



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Aislamiento y selección de bacterias lácticas para la elaboración de sidra tranquila
en Querétaro, México**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

PRESENTA

IQ. Paola Zahutli Pérez Olvera

DIRIGIDO POR

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Santiago de Querétaro, Querétaro, 2022



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

**Aislamiento y selección de bacterias lácticas para la elaboración de sidra tranquila
en Querétaro, México**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestría en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Presenta:

I.Q. Paola Zahutli Pérez Olvera

Dirigido por:

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Presidente

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar

Secretario

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

Vocal

Dra. Dalia Elizabeth Miranda Castilleja

Suplente

Mtra. Aymara Judith Diaz Barrita

Suplente

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Directora de la Facultad de Química

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

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
2022

DEDICATORIA

A mis padres, abuelos y hermanas
Al Dr. Ramón Álvar Martínez Peniche

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para llevar a cabo este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por las facilidades otorgadas para realizar este proyecto.

Al laboratorio de Fermentaciones de la Facultad de Química por permitirme el uso de sus instalaciones, equipo y materiales para la realización de este proyecto.

Al Dr. Ramón Álvar Martínez Peniche que con sus enseñanzas dejó un legado invaluable. Quién me guió, orientó y confió en mí para llevar a cabo este proyecto.

A la Dra. Sofía por recibirme en su equipo de trabajo, orientarme y otorgarme todas las facilidades para culminar este proyecto.

A la Dra. Dalia por estar siempre presente, por aconsejarme, guiarme y compartirme de su experiencia para enriquecer más mi proyecto.

A mis sinodales por el tiempo dedicado a la revisión y aporte de ideas a este proyecto.

A mis padres, abuelos y hermanas por su incondicional apoyo y cariño, toda mi admiración y respeto siempre hacia ustedes.

A mi tío Fortino Olvera por cuidarme y procurarme mientras me encontraba lejos de casa.

A mi familia foránea Rebe, Jaquie, Abi, Alexis y Diego quienes estuvieron conmigo a lo largo de este camino, por regalarme todas esas lindas y gratas experiencias. Hicieron todo este proceso mucho más fácil.

A Julio César por su cariño e invaluable apoyo. Por estar siempre presente, por sus consejos y por las enseñanzas de vida.

RESUMEN

En el estado de Querétaro se encuentran zonas favorables para el cultivo del manzano. Al no cumplir estándares para una buena comercialización en fresco, se plantea la alternativa de elaborar sidra, siendo ésta objeto de estudios anteriores que han permitido obtener cepas seleccionadas de levaduras nativas. Sin embargo, se desconoce la presencia de manera espontánea y el efecto que pudieran tener bacterias ácido lácticas (BAL) seleccionadas en esta bebida. El objetivo de este trabajo fue aislar y seleccionar BAL con base en la tolerancia al medio fermentativo, compatibilidad con levaduras seleccionadas e incapacidad para sintetizar aminos biogénicos (AB) para la elaboración de sidras tranquilas en Querétaro. Para lo cual, se indujo la fermentación espontánea del mosto de 3 variedades de manzana ('Golden delicious', 'Red delicious' y '428'), durante las cuales se obtuvieron 120 cepas, que fueron diferenciadas mediante pruebas de catalasa y tinción Gram, encontrando únicamente 5 catalogadas como BAL. Por ello, se incluyeron en el estudio 84 cepas aisladas de ambientes enológicos. De las 89 BAL sometidas a pruebas de selección, 86 fueron capaces de desarrollar con 8% de etanol y 50 mg/L de SO₂ y únicamente 6 de estas cepas (VC32, 18, CU15, VC69, FE145 y VA2), mostraron el mayor desarrollo (DO₆₀₀) al utilizar el medio producido por las levaduras nativas MM7 y RY5 como su medio de cultivo. Ninguna de estas 6 cepas demostró capacidad de sintetizar AB. Dos de ellas FE145 y VA2 fueron las que obtuvieron una mayor eficiencia fermentativa y las que se emplearon para ser inoculadas en el proceso de elaboración de sidra tranquila. Finalmente, la evaluación sensorial de estas sidras, marcó una notable preferencia hacia las sidras inoculadas con estas cepas, demostrando así la influencia positiva de la fermentación maloláctica (FML) en la elaboración de esta bebida fermentada.

Palabras clave: sidra tranquila, bacterias ácido lácticas, cepas nativas, fermentación espontánea, eficiencia fermentativa

SUMMARY

In the state of Queretaro there are suitable areas for apple farming. However, since good fresh marketing standards are not well achieved, the alternative of making cider is proposed, this being the object of previous studies that had led to the selection of native yeasts strains. Nevertheless, the spontaneous presence and effect that selected lactic acid bacteria (LAB) might have in this drink is still unknown. Thus, the present study aims to isolate and select LAB based on tolerance, compatibility with previously selected yeasts and inability to synthesize biogenic amines (BA), for the production of still ciders in Queretaro. For which, the spontaneous fermentation of musts of 3 apple varieties ('Golden delicious', 'Red delicious' and '428') was induced, during which 120 strains were obtained. They were differentiated by means of catalase tests and Gram staining, finding only 5 cataloged as LAB. Therefore, 84 strains isolated from enological environments were included in the study. From the 89 LAB subjected to selection tests, 86 were able to grow with 8% ethanol and 50 mg/L SO₂, evaluated by the kinetics obtained through the measurement of optical density increase (OD₆₀₀) by using the medium produced by the native yeasts MM7 and RY5 as their culture medium. None of these 6 strains demonstrated the ability to synthesize BA. Two of them (FE145 and VA2) showed highest fermentation efficiency and the ones that were used to be inoculated in the still cider production process. Finally, the sensory evaluation of these ciders showed a notable preference for ciders inoculated with these strains, thus demonstrating the positive influence of malolactic fermentation (MLF) in the production of this fermented beverage

Key words: still cider, lactic acid bacteria, native strains, spontaneous fermentation, fermentative efficiency

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. EL MANZANO	3
2.1.1. Origen y antecedentes	3
2.1.2. Importancia	3
2.1.3. Botánica.....	5
2.1.4. Composición del fruto.....	8
2.2. LA SIDRA.....	9
2.2.1. Definición.....	9
2.2.2. Composición y valor nutritivo	9
2.2.3. Tipos de sidra	10
2.2.4. Proceso de elaboración de sidra	11
2.2.5. Tipos de Fermentaciones en la producción de sidra	13
2.3. LEVADURAS FERMENTATIVAS.....	15
2.3.1. Generalidades	15
2.3.2. Levaduras presentes en mosto de manzana y sidra	15
2.4. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL).....	16
2.4.1. Características generales	16
2.4.2. Relevancia en bebidas fermentadas	17
2.4.3. Criterios de selección	18
III. OBJETIVOS.....	22
IV. METODOLOGÍA	23
4.1. SITIO EXPERIMENTAL.....	23
4.2. MATERIAL BIOLÓGICO.....	23
MANZANAS.....	23
4.3. AISLAMIENTO DE BAL	24

4.4.	PREPARACIÓN DE INÓCULOS	25
4.5.	PRUEBAS DE SELECCIÓN DE LAS CEPAS DE BAL.....	25
4.5.1.	Tolerancia a etanol y sulfitado	26
4.5.2.	Pruebas de interacción levadura-bacteria.....	26
4.5.3.	Eficiencia fermentativa de BAL seleccionadas en medio sintético	27
4.5.4.	Determinación de la producción de aminas biogénicas en BAL seleccionadas	28
4.6.	ELABORACIÓN DE SIDRA.....	29
4.7.	ANÁLISIS FÍSICOS Y QUÍMICOS DE LA SIDRA	30
4.7.1.	Densidad.....	30
4.7.2.	Medición de pH.....	30
4.7.3.	Anhídrido sulfuroso libre, total y combinado (Método de Ripper)	30
4.7.4.	Sólidos solubles totales (°Bx)	31
4.7.5.	Grado alcohólico	31
4.7.6.	Acidez total titulable	31
4.7.7.	Acidez volátil	32
4.7.8.	Azúcares reductores totales.....	32
4.8.	ANÁLISIS SENSORIALES.....	33
4.9.	DISEÑO DE LOS EXPERIMENTOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	33
V.	RESULTADOS.....	35
5.1.	AISLAMIENTO Y DIFERENCIACIÓN DE BAL	35
5.2.	PRUEBAS DE SELECCIÓN DE LAS CEPAS BAL	36
5.2.1.	Tolerancia a etanol y sulfitado	36
5.2.2.	Compatibilidad levadura-BAL.....	38
5.2.3.	Eficiencia fermentativa de BAL seleccionadas en medio sintético	39
5.2.4.	Detección de cepas BAL productoras de aminas biogénicas (AB).....	42
5.3.	ELABORACIÓN DE SIDRA.....	43
5.3.1.	Análisis físicos y químicos.....	44

5.4. ANÁLISIS SENSORIALES.....	49
5.4.1. Prueba hedónica no estructurada.....	49
VI. CONCLUSIONES.....	52
VII. REFERENCIAS	53
VIII. ANEXOS	70
ANEXO 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPANTES DE LA EVALUACIÓN SENSORIAL	70

