹ para ambos casos, al final de la fermentación (día 41).

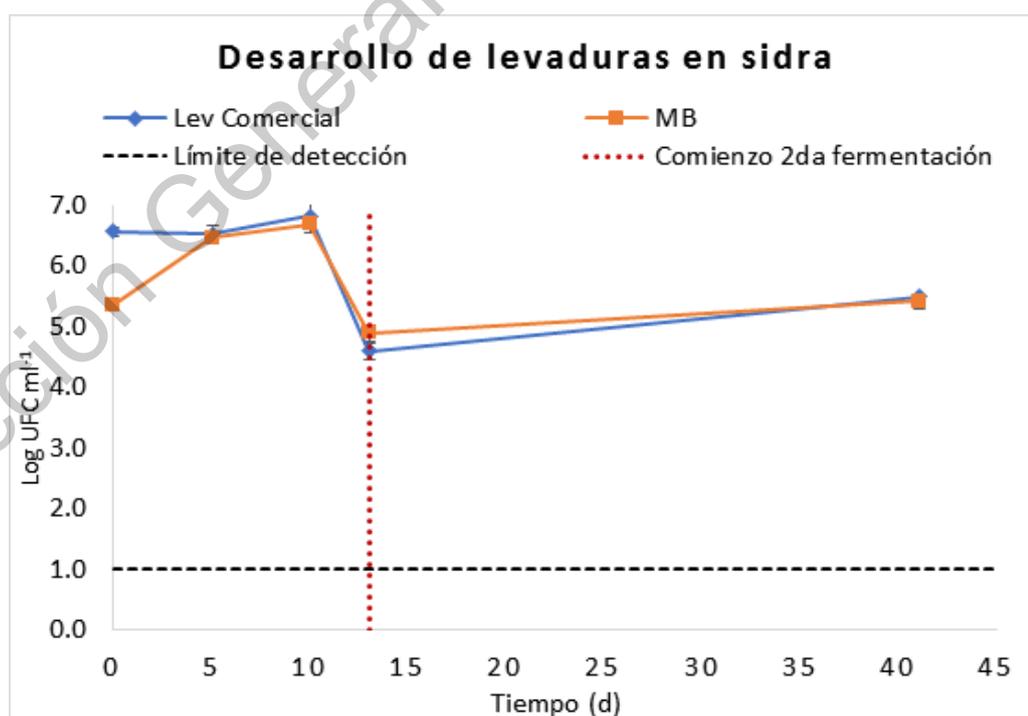


Figura 4.1. Cambios poblacionales de la levadura comercial y la levadura de la microbiota nativa (MB) durante el proceso de fermentación de la sidra

Respecto a *S. enterica*, se observa que al final de la primera fermentación (día 13), en el tratamiento de fermentación con MB ésta sobrevive inesperadamente con un recuento de 4.3 ± 0.2 Log UFC mL^{-1} , en contraste, en la sidra fermentada con levadura comercial, el recuento de dicho patógeno se encontró por debajo del límite de detección de la técnica, pudiendo ser atribuido a que se trata de una sola población seleccionada de levaduras, en comparación con MB, que son un conjunto de levaduras, bacterias, entre otros, compitiendo en el medio. En el muestreo realizado al final de la segunda fermentación las poblaciones del patógeno se encontraron por debajo de dicho límite ambos tratamientos (Figura 4.2).

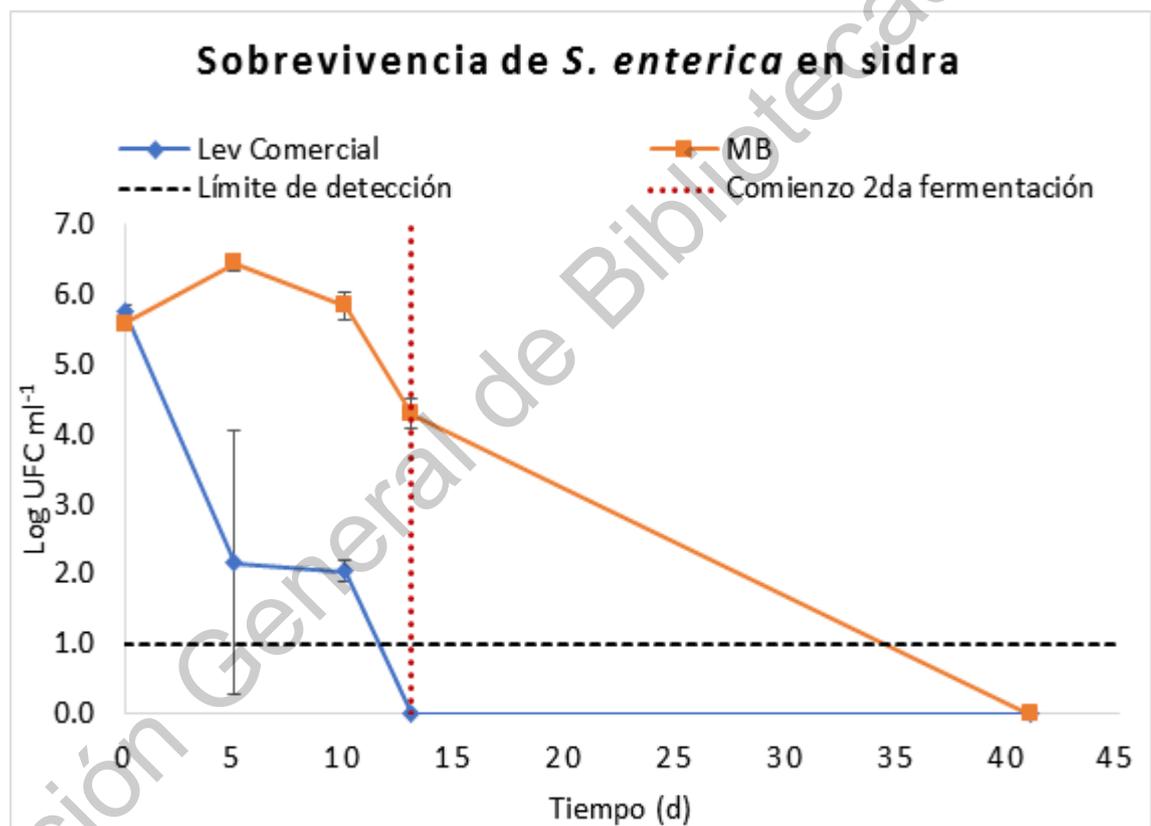


Figura 4.2. Cambios poblacionales de *S. enterica* inoculada en sidra fermentada con levadura comercial y en sidra fermentada con la microbiota nativa (MB) a lo largo del proceso fermentativo.

El hecho de que *Salmonella* haya sido capaz de sobrevivir en las condiciones de pH ácido y la concentración creciente de etanol adquiridos durante el proceso de fermentación puede deberse a la capacidad de persistir en ambientes estresantes que tienen algunos patógenos como *S. enterica*, *E. coli*, entre otros, e incluso a la capacidad

de resistencia a acidez de *S. enterica* (aun siendo menor que la de *E. coli*) (Kim *et al.*, 2014).

En el caso de la levadura comercial SafAle® S-04, se observa que *S. enterica* no se encuentra detectable al final de la primera fermentación. Semanchek y Golden (1996) inocularon *E. coli* O157:H7 en mosto de manzana, procediendo a la fermentación hasta obtener una sidra tranquila. La cepa inoculada disminuyó su población de manera significativa al cabo de tres días (3 d) de fermentación, y el patógeno no fue detectable cuando las concentraciones de etanol fueron iguales o superiores a 1.94 %. Los autores sugieren un efecto del pH y otros subproductos de la fermentación como los responsables de la inactivación del patógeno. Esta disminución en la sidra se contrasta con un descenso mínimo de población de *E. coli* en el mosto de manzana “sin inoculación” (no se inocula una levadura, fermentándose con la microbiota nativa presente), lo que muestra un efecto de la levadura seleccionada en la inactivación del patógeno.

Las diferencias entre el inóculo de un microorganismo fermentativo sobre el desarrollo de patógenos (en este caso, una levadura seleccionada *S. cerevisiae*), cuyas características y comportamiento se conocen en su totalidad, en comparación con una fermentación causada por una carga microbiológica nativa, resultan notorias.

4.2. Adaptación de cepas de *Salmonella enterica* a condiciones de pH y concentración de etanol similares a las de la sidra

En este experimento se buscó que las cepas de *S. enterica* fueran sometidas a una presión de selección al estar expuestas a condiciones estresantes crecientes gradualmente a partir de pases diarios (disminución de pH y aumento de % de etanol en pases diarios), obteniendo de esta manera cepas a las que se les denominó “adaptadas”.

En la Figura 4.3 se puede observar que las poblaciones de las distintas cepas de *Salmonella* generan en las 24 h de incubación niveles similares de población durante los primeros seis días (subcultivos). Posteriormente, las poblaciones de todas las cepas tienden a disminuir a medida que las condiciones estresantes aumentan. Al día 12 se observa que las cepas 1, 4 y 5 muestran conteos muy similares entre sí, los cuales rondan los 6 Log UFC mL⁻¹, y que contrastan con la cepa 3, misma que mostró

recuentos de 3.95 ± 0.35 Log CFU mL⁻¹, lo que muestra que esta cepa es la más susceptible a condiciones de pH ácidos y etanol, y sus combinaciones. (Figura 4.3).

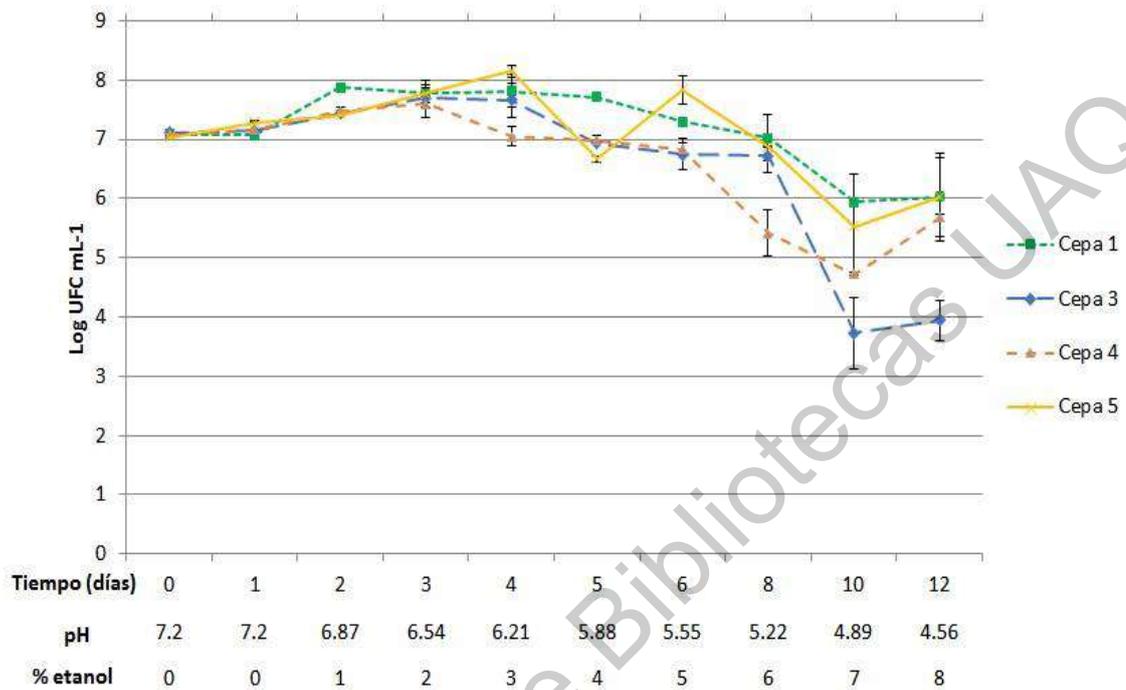


Figura 4.3. Cambios en la población de *S. enterica* durante el proceso de adaptación a pH ácido y etanol.

Estas diferencias entre cepas coinciden con lo reportado por varios autores (Bacon *et al.*, 2003; Arvizu-Medrano y Escartín, 2005; Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2012), quienes reportan diferencias en la sobrevivencia de varios microorganismos (tales como *Salmonella* Typhi y *Salmonella* Typhimurium) ante la presencia de factores de estrés, a nivel de serovar, lo que se traduce en diferencias en los grados de adaptación; observándose además que al ser expuesta previamente a condiciones subletales de acidez, *S. enterica* es capaz de sobrevivir a condiciones más agresivas (8% de etanol en combinación con pH 4.56).

La adaptación a etanol y pH ácido fue manifiesta en todas las cepas de *S. enterica* estudiadas, aun con las variaciones en su población final, sin embargo, y de acuerdo con lo reportado por Casadei *et al.* (2001), el proceso de adaptación se vuelve más difícil cuando se suman condiciones de estrés, como la concentración de etanol, generando un decremento en la población sobreviviente.

4.3. Cinética poblacional de coctel de cepas de *Salmonella enterica* adaptadas y sin adaptar durante la fermentación

4.3.1. Levadura K1-V116 (K1)

a) Primera fermentación

En la sidra ‘Golden Delicious’ (Figura 4.4), de forma general se observa una tendencia a la inactivación, tanto en la población de *Salmonella* adaptada, como en la no adaptada, desde el inicio de la fermentación y hasta el día 4; hasta ese punto, *S. enterica* disminuyó hasta menos de 3 Log UFC mL⁻¹ (alrededor de 1.5 Log UFC mL⁻¹ en cepas adaptadas y cerca de 2.3 Log UFC mL⁻¹ para cepas sin adaptar) permaneciendo en niveles cuantificables por la técnica hasta el final de la primera fermentación (día 7) para ambos niveles de adaptación, sin embargo, en poblaciones bajas (alrededor de 2.4 Log UFC mL⁻¹ para cepas adaptadas, cuya población incluso aumentó con relación al día 4, y aproximadamente 1.7 Log UFC mL⁻¹ para cepas no adaptadas).

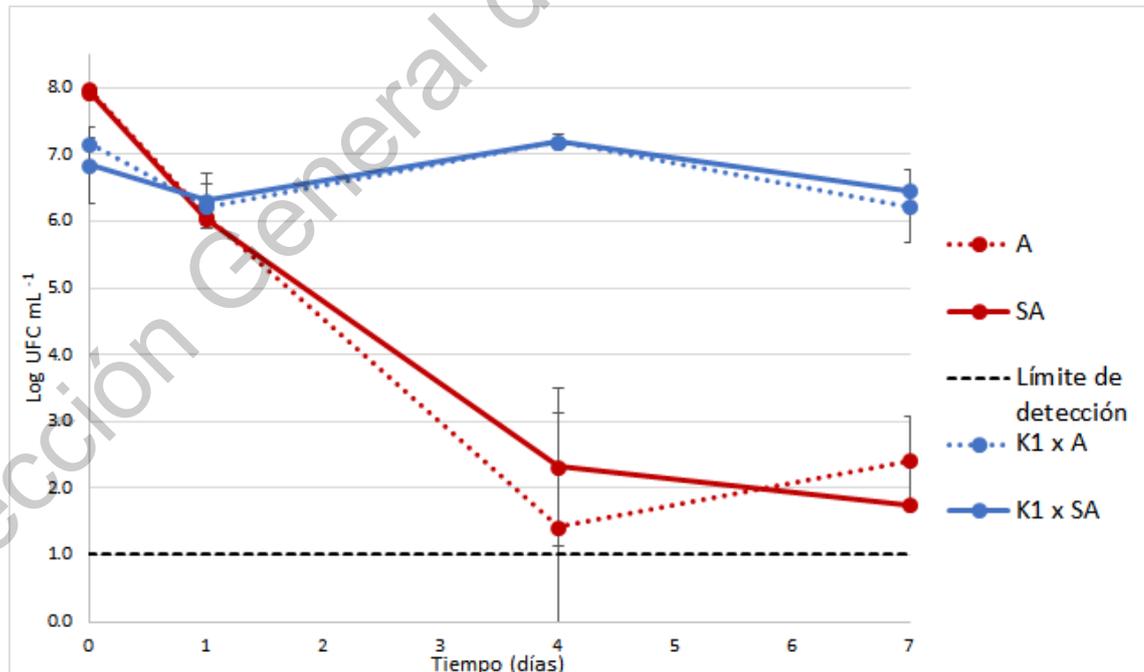


Figura 4.4. Evolución de las poblaciones de levadura K1 y *S. enterica* en sidra ‘Golden Delicious’. “A”: *S. enterica* adaptada; “SA”: *S. enterica* sin adaptar; “K1 x A”: levadura en presencia de *S. enterica* adaptada; “K1 x SA”: levadura en presencia de *S. enterica* sin adaptar.

Por el contrario, para el caso del cultivar ‘Red Delicious’ (Figura 4.5), el consorcio de cepas de *S. enterica* adaptadas fue detectable hasta el día 4 de fermentación, con recuentos de alrededor de 1.7 Log UFC mL⁻¹ para cepas adaptadas, mientras que las cepas sin adaptar fueron indetectables, lo que coincide sensiblemente con lo reportado con Arvizu-Medrano y Escartín (2005) y Álvarez-Ordóñez *et al.* (2012), ya que los microorganismos que no fueron expuestos a condiciones de estrés previas mostraron una mayor disminución de sus poblaciones. Al final de la primera fermentación (día 7) ambos cocteles fueron indetectables por la técnica utilizada (<1Log UFC mL⁻¹).

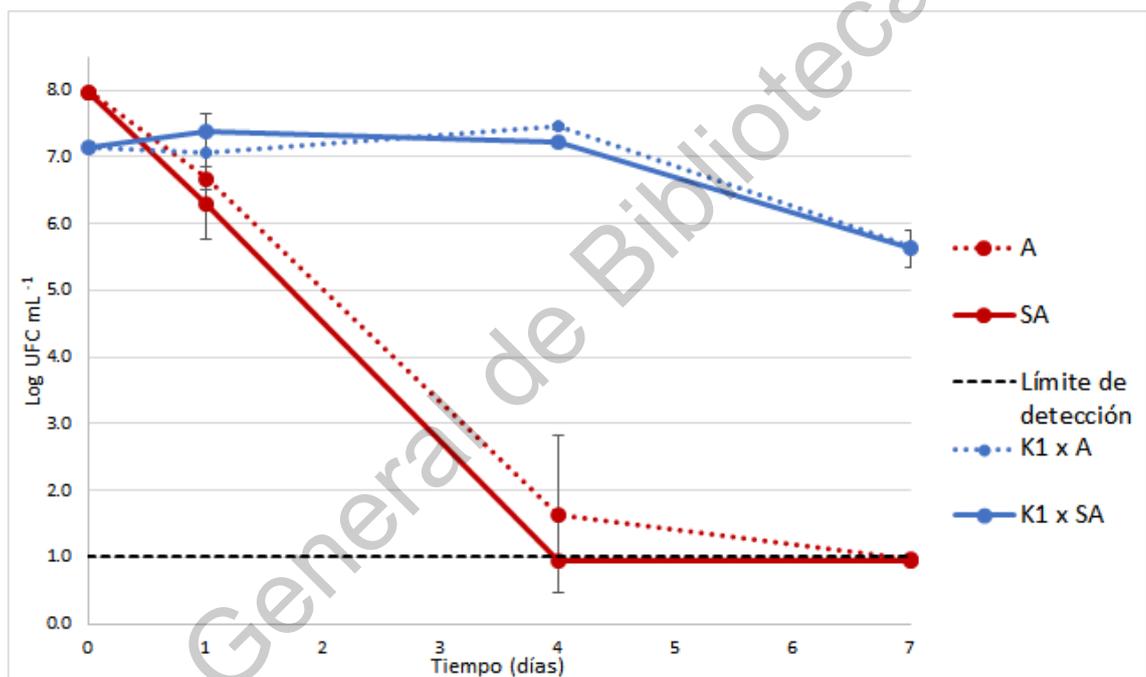


Figura 4.5. Evolución de las poblaciones de levadura K1 y *S. enterica* en sidra *Red Delicious*. “A”: *S. enterica* adaptada; “SA”: *S. enterica* sin adaptar; “K1 x A”: levadura en presencia de *S. enterica* adaptada; “K1 x SA”: levadura en presencia de *S. enterica* sin adaptar.

Se advierte una diferencia en la sobrevivencia de *S. enterica* en función de la variedad de manzana, mostrándose un recuento de población de *S. enterica* que no fue posible detectar al final de la primera fermentación (día 7) en sidra ‘Red Delicious’, caso contrario a lo observado en la sidra ‘Golden Delicious’, donde *S. enterica* se mostró cuantificable (entre 1 y 2 Log UFC mL⁻¹) al final de la primera fermentación, diferencia que puede ser atribuida a la composición química de cada variedad.

En ambas fermentaciones (Golden Delicious y Red Delicious) la levadura K1 persistió a lo largo del proceso, siempre en concentraciones entre 6-7 Log UFC mL⁻¹).

b) Segunda fermentación

Para la segunda fermentación, los recuentos de *S. enterica* disminuyeron hasta rondar en 1 Log UFC mL⁻¹ alrededor del día 8 en las sidras de ambas variedades y en ambos niveles de adaptación, resultando en conteos por debajo del límite de detección al transcurso de 16 d de fermentación en botella (Figura 4.6 y Figura 4.7). Lo anterior podría deberse al aumento de la concentración de etanol en conjunto con el aumento de la presión interna, siendo este último un factor a considerar, como lo mencionan Diels y Michiels (2008), pues el aumento en la presión ha sido utilizado para reducir cargas microbiológicas de manera no térmica, siendo éste uno de los principios de una de las tecnologías emergentes conocidas como “Altas Presiones Hidrostáticas”. A pesar de que el microorganismo puede generar resistencia a distintos factores de estrés, la exposición simultánea a muchos de éstos puede causar un gran descenso de la población, hasta la desaparición de ésta (Casadei *et al.*, 2001).

Respecto a la levadura, no se observa una diferencia significativa en el comportamiento de esta en ambas variedades de manzana, por lo que para el caso de esta fermentación, el descenso de población puede atribuirse principalmente a la suma de factores de estrés y la reducción de fuentes de carbono, como es mencionado con anterioridad.

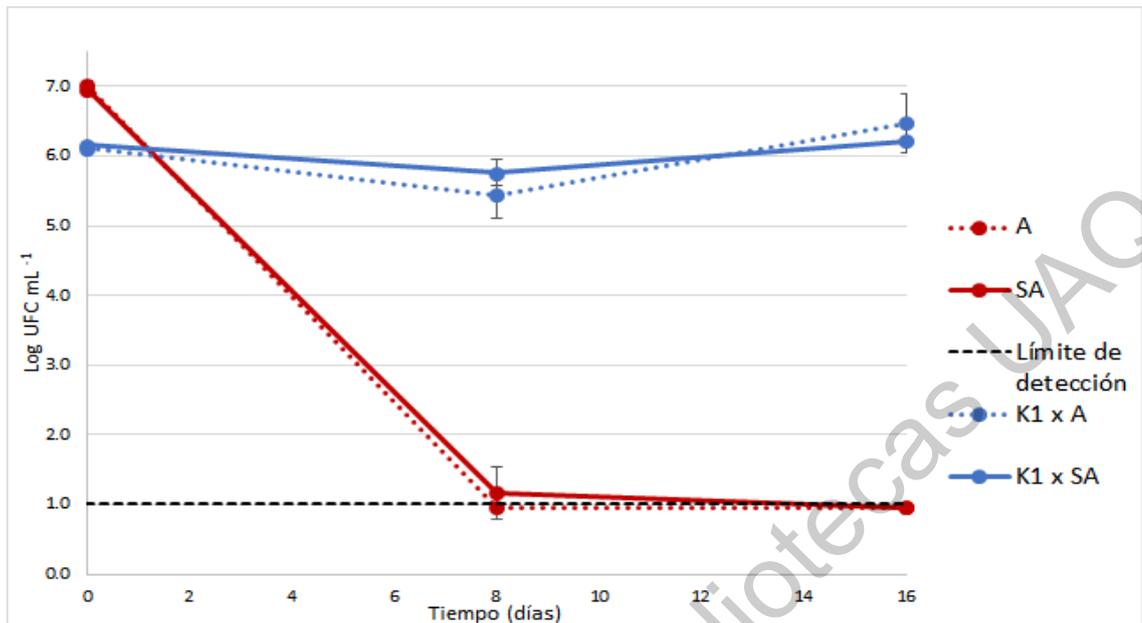


Figura 4.6. Evolución en segunda fermentación de las poblaciones de levadura K1 y *S. enterica* en sidra *Red Delicious*. “A”: *S. enterica* adaptada; “SA”: *S. enterica* sin adaptar; “K1 x A”: levadura en presencia de *S. enterica* adaptada; “K1 x SA”: levadura en presencia de *S. enterica* sin adaptar.

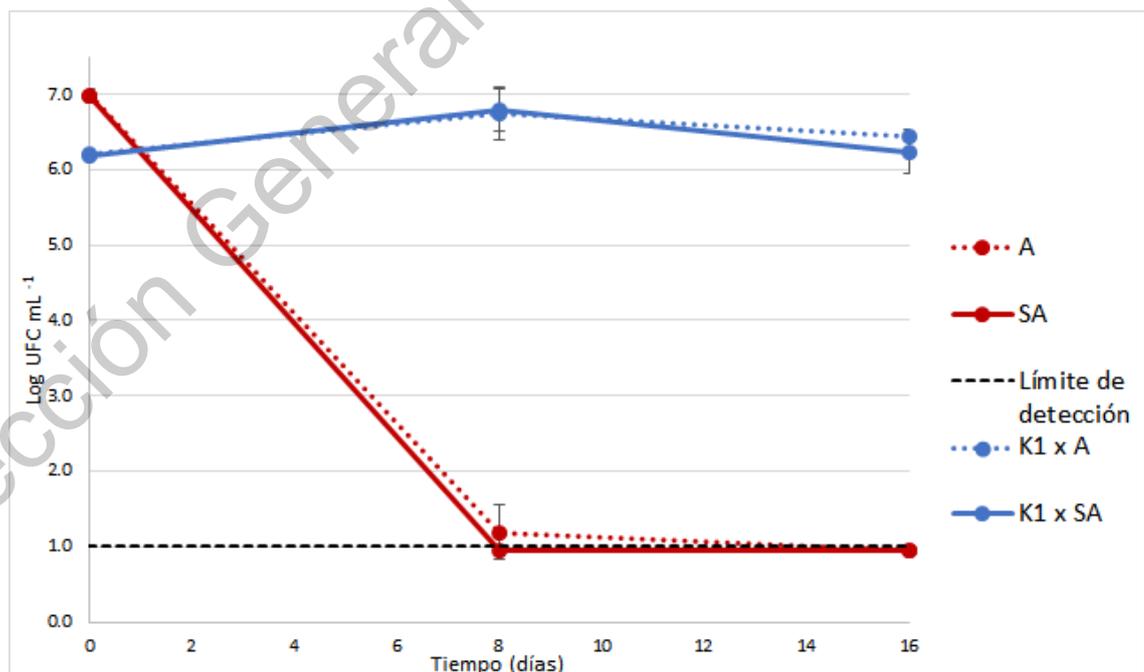


Figura 4.7. Evolución en segunda fermentación de las poblaciones de levadura K1 y *S. enterica* en sidra ‘Golden Delicious’. “A”: *S. enterica* adaptada; “SA”: *S. enterica* sin adaptar; “K1 x A”: levadura en presencia de *S. enterica* adaptada; “K1 x SA”: levadura en presencia de *S. enterica* sin adaptar.

4.3.2. Levadura 436.4 (436)

a) Primera fermentación

Respecto a la cepa fermentativa 436, cabe recalcar que aun cuando los recuentos de *S. enterica* sin adaptar en sidra ‘Golden Delicious’ no se detectaron al día 4, ($<1 \text{ Log UFC mL}^{-1}$); al final de esta primera fermentación la población fue cuantificable. Los resultados aquí observados son comparables con los obtenidos con la levadura K1, pues *S. enterica* estuvo presente hasta el día 7 (día final) de la primera fermentación de la sidra de mosto ‘Golden Delicious’, con recuentos de alrededor de $1.8 \text{ Log UFC mL}^{-1}$ para cepas adaptadas y no adaptadas (Figura 4.8).

Por otro lado en el caso de lo obtenido en la sidra ‘Red Delicious’, los recuentos se encontraron debajo del límite de detección desde el día 4 (Figura 4.9), lo cual evidencia una menor resistencia de *S. enterica* en este cultivar, como se observa en los tratamientos con levadura K1 y con MB, pudiendo atribuirse, de igual manera que en el

Por otro lado, no se observan diferencias aparentes en cuanto al comportamiento de las poblaciones de levadura en ambos cultivares, lo cual se asemeja a lo observado en los tratamientos con K1. Se observa que alrededor del día 4, en ambos tratamientos, las poblaciones rondan los $7 \text{ Log UFC mL}^{-1}$, descendiendo al día 7 de la fermentación a alrededor de $6 \text{ Log UFC mL}^{-1}$ para el caso de ‘Golden Delicious’, y a alrededor de $5.3 \text{ Log UFC mL}^{-1}$ en el caso de ‘Red Delicious’.