INDICE DE FIGURAS

Figura 2. 1 a) Morfología flor de manzano, b) Flores de manzano	6
Figura 2. 2 Morfología del fruto de manzano	7
Figura 2. 3 Ciclo reproductivo del manzano.....	8
Figura 2. 4 Proceso de elaboración de sidra natural	12
Figura 2. 5 Metabolismo de la fermentación alcohólica.....	14
Figura 5. 1 Mosto obtenido de tres variedades de manzana: a) ‘Red Delicious’; b) ‘Golden Delicious’; c) ‘428’.....	35
Figura 5. 2 Incremento relativo de DOr de cepas BAL en medio adicionado con etanol y SO ₂	37
Figura 5. 3 Incremento relativo de DOr de cepas BAL en medio gastado por levaduras nativas MM7 y RY5.....	38
Figura 5. 4 Interacción tiempo*tipo de inoculación sobre la producción de ácido láctico	40
Figura 5. 5 Comportamiento de BAL durante el proceso de FML empleando una inoculación secuencial.	41
Figura 5. 6 Producción de ácido láctico derivado de la interacción levadura-BAL.	42
Figura 5. 7 Productos de la PCR múltiplex dirigida a genes asociados con la producción de AB..	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2. 1 Principales estados productores de Manzana en México.....	4
Tabla 2. 2 Producción de manzana en Querétaro.....	5
Tabla 2. 3 Clasificación taxonómica del manzano.....	6
Tabla 2. 4 Composición nutrimental de la manzana por cada 100 g de fruto.....	9
Tabla 2. 5 Energía y contenido de nutrientes por 100 g de porción comestible	10
Tabla 2. 6 Clasificación de la sidra	11
Tabla 4. 1 Características principales de las variedades incluidas en el estudio.....	23
Tabla 4. 2 Características de los iniciadores para la detección de los genes de BAL asociado a la producción de AB.....	29
Tabla 5. 1 Densidad óptica relativa (DOr) de cepas BAL sometidas a estrés durante su crecimiento	37
Tabla 5. 2 Efectos significativos sobre la producción de ácido láctico determinados por un ANOVA	40
Tabla 5. 3 Características físicas y químicas de la sidra tranquila antes de la fermentación maloláctica	44
Tabla 5. 4 pH y acidez total titulable de la sidra tranquila después de la FML con BAL seleccionada	45
Tabla 5. 5 Producción de ácido láctico de cada uno de los tratamientos evaluados	48
Tabla 5. 6 Evaluación sensorial por medio de prueba hedónica de sidras tranquilas sometidas a FML.....	50

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL 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 reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dió reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

I. INTRODUCCIÓN

El manzano (*Malus domestica* Borkh) produce un fruto ampliamente consumido alrededor del mundo y su importancia radica principalmente en las propiedades nutricionales que aporta y a la variedad de productos derivados como alternativa a su consumo en fresco. Algunos de los más comunes son bebidas (jugos, néctares, sidras), yogurt, fruto deshidratado, aceites, vinagres, refrescos y licores (SAGARPA, 2017).

México ocupa el 20º lugar a nivel mundial en el cultivo de la manzana, con 60 mil ha establecidas (SAGARPA, 2017), siendo los principales estados productores Chihuahua, Puebla, Durango y Coahuila (SIAP a, 2020), y las principales variedades cultivadas ‘Golden Delicious’, ‘Red Delicious’, ‘Rome Beauty’ y ‘Gala’ (SIAP b, 2020). En algunas regiones del centro de la república, como en los estados de Puebla, México, Hidalgo, Guanajuato y Querétaro, existen zonas que cuentan con condiciones edafoclimáticas propicias para el cultivo del manzano (León *et al.*, 2020). Sin embargo, la presencia de accidentes climatológicos, así como la aplicación deficiente de las diversas técnicas de cultivo, propician que parte de la producción obtenida no posea los atributos de calidad para ser comercializada en fresco. Es por esto que se han buscado alternativas que permitan obtener un mejor aprovechamiento de este fruto, tales como la elaboración de derivados, como la sidra, bebida que se obtiene de la fermentación alcohólica (FA) del jugo de manzana (SAGARPA, 2016). El desarrollo de productos como alternativa a la venta en fresco de la manzana permitirá darle un valor agregado al producto y con ello promover mayores beneficios para familias y comunidades productoras de manzana.

Las levaduras del género *Saccharomyces* son las principales responsables de llevar a cabo el proceso de la fermentación alcohólica (Chen *et al.*, 2019). Asimismo, se tiene conocimiento de que, al igual que en el vino, durante el proceso de elaboración de sidras, diferentes géneros de bacterias ácido lácticas (BAL) pueden llevar a cabo la fermentación maloláctica (FML), proceso mediante el cual se obtiene una desacidificación parcial, el desarrollo de aromas particulares y otorgando la estabilidad biológica en el producto (Soto Herrera *et al.*, 2008).

Chen *et al.* (2019) evaluaron la influencia de cuatro bacterias acidolácticas, *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei* y *L. plantarum* sobre el perfil de sabor

del jugo fermentado de manzana, siendo *L. acidophilus* la más eficiente en la producción de ácido láctico.

En nuestro grupo de trabajo se han llevado a cabo diversas investigaciones relacionadas con la elaboración a nivel local de sidras tranquilas y espumosas artesanales. Ramírez *et al.* (2005) observaron un aumento de presión interna al incrementar la concentración de azúcar y el tipo de levadura. Soto *et al.* (2008) encontraron que la concentración de azúcares y el tipo de levadura afecta significativamente la altura de corona y diámetro de burbuja durante el servido de la sidra en la copa, mediante análisis de imágenes. León-Teutli *et al.* (2020) seleccionaron levaduras del género *Saccharomyces* nativas de manzanas de la región con características deseables para la elaboración de sidras espumosas de calidad y típicas de la región de Querétaro. Finalmente, Moguel (2020) determinó la influencia de la levadura en el perfil sensorial y de compuestos volátiles de sidra espumosa artesanal en dos cultivares de manzana, además de que advirtió descensos en la acidez total titulable durante el proceso fermentativo, pudiendo ser atribuido a la presencia de BAL.

Sin embargo, hasta la fecha no se han llevado a cabo estudios relacionados con la presencia espontánea de BAL, su capacidad fermentadora, ni del efecto de la inoculación de cepas seleccionadas de BAL en la calidad de las sidras artesanales producidas localmente. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue aislar y seleccionar BAL con base en características deseables y compatibilidad con levaduras previamente seleccionadas para la elaboración de sidras tranquilas.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1.El manzano

2.1.1. Origen y antecedentes

El manzano es uno de los cultivos frutales más importantes del mundo (Harris *et al.*, 2002), se considera originario de las zonas frías de Europa y Asia, donde se han encontrado vestigios que remontan su origen a las edades Neolíticas y de Bronce (Coque *et al.*, 2012). Es cultivado alrededor de todas las zonas templadas del mundo, así como en zonas frías y altas de los trópicos y subtropicos (Baraona y Sancho, 1992). Éste puede adaptarse a condiciones de temperaturas extremadamente frías tal como Siberia y el Norte de China, así como ambientes cálidos como es el caso de Indonesia (Hancock *et al.*, 2008).

En el siglo XVI, los conquistadores españoles extendieron el cultivo de la manzana al nuevo mundo y, 100 años después, desde Iberoamérica, el manzano emigró a América del Norte y posteriormente a África septentrional y Australia (SAGARPA, 2012).

2.1.2. Importancia

2.1.2.1. Importancia Mundial

Las manzanas son frutos comercializados ampliamente alrededor del mundo y se estima que su consumo, seguirá creciendo a un ritmo moderado (ICEX, 2018). Los analistas pronostican que su tendencia continuará al alza y se expandirá con una tasa de crecimiento anual superior al 2% entre 2016 y 2025. Su volumen global podría superar 107 millones de toneladas en 2025.

China produce 56% del total mundial, mientras que productores como Europa y Estados Unidos juegan un rol relevante, con 16% y 6% de la producción, respectivamente (Redagráfica, 2017).

2.1.2.2. Importancia nacional

De cada 100 ha con frutales en México 4 ha son de manzana. La superficie con este cultivo abarca 60 mil hectáreas; de éstas, 49 mil se encuentran en producción (Atlas Agroalimentario, 2019). El manzano es un cultivo perenne, y se cosecha entre los meses julio y noviembre (Velázquez, 2014), siendo los principales estados productores Chihuahua, Coahuila, Puebla y Durango (Tabla 2.1) (SIAP a, 2020).

El Atlas Agroalimentario 2020 destaca que el consumo anual *per capita* de manzana en el país es de 8.0 kg y es entre los meses de agosto y octubre cuando existe una mayor disponibilidad de manzana en el mercado (SIAP b, 2020).

Tabla 2. 1 Principales estados productores de Manzana en México

Estado	Superficie (ha)		Producción (ton)	Rendimiento (ton/ha)
	Plantada	Cosechada		
Chihuahua	33,936	32430	627, 603	19.353
Coahuila	5,802	5,725	44,748	7.816
Puebla	7,499	6,488	34,557	5.326
Durango	6,577	6,473	7085	1.095

Fuente: SIAP a, 2020

2.1.2.3. Importancia regional

El estado de Querétaro ocupa el 11° lugar a nivel nacional en superficie cultivada de manzano con 407 ha y 714 ton producidas (SIAP a, 2020). El manzano es una de las especies más ampliamente distribuida en la serranía y zonas frías del estado, como son municipios de Pinal de Amoles, San Joaquín, Cadereyta, Humilipan y Amealco (Tabla 2.2) (Fernández-Montes *et al.*, 2010).