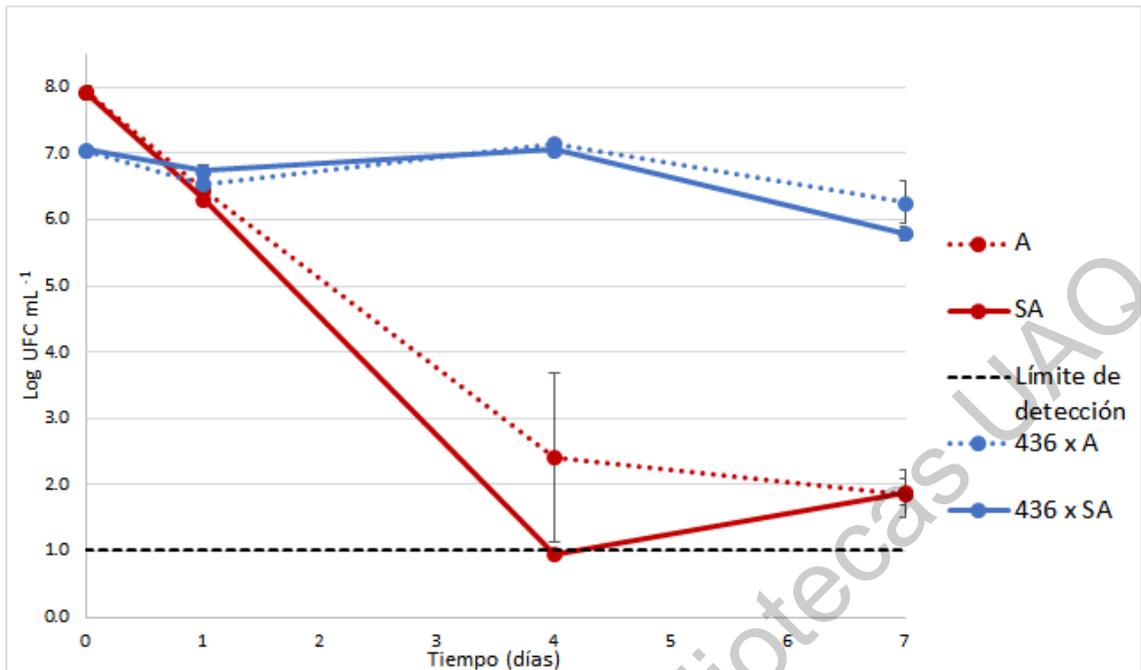


Figura 4.8. Evolución de las poblaciones de levadura 436 y *S. enterica* en sidra *Golden Delicious*. “A”: *S. enterica* adaptada; “SA”: *S. enterica* sin adaptar; “436 x A”: levadura en presencia de *S. enterica* adaptada; “436 x SA”: levadura en presencia de *S. enterica* sin adaptar.

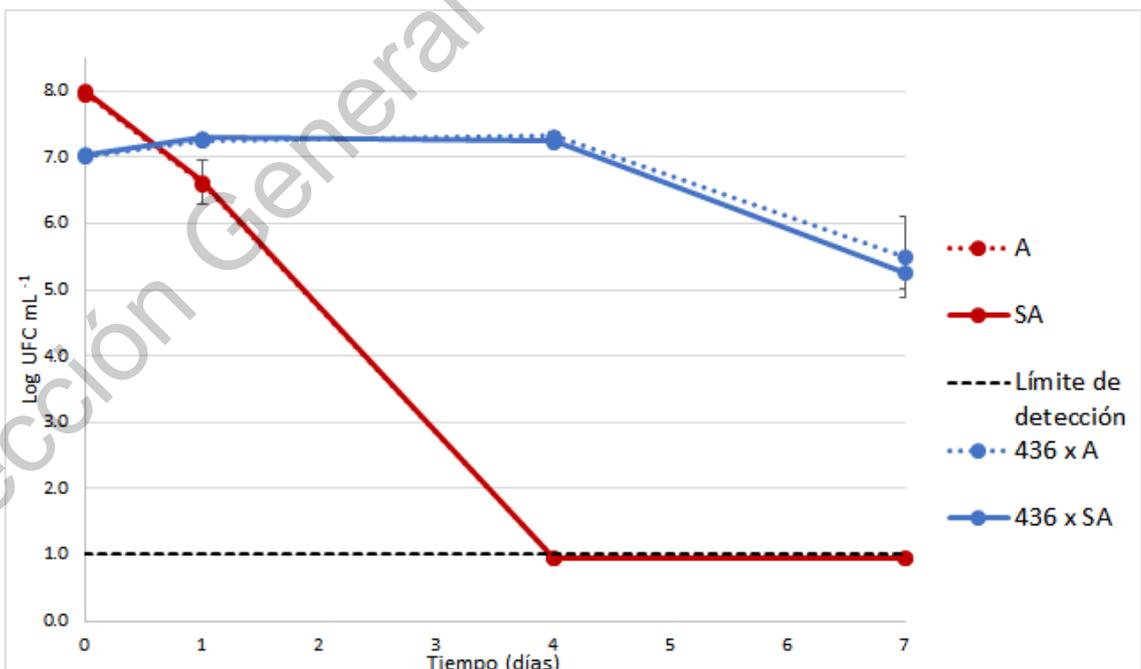


Figura 4.9. Evolución de las poblaciones de levadura 436 y *S. enterica* en sidra *Red Delicious*. “A”: *S. enterica* adaptada; “SA”: *S. enterica* sin adaptar; “436 x A”: levadura en presencia de *S. enterica* adaptada; “436 x SA”: levadura en presencia de *S. enterica* sin adaptar.

b) Segunda fermentación

La tendencia de *S. enterica* fue a la inactivación (Figura 4.10 y 4.11), al día 8 en ambos cultivares no se detectó el patógeno, con excepción del caso de las cepas no adaptadas en sidra ‘Red Delicious’, las cuales mostraron recuentos de cerca de 2 Log UFC mL⁻¹ lo que contrasta con los recuentos obtenidos en la sidra fermentada con K1, con las mismas condiciones de variedad de manzana y adaptación.

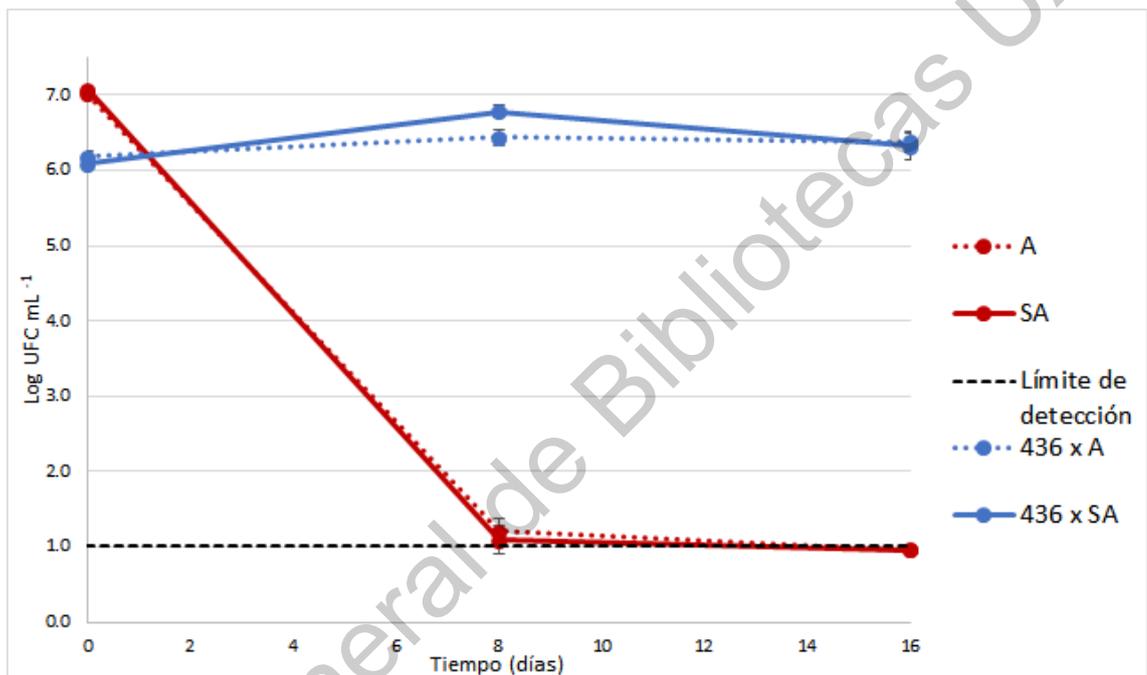


Figura 4.10. Evolución en segunda fermentación de las poblaciones de levadura 436 y *S. enterica* en sidra *Golden Delicious*. “A”: *S. enterica* adaptada; “SA”: *S. enterica* sin adaptar; “436 x A”: levadura en presencia de *S. enterica* adaptada; “436 x SA”: levadura en presencia de *S. enterica* sin adaptar.

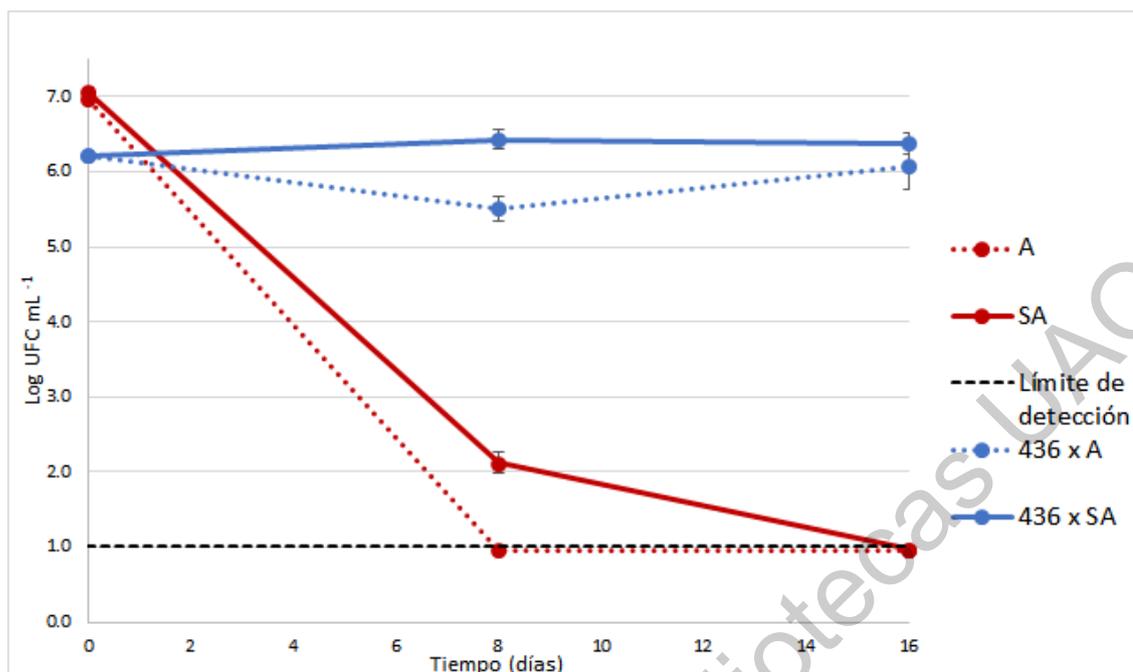


Figura 4.11. Evolución en segunda fermentación de las poblaciones de levadura 436 y *S. enterica* en sidra *Red Delicious*. “A”: *S. enterica* adaptada; “SA”: *S. enterica* sin adaptar; “436 x A”: levadura en presencia de *S. enterica* adaptada; “436 x SA”: levadura en presencia de *S. enterica* sin adaptar.

4.3.3. Microbiota nativa (MB)

a) Primera fermentación

En lo que respecta a MB al día 4 la población de *S. enterica* en la variedad ‘Golden Delicious’ (Figura 4.12) fue indetectable, sin embargo ésta resultó nuevamente cuantificable al final de la primera fermentación (cerca de 1.5 Log UFC mL⁻¹), coincidiendo con lo observado en los casos anteriores.

Sin embargo, en la sidra elaborada con ‘Red Delicious’ existió una reducción marcada, hasta alcanzar aproximadamente 1.6 Log UFC mL⁻¹ al día 4 tanto para las cepas adaptadas como para las no adaptadas, mientras que al día 7, no hubo detección del patógeno (Figura 4.13).

Lo anterior contrasta con el comportamiento del patógeno en presencia de las levaduras K1 y 436, y evidencia que MB no es tan eficaz en cuanto a la inactivación de *S. enterica*, donde se observa que la acidez y el alcohol producidos por las levaduras naturalmente presentes no fueron suficientes para una inactivación (aun cuando se obtiene una tasa de inactivación alta debido al rápido descenso de población al día 4 en

‘Golden Delicious’), puesto que, al no tener una población específica, existe un control microbiológico deficiente, comparándose nuevamente a lo obtenido en las fermentaciones realizadas por Semanchek y Golden (1996), donde la fermentación sin inóculo seleccionado afecta en menor medida la sobrevivencia del patógeno.

En cuanto al comportamiento de las levaduras, se observa un cambio poblacional que se asemeja a los tratamientos con K1 y 436, rondando los 7 Log UFC mL⁻¹ al día 4 en ambos casos, y mostrando poblaciones de entre 5.5 y 6.5 Log UFC mL⁻¹ al final de la primera fermentación (día 7) para ambos cultivares.

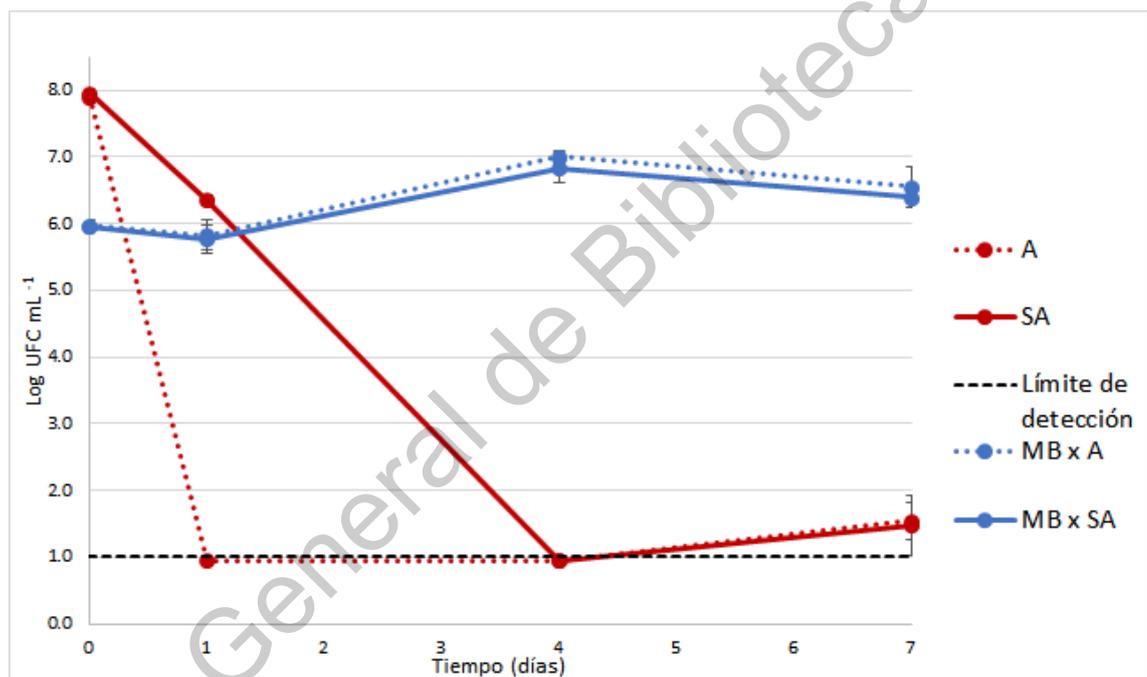


Figura 4.12. Evolución de las poblaciones de levadura MB y *S. enterica* en sidra ‘Golden Delicious’. “A”: *S. enterica* adaptada; “SA”: *S. enterica* sin adaptar; “MB x A”: levadura en presencia de *S. enterica* adaptada; “MB x SA”: levadura en presencia de *S. enterica* sin adaptar.

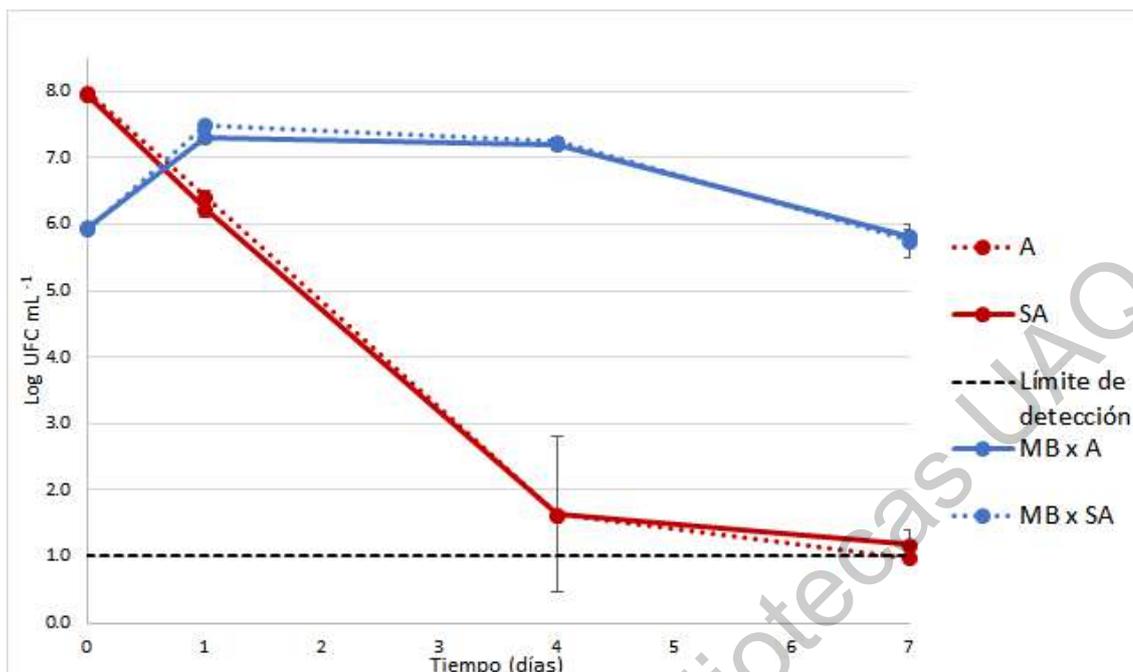


Figura 4.13. Evolución de las poblaciones de levadura MB y *S. enterica* en sidra ‘Red Delicious’. “A”: *S. enterica* adaptada; “SA”: *S. enterica* sin adaptar; “MB x A”: levadura en presencia de *S. enterica* adaptada; “MB x SA”: levadura en presencia de *S. enterica* sin adaptar.

b) Segunda fermentación

En la segunda fermentación, para el caso de ‘Red Delicious’ (Figura 4.14), *S. enterica* tendió a inactivarse hacia el día 8 de la fermentación, permaneciendo indetectable al día 16, siguiendo comportamientos similares a los observados en presencia de las levaduras K1 y 436.

En la sidra ‘Golden Delicious’ (Figura 4.15), de forma muy similar a lo señalado arriba para ‘Red Delicious’, la población de *S. enterica* tendió a la inactivación, encontrándose por debajo del límite de detección al cabo de 16 d.

Al igual que en las segundas fermentaciones de K1 y 436, el comportamiento de la levadura no resultó similar en todos los tratamientos, por lo que, para el caso de la segunda fermentación en los tres tratamientos, se concluye que no existe un efecto evidente ejercido por la levadura para la segunda fermentación.

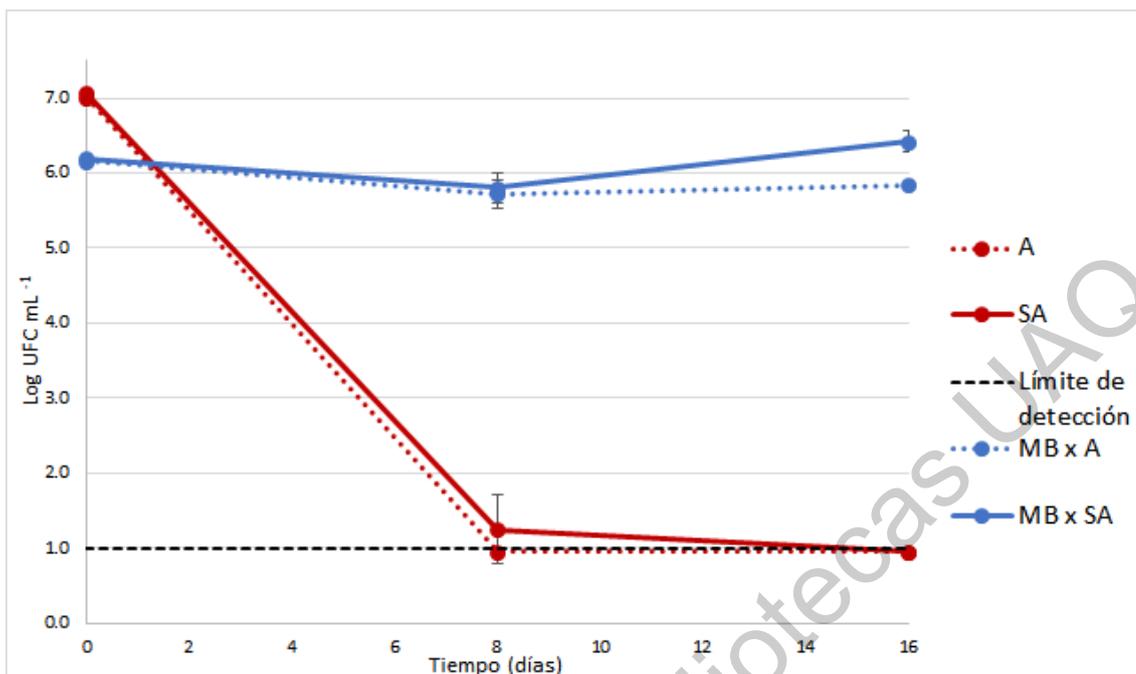


Figura 4.14. Evolución en segunda fermentación de las poblaciones de levadura MB y *S. enterica* en sidra *Red Delicious*. “A”: *S. enterica* adaptada; “SA”: *S. enterica* sin adaptar; “MB x A”: levadura en presencia de *S. enterica* adaptada; “MB x SA”: levadura en presencia de *S. enterica* sin adaptar.

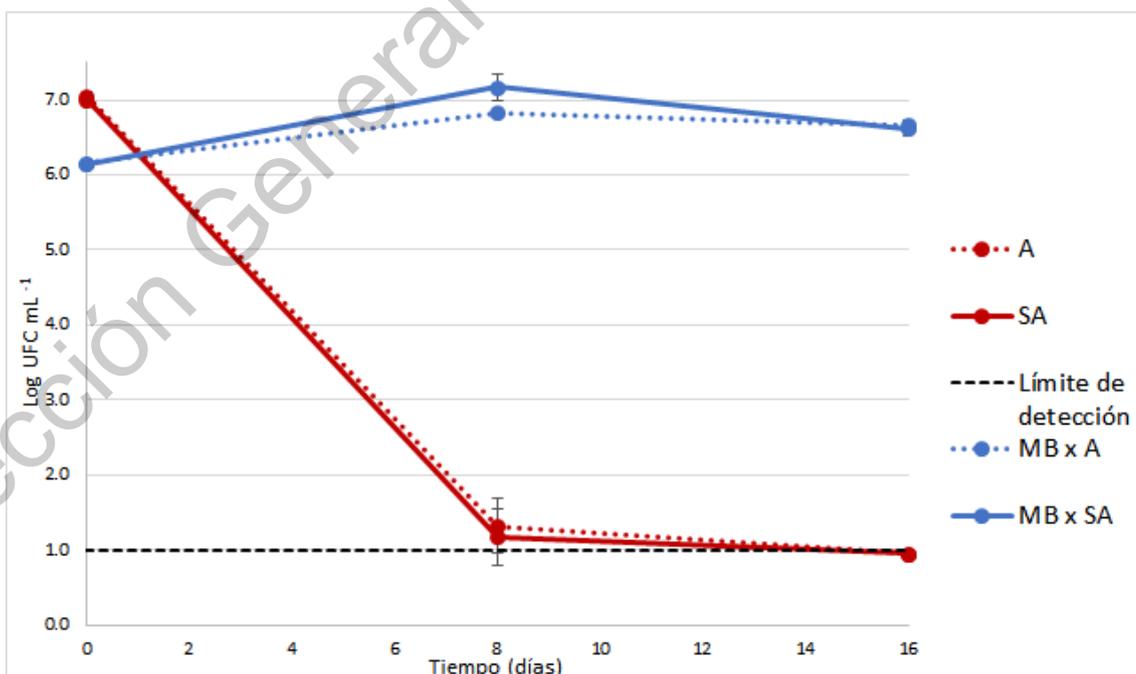


Figura 4.15. Evolución en segunda fermentación de las poblaciones de levadura MB y *S. enterica* en sidra *Golden Delicious*. “A”: *S. enterica* adaptada; “SA”: *S. enterica* sin adaptar; “MB x A”: levadura en presencia de *S. enterica* adaptada; “MB x SA”: levadura en presencia de *S. enterica* sin adaptar.

Como se ha mencionado con anterioridad, algunas poblaciones de bacterias (en este caso, *S. enterica*) tienden a inactivarse debido al incremento de pH, al igual que la presencia de ácidos orgánicos (como el ácido málico presente en la manzana), aunado con la concentración creciente de etanol, siendo el conjunto de estos factores estresantes el responsable de la inactivación de la población de este patógeno (Casadei *et al.*, 2001).

En el caso de la segunda fermentación, la población de *S. enterica* puede ser asociada al conjunto de los factores antes mencionados, sin embargo, en este caso, el factor “presión” que se suma, puede ser causante de una reducción más notoria durante esta última fermentación (Diels y Michiels, 2008).

En lo que respecta a las poblaciones de levaduras en los distintos tratamientos, las tendencias son bastante similares en todos los casos, es decir, no se observa una tendencia de aumento de población ni de abatimiento de las mismas, por el contrario, las poblaciones tienden a mantenerse alrededor de los 6 Log UFC mL⁻¹ en ambas fermentaciones. Si bien existen casos en los que la población aumenta aproximadamente 1 Log UFC mL⁻¹ a mediados de la fermentación, como en la mayoría de los tratamientos con MB, en ambas fermentaciones y en ambas condiciones de adaptación de *S. enterica* (observable en Figura 4.12, Figura 4.13 y Figura 4.14), se observa que al final de ambas fermentaciones, en todos los casos antes mencionados, las poblaciones tienden a mantenerse cerca de los 6 Log UFC mL⁻¹.

Aun cuando las poblaciones de levadura fueron similares en todos los tratamientos, existen diferencias en la sobrevivencia de *S. enterica* dependiendo de la levadura fermentativa a la que se encuentre expuesta, donde las levaduras K1 y 436 muestran un mayor efecto en la inactivación de *S. enterica* en comparación con la exposición de *S. enterica* a MB en la fermentación, similar a lo obtenido en el trabajo de Semanchek y Golden (1996) en que la fermentación se generó espontáneamente, lo que pudo hacerla muy lenta y poco eficiente.

4.3.4. Análisis estadístico de la sobrevivencia de *Salmonella enterica* en la primera y segunda fermentación

En la primera fermentación no se encontraron diferencias en la sobrevivencia entre ninguno de los factores ni sus interacciones al día del muestreo (día 4) (Tabla 4.1).

En cuanto a la segunda fermentación, la sobrevivencia al día 8 se mostró significativa (<0.05) sólo para el factor de adaptación. De igual forma, la interacción entre variedad y adaptación (a x c) se muestra altamente significativa (<0.001), y la interacción de levadura con adaptación (b x c) se muestra significativa (<0.046). Sin embargo, y debido a la naturaleza del proceso (duración de al menos 28 días de fermentación en botella), la sobrevivencia al día 8 de segunda fermentación no resulta ser importante a la hora de los recuentos, pues se muestra en todos los casos, por debajo del límite de detección al día 16 en todos los tratamientos.

Tabla 4.1. Valores de “P” para los factores de estudio y sus interacciones en la sobrevivencia de *S. enterica* a mitad de primera fermentación y primera semana de segunda fermentación.

Factor	Valor P	
	1 ^{er} fermentación (día 4)	2 ^a fermentación (día 8)
(a) Variedad	0.377	0.373
(b) Levadura fermentativa	0.523	0.057
(c) Adaptación	0.377	0.037
Interacción a x b	0.091	0.053
Interacción a x c	0.909	<0.001
Interacción b x c	0.523	0.046
Interacción a x b x c	0.178	0.105

4.4. Tasa de inactivación de *Salmonella enterica* en función de la variedad de manzana, la levadura y la adaptación del patógeno

4.4.1. Análisis de varianza

Se encontraron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) en las tasas de inactivación de *Salmonella* en la primera fermentación, con respecto a los factores “variedad” y “cepa de levadura”, además de todas sus interacciones. Para el caso de la

adaptación de las cepas de *S. enterica*, las diferencias fueron significativas ($P \leq 0.05$). Respecto a la segunda fermentación, no se encontraron diferencias entre ninguno de los factores o interacciones (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Valores de P para los factores de estudio y sus interacciones de la tasa de inactivación en primera y segunda fermentación.