Tabla 2. 2 Producción de manzana en Querétaro

Municipio	Superficie (ha)		Producción (ton)	Rendimiento (ton/ha)
	Plantada	Cosechada		
San Joaquín	200	199	298	1.5
Cadereyta	139	139	239	1.72
Pinal de Amoles	45	45	112	2.5
Amealco	32	19	53	2.77

Fuente: SIAP c, 2020

Las principales variedades cultivadas en estas regiones son ‘Golden Delicious’, ‘Red Delicious’ y ‘Rayada’. La fruta producida es de menor calidad a la que se importa o a la que proviene de otras regiones manzaneras del país como Chihuahua y/o Coahuila (Mendoza-González *et al.*, 2008). Esto es consecuencia de daños ocasionados por granizo, roña (*Venturia inaequalis*), mosca de la manzana (*Rhagoletis pomonella*), heladas durante la floración o por maduración tardía, por lo que se presentan serias limitantes en su comercialización (Fernández-Montes *et al.*, 2010).

2.1.3. Botánica

2.1.3.1. Taxonomía

El manzano (*Malus domestica* Borkh) pertenece a la familia *Rosaceae*, subfamilia *Maloideae* (*Pomoideae*), siendo identificadas 78 especies primarias (Phipps *et al.*, 1990; Cárdenas y Fischer, 2013). En la Tabla 2.3 se muestra a manera de resumen, la clasificación taxonómica de este fruto.

Tabla 2. 3 Clasificación taxonómica del manzano

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

Fuente: NCBI, 2017

2.1.3.2. Morfología

El manzano es un caducifolio, llegando a tener una altura entre 1.5 y 7 m y una anchura de base que va de 1 a 4.5 m. Presenta hojas ovaladas, elípticas, lanceoladas, oblongas, lobuladas o aserradas. Las yemas son ovoides con pequeñas escamas que sobresalen, las yemas mixtas contienen entre cinco y ocho flores y un número similar de hojas (Cárdenas & Fischer, 2013).

En el manzano, la flor está conformada por cinco sépalos, cinco pétalos, estambres y pistilos y se sitúa sobre un corto pedúnculo y se encuentra reunida en inflorescencias y es hermafrodita (Figura 2.1) (Coque *et al.*, 2012). Las flores son blancas a rosas o carmín, y se organizan en cimas, constituyen la corola (Cárdenas & Fischer, 2013).

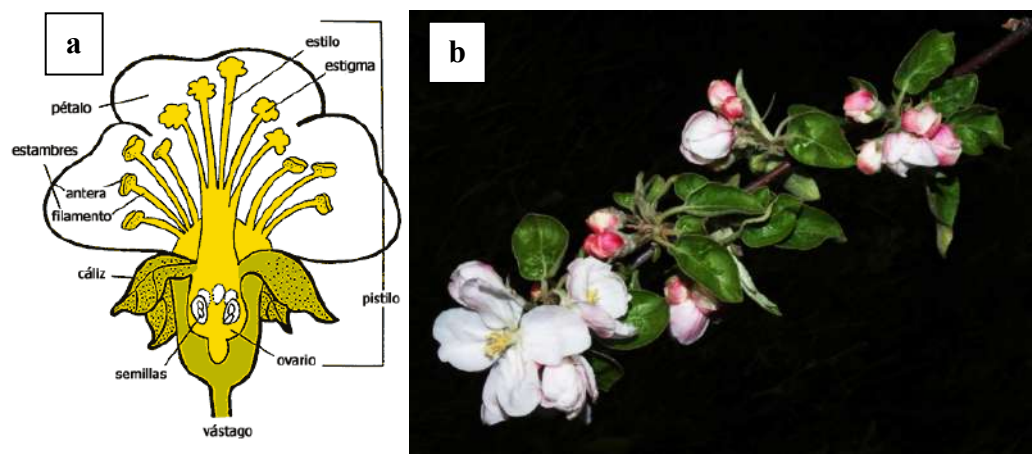


Figura 2. 1 a) Morfología flor de manzano, b) Flores de manzano

El fruto tiene una forma redondeada; es carnoso, con la zona central dividida en cinco o seis partes con paredes de consistencia coriácea que protegen, cada una de ellas, a una o varias semillas o pepitas, aproximadamente cinco o seis por manzana (Figura 2.2). Según el cultivar, algunos maduran en solo 70 días, mientras otros necesitan 180 días o más. Las manzanas alcanzan la madurez alrededor de 120 a 150 días después de la floración (Cárdenas & Fischer, 2013).

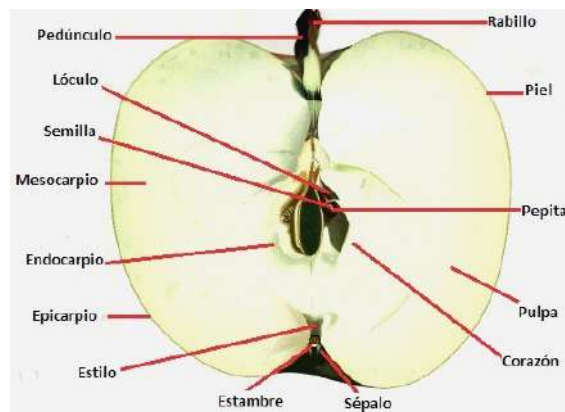


Figura 2. 2 Morfología del fruto de manzano

2.1.3.3. Fisiología

El manzano es un árbol que responde a diversos cambios estacionales, lo que induce a diversas respuestas fisiológicas que le permiten sobrevivir a una estación determinada y prepararse para las variaciones climáticas que se presentan (Fernández-Montes *et al.*, 2010). Un evento fenológico importante en el árbol de manzano es la floración, ya que determina aspectos que serán definitivos en el manejo del cultivo durante el resto del ciclo (Prieto *et al.*, 2006).

En el ciclo de vida de los caducifolios (Figura 2.3) se puede hablar de un ciclo vital y un ciclo anual. En el primer ciclo, la planta presenta un periodo juvenil, en el cual es mayoritariamente crecimiento vegetativo y no hay producción de flores. Dura entre dos y tres años y depende tanto de la variedad como de los factores externos. El segundo periodo de la vida de la planta es la madurez o productivo; en éste, el árbol inicia su producción y el crecimiento vegetativo se encuentra en equilibrio con la diferenciación floral y productiva (Sarmiento y Ossa, 1993).

El tercer periodo de vida de la planta es el de la senescencia, en el cual el árbol aumenta la producción de flores, pero hay escaso crecimiento vegetativo (Sarmiento y Ossa, 1993). Continúa la perforación de los botones florales para el año siguiente, para activarse posteriormente y es seguido del desarrollo vegetativo con la brotación y evolución de las yemas de madera (Coque *et al.*, 2012).

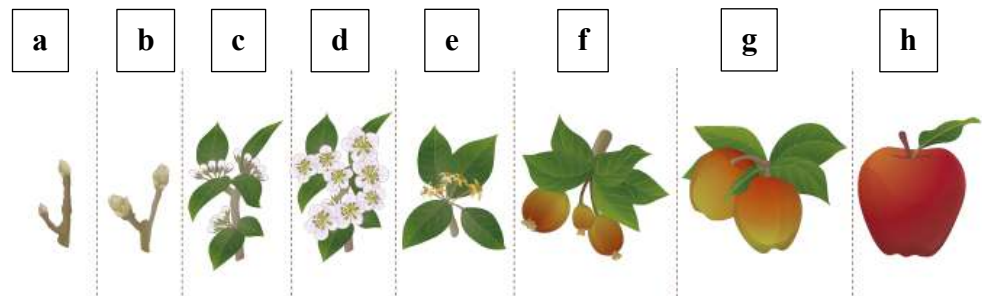


Figura 2. 3 Ciclo reproductivo del manzano

- a) Hinchamiento de la yema de flor, b) Apertura de yema, c) Capullo de la flor, d) Floración, e) Conjunto de frutas, f) Desarrollo del fruto, g) Maduración, h) Cosecha. Adaptado de Moguel-Antonio, 2020.

2.1.4. Composición del fruto

A lo largo del tiempo la manzana ha constituido una importante fuente alimenticia en todos los climas fríos, y es probablemente el árbol más ampliamente cultivado en el mundo. Esta especie vegetal, se puede mantener por largos periodos de tiempo sin perder su valor nutritivo (SAGARPA b, 2016).

Es complicado poder establecer cual es la composición de la manzana, ya que su contenido de nutrientes varía en función del tipo de manzana, el lugar de cultivo, el momento de la recolección o el grado de madurez (Camelo, 2003). Por ello, las cifras mostradas en la Tabla 2.4 son solo una media.

La manzana, a diferencia de otros frutos catalogados como frutos acuosos, presenta un contenido calórico elevado. En general las frutas acuosas son ricas en azúcares, presentan además un ligero efecto laxante, especialmente si se consume con piel (Baraona y Sancho, 1992).

Tabla 2. 4 Composición nutrimental de la manzana por cada 100 g de fruto

Calorías	54
Proteínas vegetales	0.3 g
Lípidos	0.3 g
Glúcidos	12.5 g
Fibras	2.5 g
Agua	82 g
Calcio	7 mg
β caroteno	0.03 mg
Magnesio	6.5 mg
Vitamina E	0.2 mg
Vitamina C	8 mg
Vitamina B3	0.3 mg
Vitamina B5	0.1 mg

Fuente: Roger, 2017

2.2.La sidra

2.2.1. Definición

La sidra es una bebida ligeramente alcohólica (1.2 a 8.5% v/v) que representa una parte importante de la industria de la manzana, y es popular en diferentes países de Europa, América del Norte y Australia (Lorenzini *et al.*, 2019). La sidra proviene de la fermentación del mosto de manzana y posee una coloración ámbar, con un sabor que tiende al agrídulce debido a las características del mosto del cual es obtenida (Soto-Herrera *et al.*, 2008).

Una gran variedad de sidras tradicionales se producen a partir de la fermentación espontánea del mosto de manzana, llevada a cabo por levaduras nativas. Las cepas seleccionadas de *Saccharomyces cerevisiae* se usan comúnmente para llevar a cabo una fermentación alcohólica evitando cualquier alteración sensorial y asegurando la calidad del producto terminado (Lorenzini *et al.*, 2019).