Factor	Valor P	
	1 ^{er} fermentación	2 ^a fermentación
(a) Variedad	0.001	0.430
(b) Levadura fermentativa	<0.001	0.258
(c) Adaptación	0.015	0.312
Interacción a x b	<0.001	0.534
Interacción a x c	0.008	0.430
Interacción b x c	0.001	0.127
Interacción a x b x c	0.001	0.159

4.4.2. Efectos principales

a) Variedad

La variedad ‘Golden Delicious’ (Golden) presenta una mayor tasa de inactivación (-1.34) que ‘Red Delicious’ (Red) (-0.44) sobre *S. enterica* (Figura 4.16), lo que puede estar relacionado con la composición química de los frutos. Además de las diferencias que pudieran haber en la composición de ácidos orgánicos de las variedades, existe una diferencia en la composición de polifenoles, siendo en ‘Red Delicious’ donde se ha reportado mayor cantidad (polifenoles totales por método de Folin de 124 ± 3.68 mg EqQ / 100g; por HPLC de 379 ± 19.9 mg EqQ/100g), en comparación con ‘Golden Delicious’ (polifenoles totales por método de Folin de 70.4 ± 1.15 mg EqQ / 100g; por HPLC de 217 ± 4.29 mg EqQ / 100g) (Mari *et al.*, 2010), pudiendo ser ésta una de las causas principales de los efectos observados, pues es sabido que algunos compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, por ejemplo) tienen actividad antimicrobiana (Sánchez-Maldonado *et al.*, 2011).

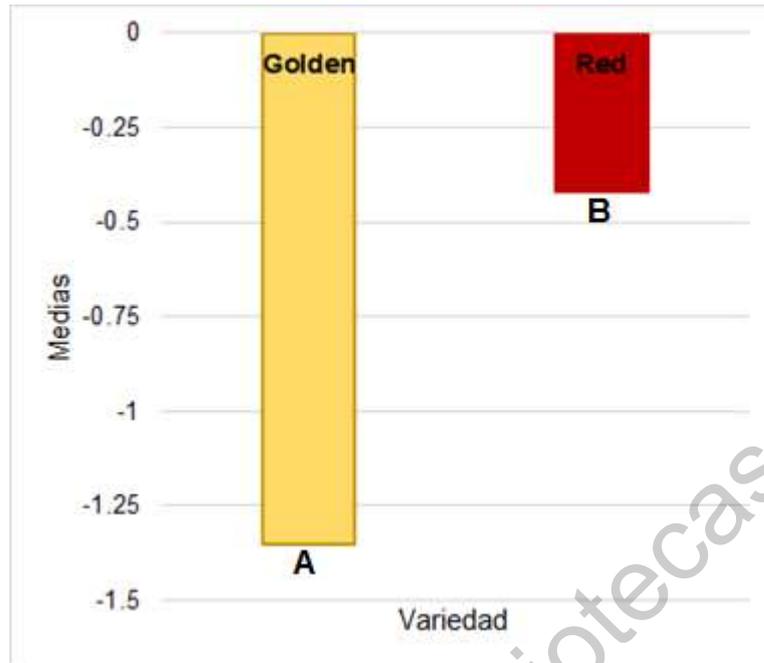


Figura 4.16. Efecto de la variedad de manzana sobre la velocidad de inactivación de *S. enterica*

b) *Levadura fermentativa*

En la Figura 4.17 se observa que no se presentan diferencias en la tasa de inactivación de *S. enterica* entre las levaduras seleccionadas 436 y K1 (-0.51 y -0.39 respectivamente), pero sí de éstas con MB la cual presenta un mayor valor (-1.79). Lo anterior pudiera deberse a que tanto la cepa comercial K1 como la cepa seleccionada 436 poseen el fenotipo *Killer*, el cual facilita la eliminación de otros géneros de levaduras que generan una fermentación más lenta y menos eficiente (León-Teutli *et al.*, 2020). Para el caso de la MB, donde no es posible decir que solamente se encuentra una especie específica de levadura, que posea las características óptimas de fermentación. Semanchek y Golden (1996) reportan que *E. coli* presenta una menor sobrevivencia durante la fermentación de la sidra cuando ésta es inoculada con una levadura seleccionada que cuando la fermentación se lleva a cabo espontáneamente.

Para el caso de otras bebidas, Gómez-Aldapa *et al.* (2011) reportaron una inactivación lenta de cinco cepas de distintos microorganismos patógenos, incluido *Salmonella enterica* en pulque semilla a 16 °C, con pH cercano a 4 y contenido alcohólico de 6 % al momento de la inoculación, siendo un punto importante que considerar que esta bebida no cuenta con un inóculo establecido, por lo cual la

fermentación es llevada a cabo por los microorganismos naturalmente presentes en el momento de la misma.

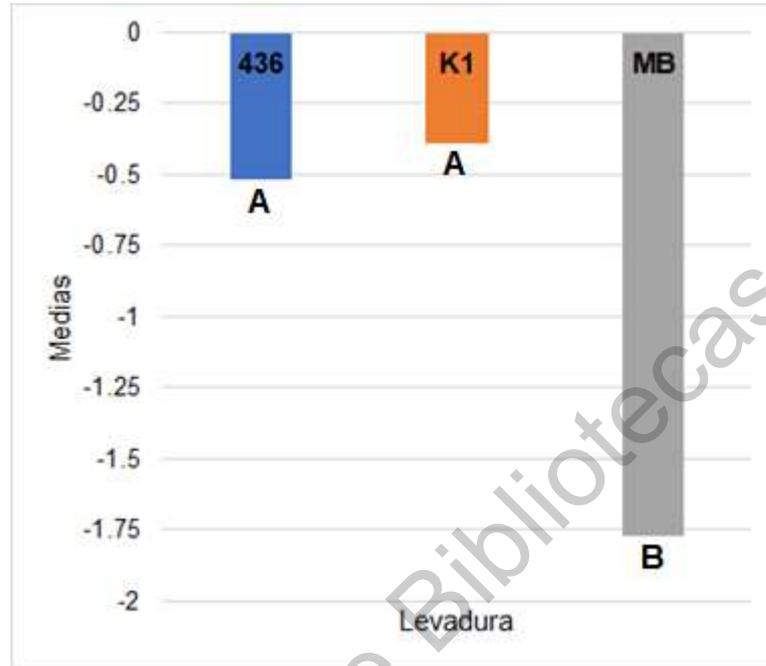


Figura 4.17. Efecto principal del factor “levadura” sobre la velocidad de inactivación de *S. enterica*

c) Adaptación de *Salmonella*

En la Figura 4.18 se observa que la adaptación previa a condiciones de estrés de *S. enterica* genera una mayor tasa de inactivación de ésta. Como es mencionado por Álvarez-Ordóñez *et al.* (2012), la exposición a distintas condiciones de acidez de *S. enterica* en la fase *log* o fase exponencial de su desarrollo, o incluso también en la fase estacionaria, aun por un corto tiempo, puede generar una tolerancia a la acidez.

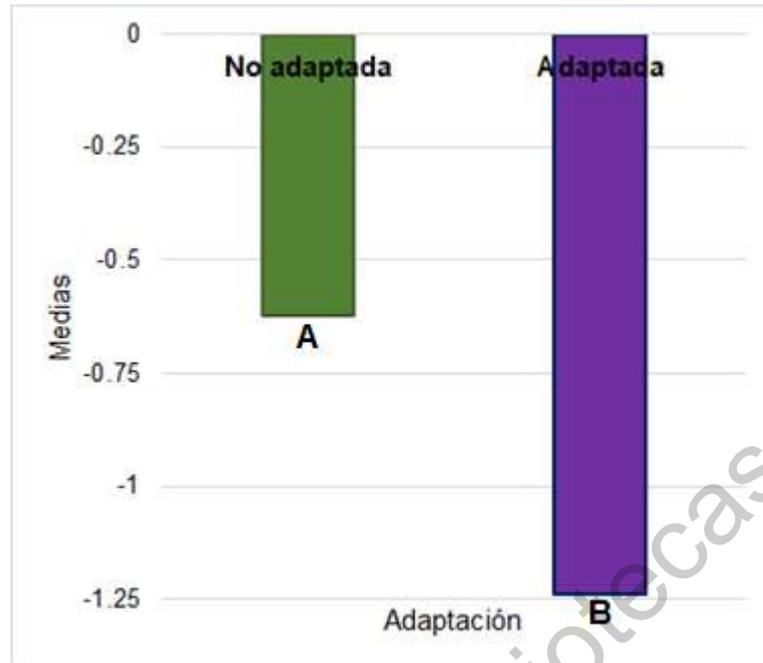


Figura 4.18. Efecto principal del factor “adaptación” sobre la velocidad de inactivación de *S. enterica*

Por otra parte, He *et al.* (2018) señalan que los mecanismos por los cuales el etanol genera resistencia cruzada a la acidez son desconocidos, sin embargo, se conoce que la respuesta a condiciones estresantes por parte de las células bacterianas es inducida por algunas proteínas de *Shock* (como las HSP o *Heat Shock Proteins*, que son proteínas de *shock* térmico, o proteínas de *shock* ácido), mismas que protegen del daño a la célula. De acuerdo con Yang *et al.* (2014), las proteínas de shock ácido pueden ser inducidas por algunos factores de transcripción, como es el caso de σS , que es codificado por el gen *rpoS*, generando protección a condiciones ácidas.

Respecto a la adaptación a etanol, los procesos por los cuales algunas bacterias, como el caso de *S. enterica* responden al estrés causado por el alcohol etílico han sido estudiados, sin embargo, se encuentran muy poco caracterizados a la fecha (He *et al.*, 2019).

Algunos estudios, como el realizado por Chiang *et al.* en 2008, donde se expusieron células de *Vibrio parahaemolyticus* a una concentración de etanol del 5 % a distintos tiempos, en presencia de otros agentes como peróxidos, ácidos orgánicos, entre otros, mostró que el procedimiento de adaptación ocasionó una disminución en la fluidez de la membrana celular, causada por un aumento en la relación de ácidos grasos

saturados, respecto a los ácidos grasos insaturados, pudiendo ser relacionado con una disminución en la permeabilidad celular causada por etanol.

En otro estudio, realizado por He *et al.* (2018), se define que las condiciones de exposición de 5 % de etanol durante 1 h son las óptimas para generar tolerancia al etanol, al menos para *S. Enteritidis*, confirmándose en el trabajo de los mismos autores en 2019, donde las células adaptadas a etanol muestran una sobrevivencia mayor a condiciones letales de concentración de etanol (15 % por 1 h), con respecto a las que no fueron sometidas a las condiciones anteriores para generar la tolerancia, mostrando además la modificación en la expresión de una cantidad considerable de proteínas relacionadas con el propio metabolismo de la bacteria (He *et al.*, 2019).

4.4.2. Interacciones de primer orden

a) *Levadura fermentativa x variedad*

En la Figura 4.19 se observa que la MB con la variedad Golden, propicia un incremento importante en la tasa de inactivación del patógeno (-3.10) en comparación con los otros casos (entre -0.38 y -0.48), lo que explica la significancia de esta interacción. Aunque esta inactivación sólo se observó en la cepa adaptada, lo cual está relacionada con la siguiente interacción que se describe.

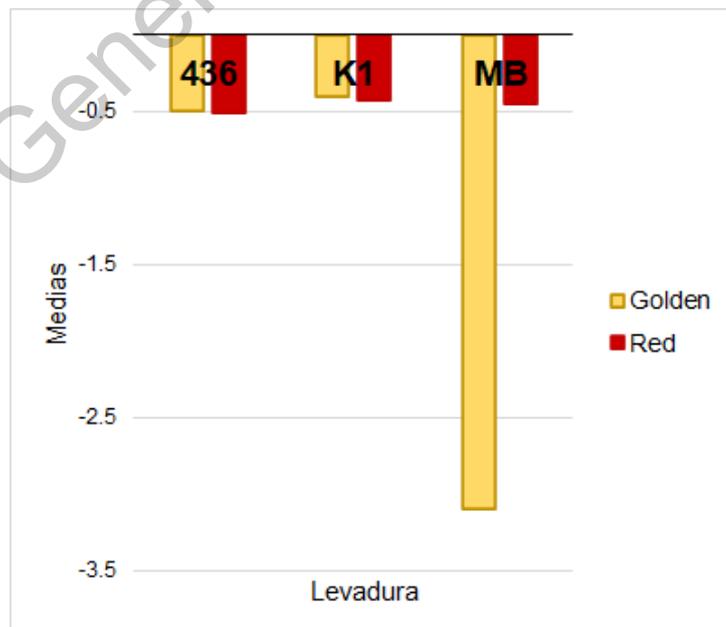


Figura 4.19. Tasa de inactivación de *S. enterica* en función de la cepa de levadura y la variedad de manzana

b) Variedad x adaptación de *Salmonella*

En la Figura 4.20 se observa que *S. enterica* adaptada en presencia de la variedad Golden muestra una tasa de inactivación mayor que en los otros casos (-2.02). Para *S. enterica* no adaptada, ésta presenta una tasa de inactivación comparable en ambas variedades (-0.47 en 'Red Delicious' y -0.65 en 'Golden Delicious').

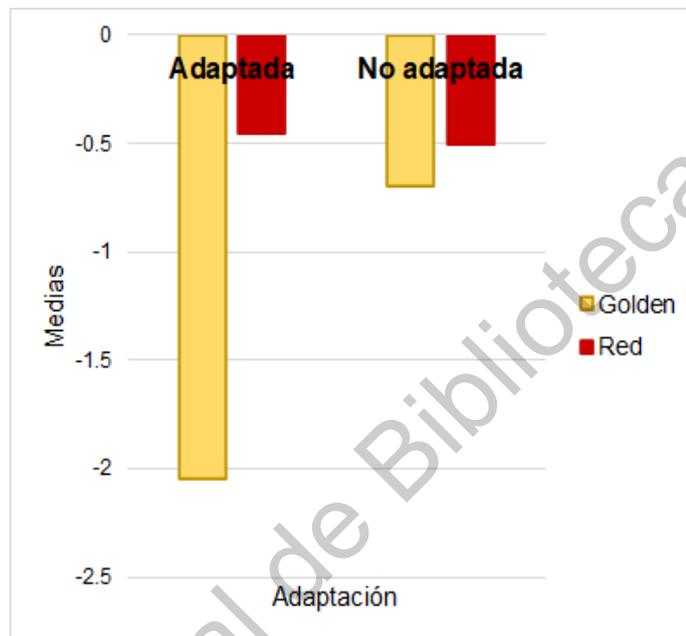


Figura 4.20. Tasa de inactivación de *S. enterica* en función de la adaptación del patógeno y la variedad de manzana

c) *Levadura fermentativa* x adaptación de *Salmonella*

Salmonella enterica adaptada presenta una mayor tasa de activación durante la fermentación de la sidra con la MB (-2.85) en comparación de cuando se encuentra en presencia de las levaduras seleccionadas (alrededor de -0.42). En el caso del coctel de cepas de *S. enterica* no adaptadas, nuevamente se obtiene la mayor tasa de inactivación con la MB, aunque con pocas diferencias con relación a las dos cepas de levadura seleccionadas (0.37 para K1, -0.61 para 436 y -0.73 para MB) (Figura 4.21).