2.2.2. Composición y valor nutritivo

En la Tabla 2.5 se muestra el contenido de nutrientes y valor calórico de la sidra en dos de sus variantes. Es destacable el aporte energético ya que, aunque el etanol está en concentración menor que el vino, las cantidades ingeridas habitualmente son mayores en sidra, por razón de una mayor tolerancia alcohólica. A esta energía se añade la que

aporta el azúcar. Se atribuye cierta importancia a la presencia de procianidinas, taninos condensados presentes en la manzana (Hernández, 2010).

Tabla 2. 5 Energía y contenido de nutrientes por 100 g de porción comestible

Parámetro	Sidra seca	Sidra dulce
Energía (Kcal)	35	33
HC (g)	0	5
Etanol (g)	5	1.8
Na (mg)	6	6
K (mg)	150	150
Ca (mg)	5	5
Mg (mg)	4	4
Fe (mg)	0.2	0.2

Fuente: Hernández, 2010

2.2.3. Tipos de sidra

El tipo de sidra depende de la mezcla de la variedad de manzana que se utiliza para su elaboración. Para el caso de la sidra asturiana la mezcla es fundamentalmente de variedades de manzana del tipo semiácido (aproximadamente, 40% semiácida, 20% ácida, 20% dulce, 15% dulce amarga y 5% amarga) con relativamente baja concentración de taninos (1-1.3 g/L en ácido tánico); para el caso de otros tipos de sidra, la mezcla tiene que ser de carácter dulce-amargo (Mangas-Alonso *et al.*, 2010). En la Tabla 2.6 se muestra la clasificación de la sidra en base a estas características generales y dulzor. En esta clasificación de sidras es necesario considerar los tipos de mostos existentes (Vega y Gancedo, 2017):

- Mosto natural: es aquel en el que se evita su fermentación por tratamiento o prácticas físicas autorizadas, y el cual conserva sus cualidades.
- Mosto concentrado: se obtiene por concentración parcial del mosto natural.
- Mosto natural gasificado: obtenido por la adición de anhídrido carbónico al mosto natural de manzana.

- Mosto apagado: aquel en el que la fermentación ha sido impedida por tratamiento autorizado, excluido el alcohol. No se puede utilizar para el consumo.

Tabla 2. 6 Clasificación de la sidra

Clasificación General	Sidra Natural	Resultante de la fermentación total o parcial del mosto de manzana.
	Sidra Champanizada o gaseada	Producto de creación reciente (no requiere escanciado). Su graduación alcohólica va de 6 a 8 °G.L. Se le incorpora azúcar o jarabe azucarado y anhídrido carbónico. En su proceso de elaboración, es sometida a filtración, la cual elimina gran cantidad de impurezas y sedimentos.
	Sidra Espumosa	Sidra en la que el gas carbónico procede de una fermentación en botella o recipientes cerrados , después de la adición de azúcar sólido o jarabe.
Clasificación en base a dulzor	Seca	Concentración < 30 g azúcar/L. Grado alcohólico >5° G.L.
	Semiseca	Concentración de 30 a 50 g azúcar/L. Grado alcohólico de 3-5° G.L.
	Dulce	Concentración > 50 g azúcar/L. Límite máximo 80 g/L. Grado alcohólico < 3° G.L.

Fuente: Vega y Gancedo, 2017

2.2.4. Proceso de elaboración de sidra

En la Figura 2.4 se resume el proceso típico de elaboración de sidra. Éste inicia en la recolección del fruto, la cual se realiza en su punto óptimo de maduración para su posterior lavado (SAGARDOA, 2019). La manzana seleccionada y limpia es trasladada a la trituradora que tiene la función de reventar la pulpa y así facilitar el prensado y

asegurar el mayor rendimiento de jugo. El mosto obtenido en esta etapa suele denominarse mosto flor o primer mosto (Herrero *et al.*, 2010).

Para incrementar el rendimiento del mosto, se recurre a la maceración seguido de un prensado, para posteriormente conducir este mosto hasta el depósito cerrado que contiene el mosto flor con el fin de proceder a continuación, y si se considera conveniente, a la clarificación prefermentativa. Con esto se consigue la homogeneización del volumen total del mosto obtenido en cada carga (Herrero *et al.*, 2010).

Al igual que en el vino, el mosto de manzana se somete a un proceso de sulfitado para evitar fermentaciones colaterales, inconvenientes y la actuación de enzimas oxidantes que pueden perjudicar la calidad de la sidra (Rodríguez y Gallego, 1999). El mosto se deja fermentar entre 15 °C y 18 °C hasta la disminución de azúcares y de la densidad. Finalizada la fermentación se llevan a cabo los trasiegos para lograr una preclarificación (León-Teutli *et al.*, 2020), a fin de garantizar una adecuada estabilidad fisicoquímica y microbiológica de ésta (Sidra de Asturias, 2015).

Una vez clarificada la sidra por trasiego y superados los controles de calidad, se procede a su embotellado, etiquetado y posterior comercialización. Las botellas de sidra han de llevar una etiqueta delantera donde se especificará la denominación de venta, la cantidad neta, el marcado de fechas y el grado alcohólico de la misma (Mangas-Alonso, 2010).

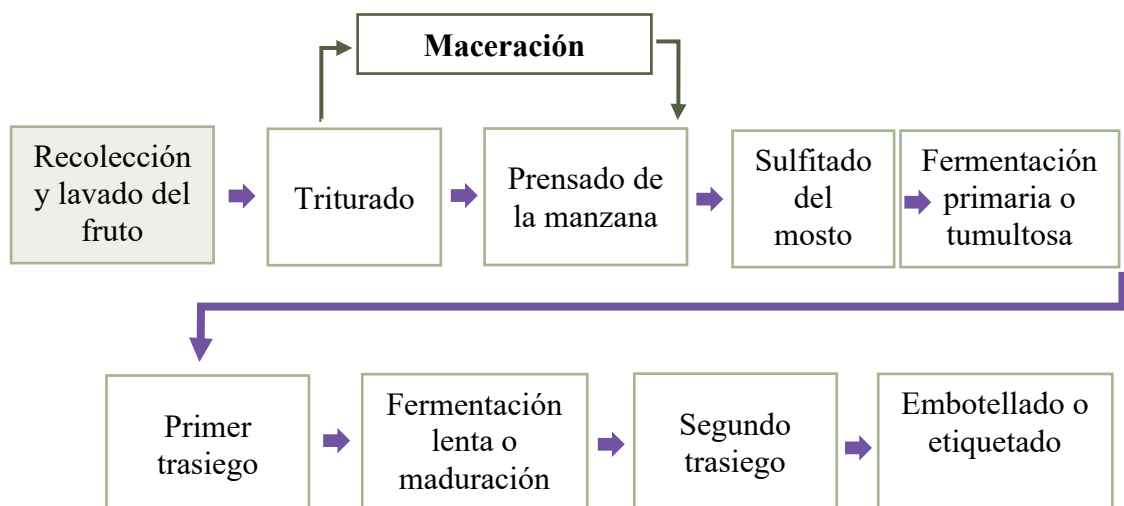


Figura 2. 4 Proceso de elaboración de sidra natural

2.2.5. Tipos de Fermentaciones en la producción de sidra

2.2.5.1. Fermentación alcohólica

La fermentación alcohólica es el conjunto de transformaciones bioquímicas en condiciones anaerobias por la cual los azúcares contenidos en el mosto se transforman en alcohol etílico. Para que este proceso pueda llevarse a cabo, es necesaria la presencia de levaduras (Arias, 2015), principalmente las del género *Saccharomyces*, pero no son las únicas que intervienen en el proceso, sobre todo si la fermentación se realiza de forma espontánea. Existe una gran variedad de especies, conocidas como no-*Saccharomyces*, que intervienen en mayor o en menor medida en la fermentación alcohólica, sobre todo en las primeras fases (Jolly *et al.*, 2003). La levadura juega un papel muy importante de acuerdo a su rendimiento en la conversión de azúcar en etanol, así como por la producción de ésteres aromáticos y otros productos metabólicos (Azhar *et al.*, 2017).

Las levaduras transforman las hexosas en ácido pirúvico, siendo descarboxilado en una etapa primaria a acetaldehído, el cual es finalmente reducido a etanol con desprendimiento de CO₂ (Figura 2.5) (Suárez-Machín *et al.*, 2016).

La eficiencia de la producción de etanol está asociada principalmente con el potencial fermentativo de las levaduras, así como la optimización del proceso de fermentación para mejorar la calidad sensorial de las bebidas alcohólicas. Es por ello, que la levadura convencional ampliamente utilizada en bebidas alcohólicas es *S. cerevisiae* debido a su tolerancia a las duras condiciones durante la fermentación alcohólica (Azhar *et al.*, 2017).

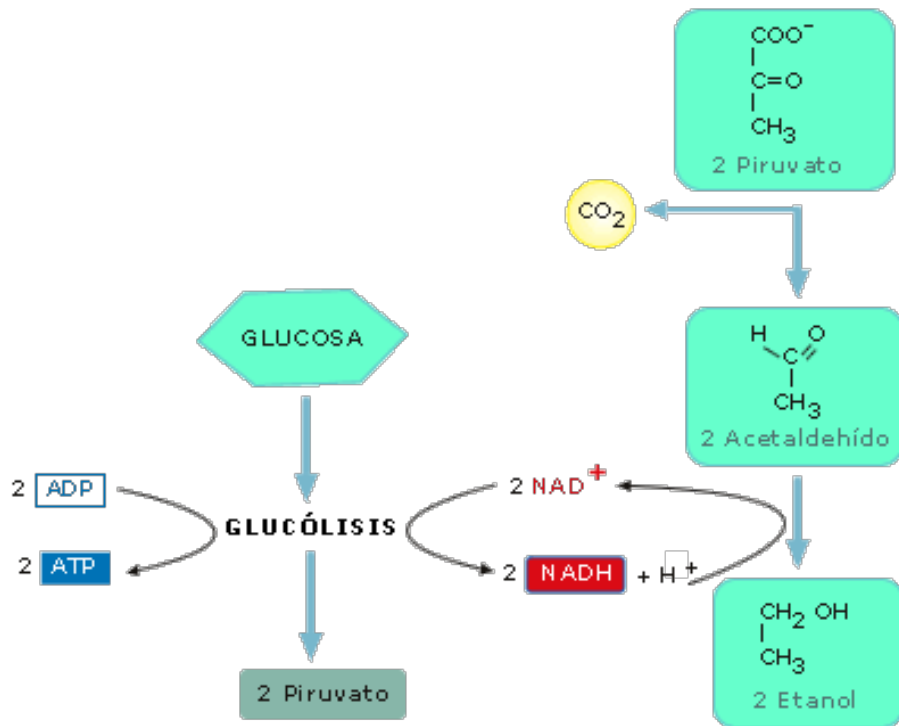


Figura 2. 5 Metabolismo de la fermentación alcohólica

Durante la fermentación alcohólica es necesario controlar el aumento de temperatura, ya que por encima de 28/29 °C, comienza a producirse la volatilización de sustancias aromáticas y a una mayor temperatura, las levaduras empiezan a inhibirse y morir, deteniéndose el proceso fermentativo (Suárez-Machín *et al.*, 2016).

2.2.5.2. Fermentación maloláctica (FML)

La fermentación maloláctica consiste en la descarboxilación del ácido málico a ácido láctico y CO₂ (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). El agente causante de esta fermentación son las bacterias ácido lácticas, en su mayoría a los géneros *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactobacillus* (Herrero *et al.*, 2010).

En la producción de vino, la FML es un procedimiento de desacidificación biológica, que mejora significativamente la palatabilidad del vino (Sumbly *et al.*, 2014). Para el caso de las sidras, la FML reduce la acidez, además de mejorar las características sensoriales y favorecer la estabilidad microbiológica del producto final. A pesar de ello, esta fermentación es un proceso complejo y difícil de controlar, ya que muchos factores

nutricionales, físicos y químicos afectan el crecimiento y metabolismo de las BAL (Herrero *et al.*, 2001). El crecimiento de las levaduras durante la fermentación alcohólica agota muchos nutrientes necesarios para el desarrollo de estas bacterias, muy exigentes en sus requerimientos nutritivos. Las levaduras también producen otros compuestos inhibitorios para las BAL, como el etanol y los ácidos grasos (Bordons y Reguant, 2013).

2.3. Levaduras fermentativas

2.3.1. Generalidades

Las levaduras pueden definirse como hongos unicelulares pertenecientes al reino *Fungi* que se reproducen predominantemente de manera asexual por gemación y las cuales poseen una forma esférica o apiculada (Montoya, 2008; Kurtzman, Fell, y Boekhout, 2011). Sus condiciones óptimas de desarrollo se encuentran entre 25 y 30 °C con un máximo de 47 °C, pH de 4 a 4.5, siendo los azúcares su mayor fuente de energía (Faria-Oliveira *et al.*, 2013).

Debido a la versatilidad que presentan, las levaduras pueden ser empleadas para elaborar una gran diversidad de productos tales como pan, vino y cerveza, que son alimentos ampliamente consumidos. Con la finalidad de otorgar características particulares a cada uno de estos se utilizan cepas específicas. Las levaduras más estudiadas son cepas provenientes de las especies: *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis* y *Candida utilis*. Estas especies son consideradas como aptas para el consumo humano o GRAS (por las siglas en inglés de Generally Recognized As Safe) (Suárez *et al.*, 2016). Sin embargo, las levaduras *Saccharomyces* son las principales responsables de la fermentación alcohólica de los mostos, incluyendo *S. cerevisiae* con elevado poder fermentativo, vigorosas y resistentes a etanol y dióxido de azufre (Togores, 2018).

2.3.2. Levaduras presentes en mosto de manzana y sidra

Las principales especies de levaduras asociadas a la fermentación de la sidra pertenecen al grupo de los ascomicetos. Algunos estudios sobre las levaduras de la sidra han demostrado que la composición de la microbiota puede variar según las condiciones climáticas, variedades de manzana, ubicación geográfica y la tecnología empleada.

La transformación natural o espontánea del mosto de manzana en sidra base es llevada a cabo por la acción secuencial de diferentes especies de levaduras naturalmente

presentes en la superficie de las manzanas o sobre el equipamiento de la sidrera. En este tipo de fermentaciones, la etapa inicial está dominada por levaduras de bajo poder fermentativo (Flores *et al.*, 2017). Estas levaduras se encuentran presentes originariamente en la epidermis de las manzanas y en menor proporción, en la superficie del equipamiento de las bodegas (Fleet, 2003). Son transferidas al mosto para dar inicio a la fermentación alcohólica espontánea, dominando la etapa inicial del proceso (tres a cuatro días), para después dar paso a cepas de levaduras con mayor tolerancia al etanol y alto poder fermentativo (*Saccharomyces* spp.) que conducen el proceso hasta el final de la fermentación (Flores *et al.*, 2017; González, 2019).

2.4. Bacterias ácido lácticas (BAL)

2.4.1. Características generales

Las BAL son bacterias Gram positivas y catalasa negativa, las cuales fermentan azúcares para producir elevadas cantidades de ácido láctico. Son usadas ampliamente como cultivos iniciadores para la producción de lácteos y varios alimentos fermentados, destacando la producción de bebidas alcohólicas (Clarke *et al.*, 2012; Saez-Lara *et al.*, 2015; Lai *et al.*, 2016).

Estas bacterias recurren a la generación de ATP mediante la fermentación de carbohidratos y compuestos relacionados, acoplada a fosforilación a nivel de sustrato, esto debido a que carecen del ciclo de Krebs. Entre los sustratos fermentables por las BAL se encuentran los azúcares (monosacáridos, disacáridos y polisacáridos), los polialcoholes, el citrato y algún aminoácido (arginina) (Sánchez Martínez, 2005).

Las BAL presentan dos tipos de metabolismo: el homofermentativo y el heterofermentativo. Para el primer caso los diferentes sustratos son transformados en ácido láctico como producto final. En el metabolismo heterofermentativo, los diferentes sustratos son transformados en diversos compuestos como el ácido láctico y otros ácidos orgánicos, etanol, glicerol, acetoína, ésteres, etc. (Miyoshi *et al.*, 2003).

Son ácido tolerantes, pudiendo crecer en ambientes con pH tan bajos como 3.2 y tan altos como 9.6, confiriéndole la capacidad de sobrevivir en medios donde otras bacterias no podrían (Carr *et al.*, 2002).

Los géneros de BAL que comúnmente se asocian a alimentos son *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella* y *Streptococcus* (Doyle *et al.*, 2006; da Silva *et al.*, 2014).

2.4.2. Relevancia en bebidas fermentadas

Las BAL son microorganismos que pueden ser usados para diversos fines en la industria alimentaria, siendo la fermentación de alimentos una de sus principales aplicaciones, jugando un papel muy importante en la elaboración de alimentos fermentados lácteos, vino, cerveza y sidra (Ramírez *et al.*, 2011; Ayivi *et al.*, 2020) y destacando para esta aplicación, las especies *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Oenococcus* (Ayivi *et al.*, 2020).

Las BAL son reconocidas como ingredientes generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) en los alimentos, ya que no existe prueba alguna de que representen un riesgo para la salud del consumidor. Además, debido a su actividad metabólica sobre azúcares, ácidos orgánicos, proteínas o lípidos, estos microorganismos son empleados en la industria alimentaria para mejorar el valor nutricional, la conservación y las características sensoriales de una amplia variedad de productos (Teusink y Molenaar, 2017).

El papel más benéfico de las BAL en vinos y en sidras es en la FML, que como se mencionó, consiste en la descarboxilación del ácido L-málico y conversión en ácido L-láctico. La FML produce la desacidificación de estos productos, además de contribuir con la estabilidad microbiana por remoción del ácido málico y a la modificación del perfil aromático ligado a la actividad enzimática desarrollada por las BAL (Manera *et al.*, 2017). Por otro lado, las BAL también pueden ser responsables del deterioro de la sidra generando numerosos sabores desagradables, AB y exopolisacáridos.

Si bien, la FML puede llevarse a cabo de forma espontánea, se logra un mayor control en el tiempo y establecimiento de ésta mediante la inoculación con un cultivo bacteriano seleccionado, típicamente de *O. oeni* (Couchenehy *et al.* 2005; Miranda-Castilleja *et al.*, 2015).

2.4.3. Criterios de selección

2.4.3.1. Metabolismo de ácido málico

Las BAL heterofermentativas son las responsables de la degradación de diversos sustratos en la FML. A este proceso son asociadas diversas especies de BAL, siendo *O. oeni* la BAL heterofermentativa que mejor se adapta a condiciones hostiles en vinificación y elaboración de sidra (Chaïb *et al.*, 2022). No obstante, algunas cepas de *Lactobacillus plantarum* (actualmente *Lactiplatibacillus plantarum*), la cual es una bacteria homofermentativa, han demostrado características potenciales en la elaboración de estas bebidas en diversas regiones. Sudáfrica es uno de los países pioneros en su uso, mientras que Italia y Argentina trabajan en el área de forma más reciente (Miranda-Castilleja *et al.*, 2015; Iorizzo *et al.*, 2016; Mendes-Ferreira y Mendes-Faia, 2020).