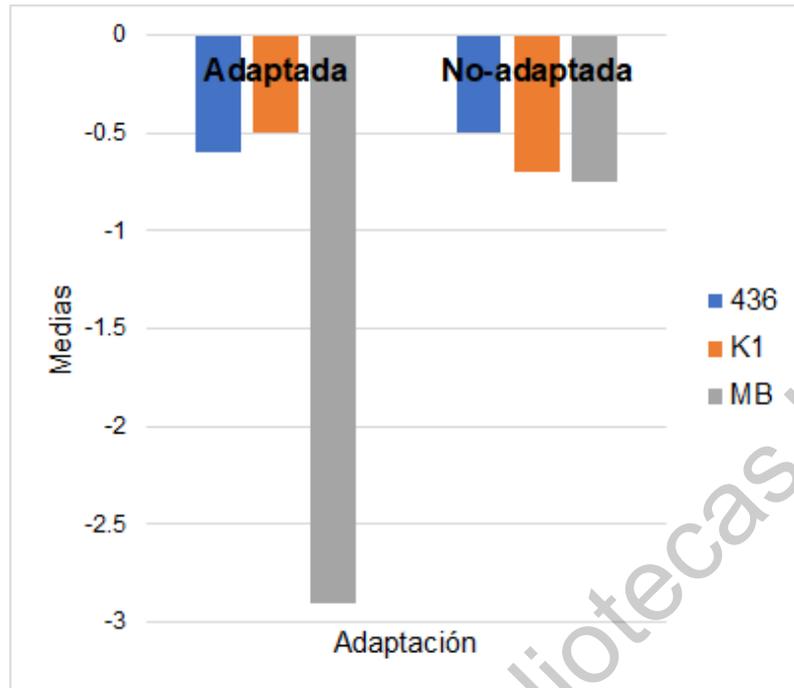


Figura 4.21. Tasa de inactivación de *Salmonella enterica* en función de la levadura y la adaptación de las cepas

4.4.3. Interacción de segundo orden

Respecto a las tasas de inactivación, recordemos que los valores negativos hacen referencia a una inactivación, siendo los valores absolutos mayores los que definen una mayor tasa de inactivación, lo cual se podría interpretar como una menor posibilidad de sobrevivencia de *S. enterica* en el proceso de elaboración de la sidra. Como se observa en la Tabla 4.3, el tratamiento en la primera fermentación que mostró la mayor tasa de inactivación fue aquel en el que la sidra se fermentó con MB, utilizando manzana ‘Golden Delicious’, y el coctel de cepas de *S. enterica* se encontraban adaptadas (-5.29). Este tratamiento fue, por lo tanto, utilizado en el siguiente experimento, en el cual se evaluó el comportamiento de las cepas de *S. enterica* de manera individual.

Tabla 4.3. Tasas de inactivación de *S. enterica* en los diferentes tratamientos de primer fermentación de sidra (interacción de segundo orden)

Variedad	Cepa de levadura	Primera fermentación	
		<i>S. enterica</i> adaptada	<i>S. enterica</i> Sin Adaptar
Red	K1	-0.34 ^{Aa}	-0.45 ^{Aa}
	436	-0.48 ^{Aa}	-0.48 ^{Aa}
	MB	-0.41 ^{Aa}	-0.51 ^{Aa}
Golden	K1	-0.51 ^{Aa}	-0.29 ^{Aa}
	436	-0.29 ^{Aa}	-0.73 ^{Aa}
	MB	-5.29 ^{Bb}	-0.95 ^{Aa}

Superíndices con letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas de manera vertical. Superíndices con letras minúsculas distintas indican diferencias significativas de manera horizontal.

En el caso de la segunda fermentación, no se observaron efectos significativos en ningún tratamiento (Tabla 4.4), por lo que no se selecciona ningún tratamiento para el experimento siguiente.

Tabla 4.4. Tasas de inactivación de *S. enterica* en los diferentes tratamientos de segunda fermentación de sidra (interacción de segundo orden)

Variedad	Cepa de levadura	Segunda fermentación	
		<i>S. enterica</i> Adaptada	<i>S. enterica</i> Sin Adaptar
Red	K1	-0.02 ^{Aa}	-0.02 ^{Aa}
	436	-0.02 ^{Aa}	-0.02 ^{Aa}
	MB	-0.02 ^{Aa}	-0.02 ^{Aa}
Golden	K1	-0.02 ^{Aa}	-0.02 ^{Aa}
	436	-0.02 ^{Aa}	-0.02 ^{Aa}
	MB	-0.02 ^{Aa}	-0.02 ^{Aa}

Superíndices con letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas de manera vertical. Superíndices con letras minúsculas distintas indican diferencias significativas de manera horizontal.

4.4. Cinética y detección de cepas individuales de *S. enterica* adaptadas a dos ácidos

Cabe recordar que para este experimento, se siguió la metodología de fermentación realizada en el experimento anterior, cambiando únicamente el procedimiento de adaptación, exponiendo individualmente a las cepas de *S. enterica* a pH de 5.55, en medios con pH ajustado con diferentes ácidos (HCl y ác. Málico), y 5% de etanol. Una vez adaptadas se inocularon en mosto de manzana y se llevó a cabo la fermentación con microbiota nativa.

4.4.1. Cinética de inactivación de cepas de *Salmonella*

a) Adaptación con ácido clorhídrico

En la Figura 4.22 se aprecia la tendencia a la inactivación de las poblaciones de *S. enterica* adaptadas con HCl, al día 4 las cepas 1 y 5 presentan concentraciones de alrededor de 2 Log UFC mL⁻¹, contrastando con 3 y 4, siendo esta última indetectable. Al día 7, ninguna de las cepas pudo ser cuantificada por el método utilizado.

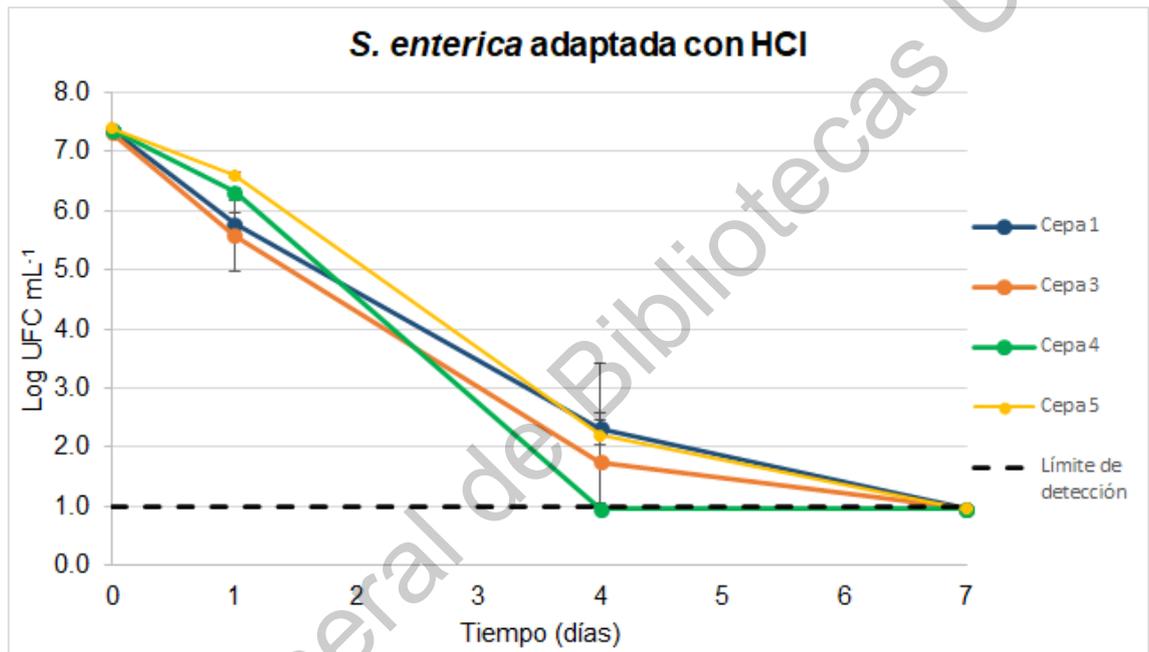


Figura 4.22. Cinética de crecimiento de poblaciones de diferentes cepas de *S. enterica* adaptadas a pH ácido con HCl y alcohol durante la fermentación realizada con mosto de manzana de 'Golden Delicious' y la microbiota nativa.

b) Adaptación con ácido málico

Como se observa en la figura 4.23, la tendencia a la inactivación en todas las cepas adaptadas con ácido málico es evidente, donde al día 4, las cepas 1, 3 y 5 muestran poblaciones entre 2 y 3 Log UFC mL⁻¹, y la cepa 4 (*S. Thompson*) se muestra por debajo del límite de detección de la técnica.

Comparando con la adaptación de las cepas con HCl, las tendencias son prácticamente las mismas, además de no presentarse una diferencia significativa en cuanto al ácido utilizado para la adaptación (Tabla 4.4).

En general, el comportamiento de las cepas de manera individual es similar en todos los casos, donde se observa que al día 4, la cepa 4 (*S. Thompson*) se encuentra

debajo del límite de detección, sin embargo al final del día 7, todas las cepas se encuentran en la misma situación. Esto, como se ha mencionado con anterioridad, puede atribuirse a la capacidad genética de adaptación de cada cepa en particular.

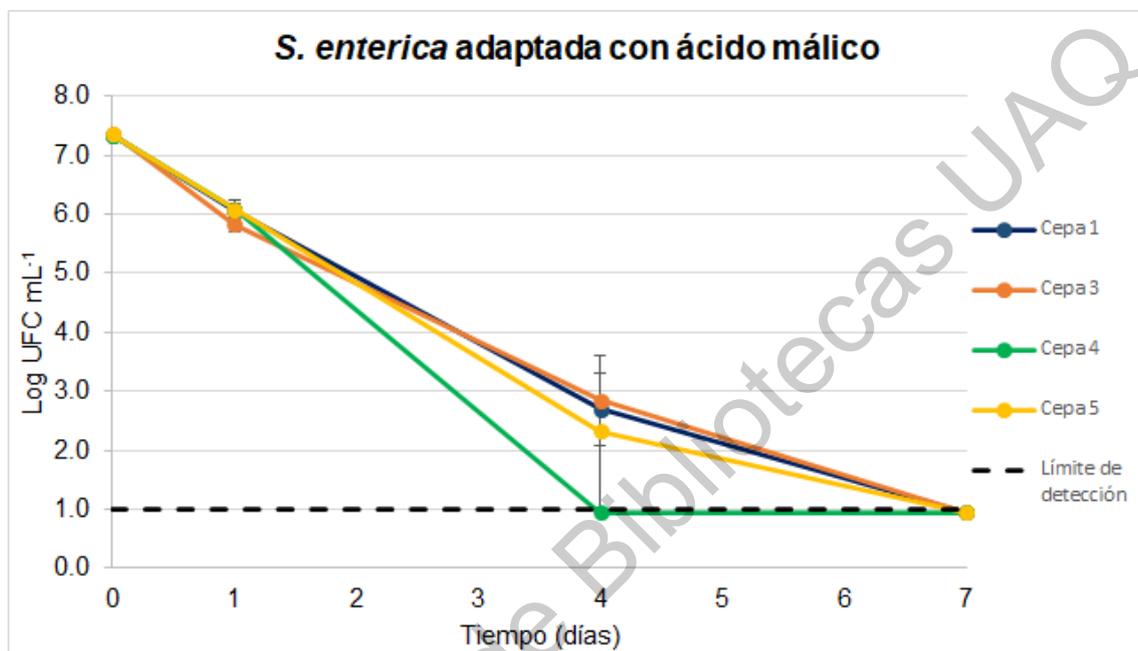


Figura 4.23. Cinética de crecimiento de poblaciones de diferentes cepas de *S. enterica* adaptadas a pH ácido con ácido málico y alcohol durante la fermentación realizada con mosto de manzana de ‘Golden Delicious’ y la microbiota nativa.

c) Cepas sin adaptar

Se advierte al día 4 que todas las cepas de *Salmonella* aún sobreviven a concentraciones que van de 3 a 4 Log UFC, y solamente al final de la fermentación (día 7) se muestran los recuentos por debajo del límite de detección.

Extrañamente, en los experimentos donde las cepas de *Salmonella* fueron adaptadas a condiciones de acidez con HCl y ácido málico, sobrevivieron menos con respecto a las no adaptadas. Particularmente la cepa 4 adaptada se encuentra debajo del límite de detección desde el día 4, lo anterior pudiera deberse al hecho de que el método de adaptación utilizado en este experimento haya sido tan agresivo que generó más daño a las células, en especial a la cepa 4, que se mostró más afectada.

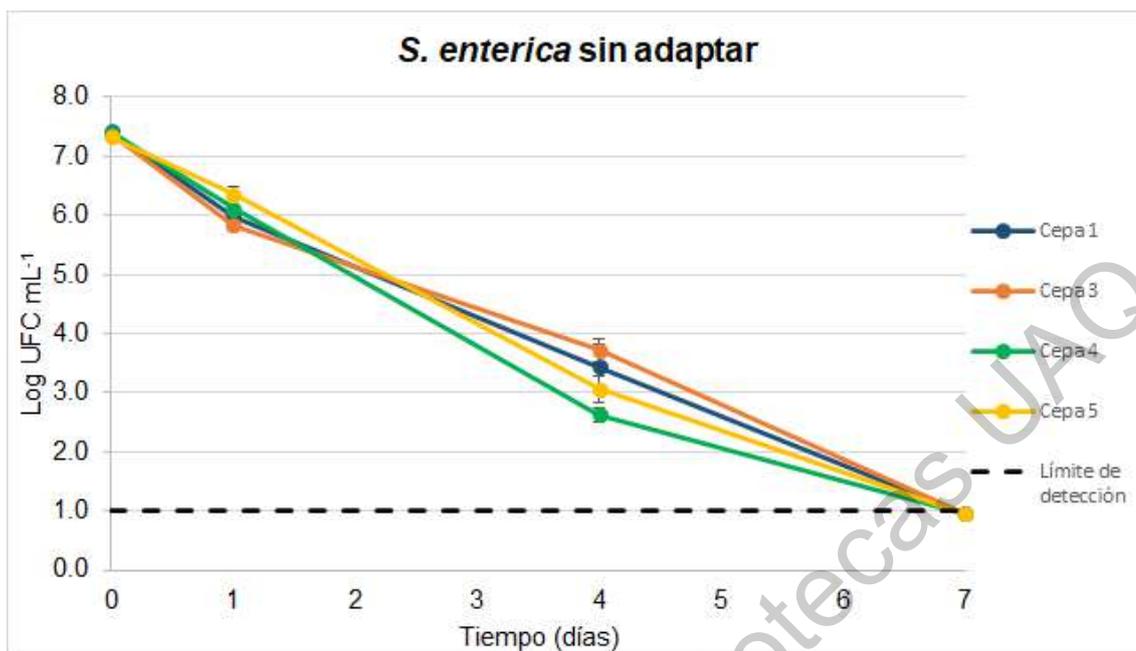


Figura 4.24. Cinética de crecimiento de poblaciones de diferentes cepas de *S. enterica* sin adaptar durante la fermentación realizada con mosto de manzana de ‘Golden Delicious’ y la microbiota nativa.