Las cepas de *O. oeni* varían en su capacidad para metabolizar ácido L-málico, esta habilidad constituye el principal criterio de selección (Miranda-Castilleja *et al.*, 2015). El metabolismo de este ácido en *O. oeni* es por descarboxilación directa, mediante la enzima maloláctica, con NAD y Mn²⁺ como cofactores. Los genes que codifican la enzima maloláctica (*mleA*), la malato permeasa (*mleP*) y una proteína reguladora (*mleR*) se han clonado, secuenciado y estudiado en *O. oeni* (Bartowsky, 2005 y 2011; Miranda-Castilleja, 2015).

2.4.3.2. Interacción levadura-bacteria

Como se ha mencionado con anterioridad, la FML es un proceso mediado por la acción de BAL, pertenecientes principalmente a la especie *O. oeni*, y que puede mejorar la calidad de la sidra a través de la desacidificación y la producción de aromas y sabores deseables (Fernández-Pérez *et al.*, 2019). Sin embargo, esta fermentación es a menudo difícil de inducir y controlar debido al bajo pH, alto contenido de etanol, baja temperatura e interacciones antagónicas que pueden darse entre las levaduras y BAL (Mendoza *et al.*, 2010; Nehme *et al.*, 2010).

En el proceso de vinificación se ha reportado la inhibición de las BAL causada por las levaduras lo que propicia un orden sucesivo de las poblaciones de estos microorganismos (Miranda-Castilleja *et al.*, 2015). Los metabolitos implicados en este efecto han sido el etanol, el SO₂, algunos péptidos, proteínas, ácidos grasos de cadena

corta y media (Fleet 2008; Nehme *et al.*, 2010). Por el contrario, también, se ha considerado la posibilidad que la levadura estimule el crecimiento de BAL por efecto de la liberación de compuestos como aminoácidos y vitaminas como consecuencia de su autólisis (Miranda-Castilleja *et al.*, 2015).

Osborne y Edwards (2006) y Nehme *et al.* (2010) encontraron que algunas cepas de *S. cerevisiae* ejercieron actividad inhibitoria sobre las BAL por diferentes compuestos proteicos o peptídicos. Por su parte Larsen *et al.* (2003) reportaron que *O. oeni* fue inhibida por levaduras productoras de SO₂, sin embargo, ambos estudios concluyeron que la correlación entre levadura productora de SO₂ y la inhibición bacteriana, no siempre existe.

De forma inversa, las BAL pueden inhibir a las levaduras, ya que pueden secretar proteasas, glucanasas, compuestos como bacteriocinas y ácidos grasos de cadena corta, que pueden degradar las paredes celulares y/o acelerar la muerte de la levadura (Miranda-Castilleja *et al.*, 2015). Por tanto, el que la FML pueda o no llevarse a cabo, está estrechamente relacionado con la elección de levaduras y cepas bacterianas y las interacciones que pueden ocurrir entre ellas (Nehme *et al.*, 2010).

2.4.3.3. Producción de compuestos aromáticos y sabores

Durante la FML, las BAL presentes o agregadas intencionalmente en las sidras, pueden dar como resultado complejas modificaciones de sabor (Cañas *et al.*, 2008).

Un importante metabolito secundario asociado con el metabolismo del ácido cítrico durante la FML llevada a cabo por *O. oeni* es el diacetilo. Este compuesto imparte aromas “mantequillosos” que, en dosis moderadas aporta complejidad y es deseable. Los genes (*alss* y *alsd*) codifican las principales enzimas involucradas en la producción de este compuesto; α -acetolactato sintetasa y α -acetolactato descarboxilasa, respectivamente (Bartowsky, 2011; Miranda-Castilleja *et al.*, 2015). Adicionalmente *O. oeni* es productor de glucosidasas que contribuyen a la liberación de numerosos compuestos aromáticos, tales como monoterpenos, norisoprenoides y compuestos alifáticos (Bartowsky, 2005).

2.4.3.4. Adaptación a estrés

La inducción de la FML no siempre es llevada a cabo de forma exitosa debido a las características en el ambiente de la sidra y que ya han sido mencionados con anterioridad. Las cepas BAL que típicamente conducen MLF debido a su mejor tolerancia a los factores de estrés relacionados con el vino y la sidra pertenecen a la especie *O. oeni* (Jiang *et al.*, 2018).

La combinación de factores de estrés, como los que se encuentran en la matriz compleja que es la sidra, puede producir un efecto inhibitor aún más severo en el crecimiento de *O. oeni* y otras bacterias presentes en el medio en comparación con un solo estresor.

Por ejemplo, las células estresadas con etanol de *O. oeni* exhiben una mayor fluidez de membrana y una producción reducida de ATP (Da Silveira *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2018). Además, la presencia de SO₂, ácidos grasos de cadena media y pH bajo también perjudica la actividad ATPasa de *O. oeni*, lo que resulta en una población reducida y una fermentación prolongada (Carreté *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2018).

Para el caso de los compuestos fenólicos, algunos ácidos hidroxibenzoicos y sus derivados, aldehídos fenólicos, flavonoides y taninos inhiben el crecimiento y la viabilidad de *O. oeni* (Figueiredo *et al.*, 2008; Campos *et al.* 2009; García-Ruiz *et al.*, 2011). El crecimiento de *O. oeni* también puede estar restringido por la limitación de nutrientes, con varios aminoácidos siendo esencial la cisteína (Saguir *et al.*, 2002).

2.4.3.5. Toxicidad

En el caso de los alimentos fermentados, algunas BAL pueden convertir los precursores de aminoácidos disponibles en AB mediante actividades de descarboxilasa o deiminasa durante o después de los procesos de fermentación. Por esta razón, el catabolismo de aminoácidos por BAL puede afectar tanto la calidad como la seguridad de los alimentos fermentados (Coton *et al.*, 2010)

La sidra es un producto en el que las BAL son a menudo responsables de la producción de AB. Las principales BAL productores de AB incluyen cepas de los géneros *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Enterococcus* (Lorencová *et al.*, 2021). Aunque el contenido de AB en este tipo de bebidas, es menor que en alimentos

fermentados como el queso, se lleva a cabo un efecto sinérgico entre alcohol y AB (Lehane y Olley, 2000) llegando a potenciar los efectos tóxicos de AB. Bajo este contexto, es importante reducir el contenido de AB en los alimentos evitando la presencia y actividad de BAL productores de AB (Ladero *et al.*, 2011).

Hoy en día, mediante la aplicación de técnicas moleculares simples, es posible detectar la presencia de genes asociados a la producción de AB, para asegurar que los microorganismos seleccionados no sean productores de estos compuestos tóxicos (Miranda-Castilleja *et al.*, 2015).

III.OBJETIVOS

Objetivo General

- Aislar y seleccionar BAL con base en su tolerancia al medio fermentativo, su eficiencia fermentativa y su compatibilidad con otras levaduras, para la elaboración de sidras tranquilas en la región productora de Querétaro.

Objetivos específicos

- Aislar BAL a partir de la fermentación de los mostos de tres variedades de manzana establecidas en la región de Amealco, Querétaro, inoculadas con cepas de levaduras seleccionadas.
- Seleccionar BAL con base en su tolerancia al medio fermentativo, su eficiencia fermentativa, compatibilidad con levaduras e incapacidad para sintetizar AB para la fermentación de sidra tranquila.
- Determinar el efecto de las BAL seleccionadas sobre la calidad de la sidra tranquila.

IV. METODOLOGÍA

4.1. Sitio experimental

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Fermentaciones y Fisiología de Frutas de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

4.2. Material biológico

Manzanas

Se emplearon tres variedades de manzana, ‘Golden Delicious’, ‘Red Delicious’ y ‘428’ provenientes de huertos comerciales en el municipio de Amealco (20°09’LN, 100°07’LO Y 2279 msnm) Querétaro (Google Earth, 2022) para la elaboración de sidras tranquilas. En la Tabla 4.1 se pueden apreciar las características más importantes de las variedades de manzana que se utilizaron.

Tabla 4. 1 Características principales de las variedades incluidas en el estudio

Variedad	Origen	Descripción
‘Golden Delicious’	‘Golden Reineta’ x ‘Grimes Golden’	Maduración: intermedia. Color: amarillo liso, a veces ligeramente chapeado. Destino: fruto de mesa e industria, buenas cualidades para elaboración de sidra. Cultivar más conocido en el mundo.
‘Red Delicious’	Selección de Madison	Maduración: intermedia. Color: rojo estriado. Destino: fruto de mesa y de industria. Cultivar más difundido en el mundo.

‘428’	‘Anna’ x ‘Gala’	<p>Maduración: temprana.</p> <p>Color: rojo estriado, no colorea muy bien</p> <p>Destino: fruto de mesa.</p> <p>Manzana de calidad</p>
-------	-----------------	---

Fuente: Martínez, 2014

Los frutos se recolectaron en el mes de agosto en condiciones de maduración óptima.

Cepas

Se utilizaron 84 cepas BAL aisladas de ambientes enológicos y 2 levaduras nativas MM7 y RY5 elegidas del cepario del Laboratorio de Fermentaciones y Fisiología de Frutas para elaborar las sidras (Moguel, 2020).