4.4.2. Tasa de inactivación

a) Análisis de varianza

En la Tabla 4.5 se observan diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el caso de los efectos principales “cepa” y “adaptación”, no así para el caso de su interacción ($P > 0.05$).

Tabla 4.5. Valores de P para los factores de estudio y sus interacciones de la tasa de inactivación en primera fermentación

Factor	Valor P
Cepa	0.027
Adaptación	0.044
Cepa x Adaptación	0.491

b) Comparación de medias

En la Tabla 4.6 se observa la separación de medias para cepas, donde sobresale la cepa 4 (*S. Thompson*) como la que presenta la mayor tasa de inactivación, contrastando con la cepa 3 (*S. Typhimurium*). Estos resultados confirman las tendencias observadas en las cinéticas de crecimiento de las cepas descritas arriba.

Tabla 4.6. Separación de medias de las tasas de inactivación de *S. enterica* en función de la cepa.

Cepa	Media
Cepa 4	-0.0405 ^b
Cepa 5	-0.0395 ^{ab}
Cepa 1	-0.0390 ^{ab}
Cepa 3	-0.0375 ^a

Superíndices con letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas de manera vertical. Superíndices con letras minúsculas distintas indican diferencias significativas de manera horizontal.

A pesar de que se observó en las gráficas una mayor sobrevivencia en las cepas sin adaptación, no se reflejó en una diferencia estadística, como se puede apreciar en la Tabla 4.7

Tabla 4.7. Separación de medias de las tasas de inactivación de *S. enterica* en función de su método de adaptación a la acidez

Adaptación	Media
HCl	-0.0397 ^a
AM	-0.0397 ^a
SA	-0.0379 ^a

Superíndices con letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas de manera vertical. Superíndices con letras minúsculas distintas indican diferencias significativas de manera horizontal.

4.4.3. Detección de las cepas

a) Primera fermentación

Recordemos que éste experimento esta detección es un análisis cualitativo, de presencia/ ausencia del microorganismo y especialmente relevante cuando la concentración de *Salmonella* fue menor al límite de detección de la cuantificación de la población. La detección de *S. enterica* al final de la fermentación fue positiva en ambos medios para todos los tratamientos de fermentación de sidra lo que indica que aun cuando los recuentos del patógeno eran $<1 \text{ Log UFC mL}^{-1}$ durante la cinética de población, existía una cantidad mínima de *S. enterica* la cual era indetectable, a causa de la sensibilidad de la técnica utilizada (extensión en superficie de placa). En la Tabla 4.8 se muestran los resultados de la detección para ésta primera fermentación. Los dos medios fueron igual de eficientes para evidenciar la presencia del patógeno.

Tabla 4.8. Detección de *S. enterica* en las distintas condiciones de la primera fermentación.

Tratamiento	Detección	
	XLD	SB
Cepa 1 HCl	+++	+++
Cepa 3 HCl	+++	+++
Cepa 4 HCl	++-	++-
Cepa 5 HCl	+++	+++
Cepa 1 AM	+++	+++
Cepa 3 AM	++-	++-
Cepa 4 AM	++-	++-
Cepa 5 AM	+++	+++
Cepa 1 SA	+++	+++
Cepa 3 SA	+++	+++
Cepa 4 SA	+++	+++
Cepa 5 SA	++-	++-
Testigo	---	---

XLD: medio Xilosa, lisina y Desoxicolato. **SB:** medio sulfito de bismuto. Datos obtenidos de tres repeticiones donde indica presencia (+) y ausencia (-) de *S. enterica* en cada repetición. Testigo: medio sin inocular.

b) Segunda fermentación

Por último, para el caso de la segunda fermentación, después de 92 d de fermentación en botella, los recuentos de población de *S. enterica* para todos los casos fueron de <1 Log UFC mL, sin embargo, en la detección realizada al final de la fermentación, al igual que en el caso de la primera fermentación, todos los tratamientos dieron positivo a presencia de *S. enterica* en una o más réplicas en ambos medios de cultivo. Estos resultados nos indican que aún después de casi 100 d expuestas a condiciones de acidez agresivas, concentraciones de etanol y presión altas, algunas células de *S. enterica* fueron capaces de sobrevivir. En la tabla 4.9 se muestran los recuentos iniciales y finales de cada tratamiento, a su vez se muestran los resultados de la detección al final de la fermentación. En esta fermentación, el medio XLD mostró un ligero mejor desempeño para la recuperación del patógeno.

Tabla 4.9. Recuentos y resultados de detección de *S. enterica* en las distintas condiciones de la segunda fermentación

Tratamiento	Recuento inicial (Media ± DE)	Recuento final (Log UFC mL ⁻¹)	Detección	
			XLD	SB
Cepa 1 HCl	7.07 ± 0.02	<1 Log UFC mL ⁻¹	+++	++-
Cepa 3 HCl	7.09 ± 0.01	<1 Log UFC mL ⁻¹	++-	++-
Cepa 4 HCl	7.11 ± 0.02	<1 Log UFC mL ⁻¹	++-	++-
Cepa 5 HCl	7.08 ± 0.03	<1 Log UFC mL ⁻¹	+++	+++
Cepa 1 AM	7.09 ± 0.03	<1 Log UFC mL ⁻¹	++-	+++
Cepa 3 AM	7.09 ± 0.02	<1 Log UFC mL ⁻¹	++-	++-
Cepa 4 AM	7.08 ± 0.01	<1 Log UFC mL ⁻¹	++-	++-
Cepa 5 AM	7.09 ± 0.01	<1 Log UFC mL ⁻¹	+++	++-
Cepa 1 SA	7.06 ± 0.01	<1 Log UFC mL ⁻¹	+++	+++
Cepa 3 SA	7.09 ± 0.03	<1 Log UFC mL ⁻¹	++-	+++
Cepa 4 SA	7.08 ± 0.02	<1 Log UFC mL ⁻¹	+++	++-
Cepa 5 SA	7.12 ± 0.01	<1 Log UFC mL ⁻¹	++-	++-
Testigo	NA	NA	---	---

XLD: medio Xilosa, Lisina y Desoxicolato. **SB:** medio sulfito de bismuto. **NA:** No aplica. Datos obtenidos de tres repeticiones donde indica presencia (+) y ausencia (-) de *S. enterica* en cada repetición.

Es importante considerar que el hecho de que se detecte la presencia de *Salmonella* en la sidra espumosa terminada puede representar un gran peligro para el consumidor, pues aun cuando los recuentos son indetectables por el método utilizado, existe la presencia de *S. enterica* en la bebida, que si bien puede ser en cantidades mínimas, se sabe que para algunos casos, en especial para las cepas expuestas a estrés subletal, las dosis infectantes de *S. enterica* pueden ser de incluso 20 células (FDA, 2009). También hay que considerar que la cantidad de *Salmonella* inoculada es muy elevada en contraste con las concentraciones que podrían presentarse en una contaminación natural. Es poco probable que una concentración de esa magnitud ocurra. Si se estima la diferencia entre la concentración inoculada y la sobreviviente, se tiene una reducción a causa del proceso de al menos 6 Log UFC, lo cual cubre lo requerido por FDA (reducción de 5 Log UFC) para considerarlo seguro.

Si bien las morfologías observadas tanto en la primera como la segunda fermentación fueron morfologías atípicas para el caso del medio XLD, coinciden con lo reportado en el BAM a la fecha como “morfología atípica de *S. enterica*” en el mismo medio selectivo, caso contrario a lo encontrado en el medio SB, donde las morfologías fueron las típicas para *S. enterica*.

V. CONCLUSIONES

Capacidad de sobrevivencia/desarrollo de *Salmonella enterica* durante la elaboración de la sidra.

- *Salmonella enterica* es capaz de sobrevivir durante la primera fermentación de la sidra en presencia de la microbiota nativa, pero no de una levadura seleccionada comercial (Fermentis SafAle® S-04).
- *Salmonella enterica* no sobrevive a la segunda fermentación en la botella, que podría atribuirse al efecto de la presión interna, sugiriendo un estudio más profundo respecto a dicho efecto.

Adaptación de cepas de *Salmonella enterica* a condiciones de pH y concentración de etanol similares a las de la sidra

- La capacidad de adaptación de *S. enterica* a condiciones de estrés varía en función de la cepa.
- La suma de condiciones estresantes al medio propicia que la población de *S. enterica* disminuya.

Cinética poblacional del coctel de cepas de *Salmonella enterica* adaptadas y sin adaptar durante la fermentación

- La variedad de manzana afecta la sobrevivencia de *S. enterica* durante la fermentación.
- Las condiciones que se presentan durante la segunda fermentación, entre ellas, la presión interna que se genera en la botella, producto de la liberación de CO₂ por la levadura propicia una inactivación pronunciada de 6-7 Log UFC.

Cinética y detección de cepas individuales de *Salmonella enterica*

- Las condiciones de pH, grado alcohólico y presión interna, así como los tiempos de fermentación del experimento no son suficientes para inactivar en su totalidad a *S. enterica*, ya que se detectó su presencia al final de ambas fermentaciones, por medio de una prueba cualitativa, sin embargo, si logra la reducción establecida en la FDA (inactivar más de 5 Log UFC).
- El presente trabajo puede establecer una guía para futuras investigaciones en el área, donde se sugiere profundizar en la influencia de otros aspectos de la fermentación sobre la inocuidad del producto, como la selección de bacterias ácido-lácticas (BAL), además de cómo los diferentes perfiles bioquímicos influyen en la sobrevivencia de otros patógenos presentes en las bebidas fermentadas producidas de manera artesanal, como la sidra.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez-Ordóñez, A.; Prieto, M.; Bernardo, A.; Hill, C. and López, M. (2012). The Acid Tolerance Response of *Salmonella spp.*: An adaptive strategy to survive in stressful environments prevailing in foods and the host. *Food Research International*, 45, 482-492.
- Arvizu-Medrano, S. M. y Escartín, E. F. (2005). Effect of acid shock with hydrochloric, citric and lactic acids on the survival and growth of *Salmonella Typhi* and *Salmonella Typhimurium* in acidified media. *Journal of Food Protection*, 68, 2047–2053.
- Bacon, R. T.; Sofos, J. N.; Kendall, P. A.; Belk K. E. and Smith, G. C. (2003). Comparative analysis of acid resistance between susceptible and multi-antimicrobial resistant *Salmonella* strains cultured under stationary-phase acid tolerance inducing and non-inducing conditions. *Journal of Food Protection*, 66, 732–740.
- Bartowsky, E. and Henschke, P. (2008). Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine—A review. *International Journal of Food Microbiology* 125(1): 60-70.
- Baugher, T. (2003). *Concise encyclopedia of temperate tree fruit*. Ed. Food Products Press. New York, USA. Pp. 3-80
- Belrose. (2012). *World apple review*. Ed. Belrose, Inc., Pullman. USA: 149 p.
- Caeliacerea.blogspot.com. (2015). Ingredientes (IV). La levadura. [online]: <http://caeliacerea.blogspot.com/2015/04/ingredientes-iv-la-levadura.html>. Consultado en enero de 2019
- Cárdenas, J. y Fischer, G. (2013). Clasificación botánica y morfología de manzano, peral, duraznero y ciruelo. *In: Miranda, D.; Fischer, G.; Carranza, C. (eds). Los frutales caducifolios en Colombia: Situación actual, sistemas de cultivo y plan de desarrollo*. Ed. Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas p.24-25.
- Casadei, M.A.; Ingram, R.; Hitchings, J.; Archer, J. and Gaze, J. E. (2001). Heat resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus*

delbrueckii in relation to pH and ethanol. *International Journal of Food Microbiology*, 63 (1-2), 125-134.

Casas-Acevedo, A.; Aguilar-González, C.; De la Garza-Toledo, H.; Morlett-Chávez, J.; Montet, D. y Rodríguez-Herrera, R. (2015). Importancia de las levaduras no *Saccharomyces* durante la fermentación de bebidas alcohólicas. *Investigación y Ciencia* 23 (65): 73-79.

Casierra-Posada, F.; Hernández, D.; Lüdders, P. y Ebert, G. (2003). Crecimiento de frutos y ramas de manzano 'Anna' (*Malus domestica* Borkh) cultivado en los altiplanos colombianos. *Agronomía Colombiana* 21 (1-2): 69-73.

Cerveceros Caseros. (2015). Banco de levaduras- Art. 2 Placas de Agar. [online]. Consultado en enero de 2019, en: <http://www.cerveceroscaseros.com.uy/site/banco-de-levaduras-art-2-placas-de-agar/?v=0b98720dcb2c>

Cerveza Artesanal. (s.f.). Diferencias entre las levaduras seca y líquida. [online]. Consultado en enero de 2019, en: <https://www.cerveza-artesanal.co/diferencias-entre-las-levaduras-seca-y-liquida/>

Chen, C.; Lu, Y.; Yu, H.; Chen, Z. and Tian, H. (2019). Influence of 4 lactic acid bacteria on the flavor profile of fermented apple juice. *Food Bioscience* 27: 30-36.

Chiang, M.L.; Ho, W.L. and Chou, C.C. (2008). Ethanol shock changes the fatty acid profile and survival behavior of *Vibrio parahaemolyticus* in various stress conditions. *Food Microbiology*, 25(2):359–365. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.10.002>.

Cody, S.; Glynn, M.; Farrar, J.; Cairns, K.; Griffin, P.; Kobayashi, J. and Vugia, D. (1999). An Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infection from Unpasteurized Commercial Apple Juice. *Annals of Internal Medicine* 130(3): pp.202-209.

- Coque, M., Díaz, M. y García, J. (2012). El cultivo del manzano: Variedades de sidra y de mesa. Ed. Mundi-Pren. Madrid, España: pp 11-13.
- Cousin, F.; Le Guellec, R.; Schlüsselhuber, M.; Dalmasso, M.; Laplace, J. and Cretenet, M. (2017). Microorganisms in Fermented Apple Beverages: Current Knowledge and Future Directions. *Microorganisms* 5(3). p. 39.
- Diels, A. M. J and Michiels, C. W. (2006). High-Pressure Homogenization as a Non-Thermal Technique for the Inactivation of Microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*, 32(4), 201–216.
- Diputación Foral de Bizkaia. (2017). Estados fenológicos. [online]. Consultado en febrero de 2019, en: http://www.bizkaia.eus/home2/Temas/DetalleTema.asp?Idioma=CA&Tem_Codig o=2575
- Doménech, F.; Michelena, G.; Luis-García, J.; Mansur, M. y Peña, Miguel. (1992). Selección de cepas de levaduras para procesos continuos de fermentación alcohólica. *ICIDCA Sobre los derivados*. 52- 56.
- Domínguez, M. (2008). Estudio de la variabilidad morfológica en el banco nacional de germoplasma de manzano. [online]. Consultado en febrero de 2019, en: http://digital.csic.es/bitstream/10261/16616/1/DominguezM_ProjFinCarr_2008.pdf
- E. coli Food Poisoning. (2010). Baugher's Apple Cider E. coli Outbreak | E. coli Food Poisoning. [online]. Consultado en marzo de 2019, en: https://about-ecoli.com/ecoli_outbreaks/baughters-apple-cider-e.-coli-outbreak.
- Elika, Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. (2013). Salmonella (online). Consultado en agosto de 2020, en: http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento82/1.Salmonella.pdf
- Fábregas, R. J. (1969). Cultivo del manzano, Ed. Sintés, Barcelona, España. pp. 5-7,180-191.

- FDA. (2009). Update on pistachio product recall. <https://www.fda.gov/Safety/Recalls/MajorProductRecalls/Pistachio/Update/default.htm> Consultado en septiembre de 2020.
- FDA. (2019). Salmonellosis (Online). <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/salmonella-salmonellosis> Consultado en agosto de 2020.
- FDA. (2020). Bacteriological Analytical Manual, 8a Ed. (1998). Capítulo 5. Apartado 19, inciso D 1-11. Fecha de consulta: marzo de 2020, en: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella>. Andrews, W. H.; Wang, H., Jacobson, A.; Ge, B.; Zhang, G. and Hammack, T.
- Feldmann, H. (2012). Yeast: Molecular and Cell Biology: Second Ed Wiley-VCH. Weinheim, Germany. <https://doi.org/10.1002/9783527659180>
- Fernández-Montes, M. R.; Parra-Quezada, R. A.; Pérez-González, S.; Vera-Morales, J. M. y Zacatenco-González, M. G. (2010). Variedades de manzana recomendadas para las serranías de Hidalgo y Querétaro. México. Centro de Investigación Regional Centro. INIFAP. Folleto Técnico No. 1. p. 36
- Fernández-Pérez, R.; Torres, C.; Sanz, S. and Ruiz-Larrea, F. (2010). Strain typing of acetic acid bacteria responsible for vinegar production by the submerged elaboration method. *Food Microbiology*, 27(8): 973-978.
- Figuroa, I.M. y Verdugo, A. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella sp.* *Microbiología*. 47(1-2):25-42.
- Flanzy, C. (2003). *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. 2ª Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España: 783 p.
- Flores Lui, L. F.; Calzada Roviroso, J. E.; Narváez Narváez, J. A.; Aguilar Castillo, R.; Romero Celis, M. y López Sánchez, M. (2017). *Agenda Técnica Agrícola Querétaro*. Ed. Inifap (5): 74-105
- Gómez-Aldapa, C. A.; Díaz-Cruz, C. A.; Villarruel-López, A.; Torres-Vitela, M.; Añorve-Morga, J.; Rangel-Vargas, E.; Cerna-Cortes, J.; Viguera-Ramírez, J. and Castro-Rosas, J. (2011). Behavior of *Salmonella* Typhimurium,

Staphylococcus aureus, *Listeria monocytogenes*, and *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* during Production of Pulque, a Traditional Mexican Beverage. *Journal of Food Protection*; 74 (4): 580–587. Doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-382>

Gómez-Aldapa, C. A.; Díaz-Cruz, C. A.; Villarruel-López, A.; Torres-Vitela, M.; Rangel-Vargas, E. and Castro-Rosas, J. (2012). Acid and alcohol tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 in pulque, a typical Mexican beverage. *International Journal of Food Microbiology*, 154 (1-2), pp. 79-84. Doi <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-382>

González-Horta, A. C.; Fernández-Montes, M.R.; Rumayor-Flores, A.; Castaño-Tostado, E. y Martínez-Peniche, R.A. (2005). Diversidad genética en poblaciones de manzano en Querétaro, México revelada por marcadores RAPD. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28 (2), pp. 83-91.

González-López, C.; Martínez-Peniche, R.; Hernández-Iturriaga, M. and Arvizu-Medrano, S. (2018). Attachment and colonization of *Salmonella* on ‘Rayada’, ‘Golden Delicious’, and ‘Red Delicious’ apples. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(3), pp.1166-1171.

Gustorotondo. (2018). Differenze tra metodo Charmat e metodo Classico | Gustorotondo.it. [online]. <https://www.gustorotondo.it/differenze-tra-metodo-charmat-e-metodo-classico/>. Consultado en abril de 2019.

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.

Hancock, J.; Luby, J.; Brown, S. and Lobos, G. (2008). Apples. *In*: J. F. Hancock (Eds.), *Temperate Fruit Crop Breeding: Germplasm to Genomics*. Springer Science Business Media B.V., New York, NY: 1-37 pp.

Harris, S.; Robinson, J. and Juniper, B. (2002). Genetic Clues to the Origin of the Apple. *Trends in genetics*: 18(8): 426–30.

- He, S.; Cui, Y.; Qin, X.; Zhang, F.; Shi, C.; Paoli, G.C. and Shi, X. (2018). Influence of ethanol adaptation on *Salmonella enterica* serovar Enteritidis survival in acidic environments and expression of acid tolerance-related genes. *Food Microbiology* 72: 193-198.
- He, S.; Qin, X.; Wong, C. W. Y.; Shi, C.; Wang, S. and Shi, X. (2019). Global proteomic and mutagenic analyses reveal ethanol adaptation strategies in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Applied and Environmental Microbiology*. 85(19): doi:10.1128/aem.01107-19
- Heikefelt, C. (2011). Chemical and sensory analyses of juice, cider and vinegar produced from different apple cultivars. Department of Plant Breeding and Biotechnology. [online].
http://innovativadrycker.slu.se/Centrum_for_innovativa_drycker/Dokumentation/heikefelt_c_110415.pdf Consultado en marzo de 2019.
- Herrero, M.; Laca, A.; García, L. and Díaz, M. (2001). Controlled malolactic fermentation in cider using *Oenococcus oeni* immobilized in alginate beads and comparison with free cell fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 28(1): 35-41.
- Hidalgo, T. (2002). Tratado de Enología Tomo 2. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España: 258 p.
- Hubert, J. (1999). Texte du montage audiovisuel sur la fabrication du cidre. Ed. Ecomusée du Pays de Rennes. Rennes, Francia : 1926 p.
- Infovisual. (s.f.). Biología Vegetal. Pomos carnosos. [online].: <https://infovisual.info/es/biologia-vegetal/pomos-carnosos>. Consultado en marzo de 2019.
- Jackson, D. and J. Palmer. (1999). Pome fruits. pp. 189-202. *In*: Jackson, D.I. y N.E. Looney (eds.). Temperate and subtropical fruit production. 2a ed. CABI Publishing, Wallingford, UK.

- Jarvis, B. (2014). Cider (Cyder; Hard Cider). In *Encyclopedia of Food Microbiology* (p. vol 1 pp 437 – 443). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00066-5>
- Joshi V.K. and Sharma S. (2009) Cider Vinegar: Microbiology, Technology and Quality. In: Solieri L., Giudici P. (eds) *Vinegars of the World*. Ed. Springer, Milano, Italia. pp: 197-207.
- Juniper, B. E.; Watkins, R. and Harris, S. A. (1998). The origin of the apple. *Acta Horticulturae*, 484, 27–33.
- Kaspar, C. W. and Tamplin, M. L. (1993). Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Applied and environmental microbiology* 59(8): 2425–2429.
- Kim, S. A.; Kim, N. H.; Lee, S. H.; Hwang, I. G. and Rhee, M. S. R. (2014) Survival of Foodborne Pathogenic Bacteria (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes*) and *Bacillus cereus* Spores in Fermented Alcoholic Beverages (Beer and Refined Rice Wine). *J Food Prot* 1; 77 (3): 419–426. doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-234>
- Lallemand Brewing. (2014). Lalvin V1116: Fresh fruit white wines. Retrieved from https://www.lallemandbrewing.com/docs/products/tds/TDS_LALVIN_V1116_ENG_DIGITAL.pdf
- León-Teutli, A. K.; Hernández-Iturriaga, M.; Miranda-Castilleja, D.E.; Aldrete-Tapia, J.A.; Soto-Muñoz, L. and Martínez-Peniche, R.A. (2020). Selection of native yeasts for the production of sparkling ciders from apple varieties established in Querétaro, Mexico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 26 p29-47.
- Liu, S.Q.; Aung, M. T.; Lee, P. R. and Yu, B. (2015). Yeast and volatile evolution in cider co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Williopsis saturnus*. *Annals of Microbiology* 66(1), 307–315. doi:10.1007/s13213-015-1110-5.
- Mancera-López, M., Soto-Parra, J., Sánchez-Chávez, E., Yañez-Muñoz, R., Montes-Domínguez, F., y Baladrán-Quintana, R. (2018). Caracterización mineral de

manzana ‘Red Delicious’ y ‘Golden Delicious’ de dos países productores. *TECNOCENCIA Chihuahua*, 1(2), 6-17. Recuperado a partir de <https://148.229.0.27/index.php/tecnociencia/article/view/42>

- Mangas-Alonso, J. J.; Díaz-Llorente, D.; Botas-Velasco, C.; Blanco-Gomis, D.; Dueñas-Chasco, M. T.; Herrero, M. y García, L. (2010). Tecnología de la producción de sidra. Equipamiento industrial. *In*: D. Blanco & J. Mangas (eds.), *La manzana y la sidra: bioprocesos, tecnologías de elaboración y control*. Ed. Astugraf. Asturias, España: p. 12-221.
- 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
- Mari, A.; Tedesco, I.; Nappo, A.; Russo, G. L.; Malorni, A. and Carbone, V. (2010). Phenolic compound characterisation and antiproliferative activity of “Annurca” apple, a southern Italian cultivar. *Food Chemistry*, 123(1), 157–164. doi:10.1016/j.foodchem.2010.04.023
- McClelland, M.; Sanderson, K.; Spieth, J. *et al.* (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413, 852–856. <https://doi.org/10.1038/35101614>
- Mendoza López, A; Kushad, M; Zavala Del Ángel, I. y Martínez-Peniche, R. 2006. Efecto del número de frutos por racimo y fecha de corte en la calidad de manzana ‘Rayada’. *Revista Fitotecnia Mexicana (Nº 2 Especial)*: 45 50.
- Menz, G., F. Vriesekoop, M. Zarei, B. Zhu, and P. Aldred. 2010. The growth and survival of food-borne pathogens in sweet and fermenting brewers’ wort. *International Journal of Food Microbiology* 140:19–25.
- Millard, P. (1994). An Outbreak of Cryptosporidiosis from Fresh-Pressed Apple Cider. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 272(20): 1592.

- Miranda-Castilleja, D.; Martínez-Peniche, R.; Nadal Roquet-Jalmar, M.; Aldrete-Tapia, J. and Arvizu-Medrano, S. (2018). Enological Qualities and Interactions Between Native Yeast and Lactic Acid Bacteria from Queretaro, Mexico. *Journal of Food Science* 83(7): 1904-1912.
- Montoya, H. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. 2ª Ed. Universidad de Antioquia. Antioquia, Colombia. 160 p.
- NORS CDC. (2020). National Outbreak Reporting System (NORS) | CDC. [online] Consultado en julio de 2020, en: <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>.
- OIV. (2011). *Compendium of international Methods of Wine and must Analysis*. International Organization of vine and wine. [online]. Consultado en marzo de 2019, en: <https://doi.org/ISBN Volume I: 979-10-91799-65-2>
- OIV. (2016). *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts* (2 vol.). Paris. [online]. Consultado en marzo de 2019, en: <http://www.oiv.int/public/medias /2628/compendium-bs-2014- en-file-complet-pdf.pdf>
- OIV. (2017). *Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts* (2 vol.). [online]. Consultado en marzo de 2019, en: <http://www.oiv.int/public/medias/2628/ compendium-bs-2014-en-file- complet-pdf.pdf>
- Pando-Bedriñana, R.; Querol-Simón, A. and Suárez-Valles, B. (2010). Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. *Food Microbiology* 27(4), 503–508.
- Ramírez, R., Abbott, D. y Benavides, A. (2002). *Fisiología y manejo del manzano* 1ª Ed. Universidad Agraria Antonio Narro. Saltillo, México: 44-45 pp.
- Rao, A. K. Rao; Walters, M.; Hall, J.; Guymon, C.; Garden, R.; Sturdy, P.; Thurston, D.; Smith, L.; Dimond, M.; Vitek, D.; Bogdanow, L.; Hill, M.; Lin, N.H.; Luquez, C. and Griffin, P. M. (2018). Outbreak of Botulism Due to Illicit Prison-Brewed Alcohol: Public Health Response to a Serious and Recurrent

Problem, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 66, Issue suppl_1, 15 January 2018, Pages S85–S91, <https://doi.org/10.1093/cid/cix936>

SAGARPA (2017). Planeación Agrícola Nacional 2017-2030 (Vol. I). Manzana Mexicana. [online]. Consultado en abril de 2019, en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/255627/Planeaci_n_Agr cola_Nacional_2017-2030-_parte_uno.pdf

Sánchez, A.; Rodríguez, R.; Coton, M.; Coton, E.; Herrero, M.; García, L. and Díaz, M. (2010). Population dynamics of lactic acid bacteria during spontaneous malolactic fermentation in industrial cider. *Food Research International* 43(8): 2101-2107.

Sánchez-Maldonado, A.F.; Schieber, A. and Gänzle, M.G. (2011). Structure–function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 111 (1):1176-1184. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05141.x

Semanchek, J.J and Golden, D.A. (1996). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during Fermentation of Apple Cider. *Journal of Food Protection* 59 (12): 1256-1259.

SIAP. (2019a). Avance de siembras y cosechas, resumen por estado. Consultado en julio del 2020, en: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do

SIAP. (2019b). Atlas Agroalimentario 2019. Consultado en marzo del 2020 en: https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2019/Atlas-Agroalimentario-2019

Soto-Herrera, J.; Castillo-Castañeda, E. y Martínez Peniche, R. (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.

Strawn, L. K. and Danyluk, M. D. (2010). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella spp.* on fresh and frozen cut mangoes and papayas. *International Journal of Food Microbiology*, 138(1–2), 78–84.

- Suárez-Machín, C.; Garrido-Carralero, N. A. y Guevara-Rodríguez, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 50 (1): 20-28
- Suárez-Valles, B.; Pando-Bedriñana, R.; Lastra-Queipo, A. and Mangas-Alonso, J. (2008). Screening of cider yeasts for sparkling cider production (Champenoise method). Food Microbiology 25(5): 690-697.
- FAO. (2018). FAO: Países del mundo productores de manzana en 2018. Consultado en julio de 2020, en: <https://blogagricultura.com/paises-productores-manzana-2018/>
- Xiong, Z. R.; Chen, A.; Jiang, G. Z.; Lewis, A. G.; Sislak, C. D.; Worobo, R. W.; Gibney, P. A. (2020). Evaluation of Foodborne Pathogen Die-off in Back-sweetened Wine and Hard Cider Models. En K. Kniel (Presidencia). IAFP. Congreso Virtual.
- Vojdani, J.; Beuchat, L. and Tauxe, R. (2007). Juice-Associated Outbreaks of Human Illness in the United States, 1995 through 2005. Journal of Food Protection 71(2): 356-364.