Jugo de manzana artesanal

Para la obtención del jugo se tomaron frutos en condiciones óptimas, se sometieron a un lavado y desinfección (Teng *et al.*, 2018) y posteriormente se descorazonaron, se extrajo el jugo mediante un extractor marca Turmix modelo estándar. Al jugo obtenido se le midió acidez total titulable (Sección 4.6.6), sólidos solubles totales (Sección 4.6.4) y pH (Sección 4.6.2), después se filtró con una manta limpia y estéril para depositarlo en tres vitroleros de vidrio a razón de 20 L en cada uno de ellos, se sulfitó adicionando metabisulfito de potasio a razón de 5 g/HL y se realizó el desfangado posterior a su refrigeración a 3 °C por 24 h.

Jugo de manzana comercial

Para las pruebas de selección se empleó jugo de manzana comercial pasteurizado y clarificado marca Del Valle 100% jugo de manzana.

4.3. Aislamiento de BAL

Con el jugo de manzana artesanal, de las tres variedades señaladas, se llevó a cabo una fermentación espontánea a 19 ± 1 °C hasta la disminución de concentración de sólidos y densidad ($\rho = 0.99$ o 1.00 g/mL).

Al inicio y al final de la fermentación, se tomaron alícuotas de 1 mL para cuantificar y aislar BAL. Para llevar a cabo los aislamientos, se empleó la metodología descrita por Ramírez-López y Vélez-Ruiz (2016) con algunas modificaciones: se prepararon diluciones seriadas de 10^{-1} hasta 10^{-6} y se inocularon 100 μ L de cada dilución por extensión en superficie en medio de cultivo Man Rogosa Sharpe (MRS). Las placas se incubaron a 30°C de 24 a 48 h para su posterior cuantificación y aislamiento.

De cada una de las placas dentro del rango contable (30-300) se seleccionaron de 3 a 5 colonias con diferente morfología, las cuales se aislaron para posteriormente efectuarles pruebas de catalasa y tinción Gram (Ruiz *et al.*, 2010).

Las cepas BAL aisladas y diferenciadas fueron almacenadas en caldo MRS adicionado al 20% de glicerol a -20 °C para su uso en las evaluaciones posteriores.

4.4. Preparación de inóculos

Los cultivos de levaduras que se encontraban almacenados a -20 °C en caldo nutritivo dextrosa para levaduras (NYDB) fueron activados en agar nutritivo dextrosa para levaduras (NYDA) e incubados durante 72 horas a 25 ± 1 °C. Una colonia de este cultivo se transfirió a medio NYDB y se incubó durante 72 horas a 25 ± 1 °C; posteriormente, el medio se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante y se ajustó a una concentración de 10^6 UFC mL⁻¹. Finalmente, las células se lavaron con solución salina isotónica (SSI) a 0.85 % (Sandoval *et al.*, 2011).

Por su parte, las cepas BAL almacenadas a las mismas condiciones en caldo MRS, fueron activadas en medio MRS en placas e incubados a 72 horas a 30 ± 1 °C. Una colonia de este cultivo se transfirió a caldo MRS y se incubó durante 72 horas a 30 ± 1 °C; empleando el mismo método de lavado empleado para las levaduras descrito previamente.

4.5. Pruebas de selección de las cepas de BAL

Para que las BAL funjan como cultivos iniciadores de la FML deben ser capaces, no sólo de permanecer sino de desarrollar en las condiciones limitantes que se han generado tras la fermentación alcohólica (FA) y que no produzcan compuestos que perjudiquen el perfil sensorial de la sidra (Miranda-Castilleja, 2015).

4.5.1. Tolerancia a etanol y sulfitado

Se evaluó la capacidad de desarrollo de las cepas de BAL aisladas de mosto de manzana en dos medios a diferentes condiciones de estrés, simulando aquellas del proceso de elaboración de sidra: 1) Medio MRS ajustado a 5 % de etanol y adicionado de 30 mg/L de SO₂. y 2) Medio MRS adicionado de 8 % de etanol, 50 mg/L de SO₂, ambos medios se ajustaron a un pH de 3.5. En ambas pruebas se inocularon en una microplaca 20 μL (6 Log UFC/mL) de cada cepa a evaluar para tener un volumen total de 200 μL de medio en cada pozo. Las microplacas se incubaron a 30 °C y las lecturas se llevaron a cabo en el equipo Varioskan™ en intervalos de 12 h por 72 hrs agitándolas a intensidad media por 5 s antes de cada lectura. La densidad óptica (DO) se midió a una longitud de onda de 600 nm. Se construyeron curvas de desarrollo de cada cepa en cada condición, obteniendo la DO relativa (DOr) con la siguiente ecuación:

$$DOr_{relativo} = \frac{DOr_{con levadura} - DOr_{sin levadura}}{DOr_{sin levadura}}$$

4.5.2. Pruebas de interacción levadura-bacteria

En esta prueba se verificó la compatibilidad con las levaduras MM7 y RY5. La prueba se realizó empleando 20 mL de jugo de manzana comercial, el cual se inoculó con 5 log UFC/mL de las levaduras de manera independiente y se dejó fermentar durante 72 h a temperatura ambiente. A continuación, el medio se centrifugó (5000 g por 10 min) para eliminar la biomasa y se esterilizó mediante microfiltración (0.45 μm). El caldo resultante se utilizó como medio para observar el desarrollo de las cepas de BAL, el mismo medio sin la inoculación de ninguna levadura se empleó como control positivo del desarrollo de las BAL. El efecto de la levadura en el crecimiento de BAL se estimó como crecimiento relativo empleando la siguiente ecuación:

$$DOI_{relativo} = \frac{DOI_{con levadura} - DOI_{sin levadura}}{DOI_{sin levadura}}$$

4.5.3. Eficiencia fermentativa de BAL seleccionadas en medio sintético

Considerando la tolerancia al medio fermentativo previamente evaluada y la compatibilidad entre cepas de levaduras y BAL, se seleccionaron las cepas para valorar la capacidad de las BAL para realizar la descarboxilación del ácido málico para transformarlo en ácido láctico durante el proceso de elaboración de sidra.

Para este análisis se empleó jugo de manzana comercial el cual fue inoculado ya sea por inoculación secuencial o por coinoculación y se determinó la concentración de ácido láctico en el jugo a la mitad y al final de la fermentación empleando L-Lactic Acid (L-Lactate) (Rapid) Assay Kit de Megazyme, Sidney, Australia.

Inoculación secuencial

Para evaluar el comportamiento de las BAL por medio de inoculación secuencial, 700 mL de jugo de manzana comercial se colocó en cada uno de dos matraces de 1 L. Posteriormente se inoculó cada una de las levaduras seleccionadas para el estudio en un matraz y a una concentración de 6 log de UFC/mL, con ello se dio paso a la fermentación alcohólica la cual se realizó a temperatura ambiente. El seguimiento de la fermentación se llevó a cabo midiendo el peso de los matraces con el medio inoculado hasta que alcanzara un peso constante. Una vez que la fermentación concluyó, el medio resultante de este proceso se distribuyó en alícuotas de 25 mL en tubos de 30 mL previamente esterilizados. Para cada una de las bacterias se evaluó su desempeño tanto en el medio resultante de la actividad de MM7 como de RY5, para lo cual cada medio se inoculó a una concentración de 5 log de UFC/mL de cada una de las cepas BAL de manera independiente

Coinoculación

Jugo de manzana fue distribuido a razón de 20 mL en tubos de vidrio, y se inocularon 6 y 3 log de UFC/mL de levaduras y BAL, respectivamente, Posteriormente se incubaron a temperatura ambiente.

Fermentación

Para ambos tipos de inoculación el medio se almacenó a temperatura ambiente y se realizaron conteos cada 24 h para evaluar la viabilidad y concentración de las BAL a

lo largo de la fermentación maloláctica. Este ensayo se llevó a cabo por triplicado tomando alícuotas de 1 mL hasta culminarse la FML. Las muestras se conservaron en congelación en tubos eppendorf hasta su uso posterior.

4.5.4. Determinación de la producción de aminas biogénicas en BAL seleccionadas

Las cepas BAL que mostraron los mejores resultados en las pruebas anteriores fueron sometidas a una prueba PCR empleada con la finalidad de detectar los genes responsables de producción de AB (De las Rivas. *et al.*, 2006)

4.5.4.1. Obtención de ADN

Se llevó a cabo la activación de cepas, de las cuales se tomó 1 mL y se centrifugó para eliminar el medio de cultivo (12000 g x 2 min). La pastilla se resuspendió en 300 µL de buffer de lisis TNES (Tris-HCl 200 mM pH 8.5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0.5%) se agitó y se colocó en termobloque Eppendorf® a 95 °C x 10 min. Se centrifugó (12000g x 10 min), se recuperó el sobrenadante, se le añadieron 80 µL de acetato de sodio 3 M y se incubó a -20 °C por 10 min. Posteriormente, se centrifugó (12000g x 2 min) se recuperó el sobrenadante, se añadieron 300 µL de isopropanol, se agitó suavemente y se incubó por 10 min a -20 °C, seguido de una centrifugación (12000g x 10 min). Se eliminó el sobrenadante, se agregó a la pastilla formada 1 mL de etanol 70 %, se agitó suavemente, se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugó (12000g x 10 min). Se eliminó el sobrenadante, se secó en un termobloque Eppendorf® a 50 °C y finalmente se resuspendió en 50 µL de TE (Soto *et al.* 2015; Marmolejo *et al.*, 2021)).

4.5.4.2. Prueba de PCR dirigida a genes asociados a la producción de AB

Con el material genético obtenido, se procedió a realizar la prueba de PCR múltiple dirigida a indentificar genes asociados a la producción de AB, empleando los iniciadores descritos por Marmolejo *et al.* (2021) (Tabla 4.2).

Tabla 4. 2 Características de los iniciadores para la detección de los genes de BAL asociado a la producción de AB.

GEN	INICIADOR	SECUENCIA	TAMAÑO	TÉCNICA PCR
HISTIDINA	HDC3	5'-GATGGTATTGTTTCKTATGA-3'	435 pb	Múltiple
	HDCC4	5'-CCAAACACCAGCATCTTC-3'		
TIRAMINA	TD2	5'-ACATAGTCAACCATRTTGAA-3'	1133 pb	Múltiple
	TD5	5'-CAAATGGAAGAAGAAGTAGG-3'		
CADAVERINA	CadAF	5'-GCTGGGTTCACTGCTGGA-3'	220 pb	Simple
	CadAr	5'-TGGCGTAATGTAGCTCATCA-3'	2285 pb	Simple
	Cad2F a	5'-CAYRTNCCNGGNCAYAA-3'		
	Cad2Ra	5'-GGDATNCCNGGNGGRTA-3'		
PUTRESCINA	ODC1	5'-NCAYAARCAACAAGYNGG-3'	900 pb	Múltiple
	ODC2	5'-GRTANGGNTNNGCACCTTC-3'	500 pb	Simple
	ODF	5'-CATCAAGGTGGACAATATTTCCG-3'		
	ODR	5'-CCGTTCAACAACACTGTTTGGCA-3'		

(Li et al., 2019; Elsanhoty et al., 2016; Li L et al., 2019; Guarcello et al., 2016; De las Rivas et al., 2006)

Las amplificaciones se realizaron con una mezcla de reacción de 25 µL que incluía GoTaq Master Mix 2X (Promega), 1 µM de cada iniciador y 1 ng de lisado celular de cada una de las muestras. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 10 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 53 °C y 2 min a 72 °C, y un paso de extensión final de 20 min a 72 °C (De las Rivas. *et al.*, 2006). Los productos de la PCR se evidenciaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y 50 V /45 min en presencia de 3 µL de SyberSafe® para tinción de las bandas que posteriormente fueron observadas en un fotodocumentador UV (De las Rivas *et al.*, 2005).

4.6. Elaboración de sidra

El jugo de manzana artesanal obtenido se inoculó a una concentración total de 5 log de UFC/mL con la cepa de levadura seleccionada.

La fermentación alcohólica (FA) se llevó a cabo en dos contenedores de vidrio con capacidad de 15 L a 19 ± 1 °C (Soto-Herrera et al., 2008), hasta la disminución de la densidad ($\rho = 0.99$ o 1.00 g/mL), al final de la fermentación se midió el grado alcohólico mediante picnometría (Sección 4.6.1).

Para llevar a cabo la FML, el volumen resultante de la FA (30L) se dividió 3 en vitroleros (de 10 L), en 2 de ellos se inoculó cada una de las dos cepas seleccionadas y el

tercero fungió de control. Se llevaron a cabo recuentos de células viables para determinar la sobrevivencia de las BAL en este proceso fermentativo.

Esta sidra obtenida se clarificó mediante la adición de grenetina a razón de 5 g/Hl mediante dos trasegados, uno al finalizar la fermentación alcohólica y después de un reposo de quince días a 3 °C una vez finalizada la FML.

4.7. Análisis físicos y químicos de la sidra

4.7.1. Densidad

Para la determinación de este parámetro se empleó un picnómetro de 25 mL haciendo uso de la siguiente ecuación establecida por la OIV (2011):

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

Donde:

ρ = densidad g/mL

W_M = peso del picnómetro con muestra (g)

W_v = Peso del picnómetro vacío (g)

V = volumen del picnómetro (mL)

4.7.2. Medición de pH

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

4.7.3. Anhídrido sulfuroso libre, total y combinado (Método de Ripper)

SO₂ Libre. Se colocaron 50 mL de sidra en un matraz Erlenmeyer al cual se le agregaron 5 mL de H₂SO₄ y 3 mL de una solución de almidón al 2.0 %. La solución se vertió mediante una bureta graduada a una solución de yodo 0.02 N, hasta obtener el vire a color violeta. La concentración de SO₂ libre en mg/L se calculó como sigue:

$$\text{g/L SO}_2 \text{ libre} = (\text{Vol. de I}_2 \text{ en mL})(12.8)$$

SO₂ Total. A 25 mL de una solución de KOH en un matraz, se le agregaron 50 mL de sidra, se agregarán 10 mL de H₂SO₄ y 3 mL de una solución de almidón al 2.0 %, después de lo cual se tituló con yodo 0.02 N en la misma forma que para el SO₂ libre. El resultado se expresó y calculó mediante la fórmula anterior.

SO₂ Combinado. Se obtuvo mediante la diferencia del SO₂ total menos el SO₂ libre.

4.7.4. Sólidos solubles totales (°Bx)

Se analizaron en un refractómetro Atago, modelo SPR-N, los resultados obtenidos se reportaron como °Brix.

4.7.5. Grado alcohólico

El porcentaje de alcohol se determinó por el método de destilación directa. Una muestra de 100 mL de sidra, medida con un matraz aforado, se agitó para eliminar el CO₂ y se depositó en un matraz de destilación, destilando 3/4 partes de ésta. La mezcla hidroalcohólica a 20 °C se aforó a 100 mL con agua destilada en el mismo matraz aforado y se evaluó la densidad con un picnómetro de 25 mL de acuerdo a la OIV (2017).

4.7.6. Acidez total titulable

Se eliminó el dióxido de carbono presente en la sidra mediante agitación; se procedió a titular 10 mL de sidra con una solución de NaOH (0.079 M) hasta pH 7.0 medido con un potenciómetro, se registró el pH de la solución y considerando el volumen necesario para neutralizarla. El volumen empleado de la solución de sosa permitió obtener la acidez total según la ecuación siguiente (CEE, 1990):

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

En donde:

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

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

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

F_{ma} = Factor del ácido málico = 0.067

V_m = Volumen de la muestra

4.7.7. Acidez volátil

Se empleó el método propuesto por García Tena (OIV, 2017). Se destilaron 11 mL de la muestra de sidra con perlas de ebullición. Los primeros 5.1 mL del destilado se recogieron en una probeta y enseguida en otra probeta se colocaron 3.2 mL. Ambos destilados se titularon con una solución de NaOH (0.02 N) usando fenolftaleína como indicador (dos a tres gotas), hasta un vire a rosa pálido (OIV, 2016).

El número de mililitros gastados para valorar los 3.2 mL nos dio el valor de la acidez volátil real según la fórmula:

$$\text{Acético real (g/L)} = (\text{ml gastados})(0.366)$$

Para encontrar la acidez volátil aparente, los mililitros gastados para valorar 5.1 mL se sustituyeron en la siguiente fórmula:

$$\text{Acético aparente (g/L)} = (\text{ml gastados})(0.122) + \text{acético real}$$

4.7.8. Azúcares reductores totales

Se utilizó el método de Fehling Causse Bonnans (Flores, 2000). Se realizó una dosificación sobre un medio suficientemente diluido (entre 0.5 y 5 g/L de azúcar) y defecado (clarificado) al cual se han eliminado las otras materias reductoras.

La defecación se efectuó por el acetato neutro de plomo (sal de Saturno): A 100 mL de sidra se agregó solución de NaOH (1 N) hasta llegar a la neutralidad y se adicionaron 5 mL de solución saturada de acetato de plomo, agitando la muestra. Se mezcló entonces en la solución un gramo de carbón activado (CaCO_3) y se dejó reposar por 15 min agitando de vez en cuando (2 veces).

Se tituló el licor de Fehling con una solución de glucosa al 5 g/L para determinar el factor del licor. Se tomaron 10 mL de licor y se agregaron 15 mL de H_2O destilada, colocando la solución a ebullición y se tituló con la solución de glucosa usando una bureta. Al tornarse la solución verdosa, se agregaron tres gotas de azul de metileno al 1 % y se añadió la solución de glucosa, gota a gota, hasta que el licor de Fehling mostró un color rosa claro.

El factor del licor se calculó como sigue:

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

En donde:

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

Cg = Concentración en gramos de la solución de glucosa

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

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

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

En donde:

Ca = Concentración de azúcar

Vf = Volumen usado de licor de Fehling

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

Fd = Factor de dilución de la muestra

n' = Volumen de muestra usado

El resultado se multiplicó por 1.0416 para ser expresado en azúcares invertidos.

4.8. Análisis sensoriales

Para evaluar la aceptación de las sidras tranquilas se realizó una prueba de degustación dirigida a consumidores, verificando la inocuidad de las bebidas destinadas a este análisis sensorial. La escala utilizada para la prueba fue una escala hedónica lineal, con valor de diez puntos no estructurada, con tres acotaciones, neutral en el centro y en los extremos “me gusta mucho” y “me disgusta mucho” (Anexo 2).

4.9. Diseño de los experimentos y análisis estadísticos

El modelo a utilizar fue un diseño experimental unifactorial completamente al azar con tres repeticiones, siendo el factor de estudio las cepas de BAL seleccionadas. Las variables de respuesta fueron los criterios de selección de BAL (tolerancia a etanol, a anhídrido sulfuroso, compatibilidad levadura-bacteria y eficiencia fermentativa), características físicas y químicas de la sidra (densidad, pH,

grado alcohólico, azúcares solubles totales, azúcares reductores totales, acidez total, acidez volátil y anhídrido sulfuroso libre, combinado y total), y aspectos sensoriales.

Los datos de las variables obtenidas fueron sometidos a un análisis de varianza de Fisher y la prueba de medias de Tukey, con ayuda del programa estadístico JMP versión 11.

V. RESULTADOS

5.1. Aislamiento y diferenciación de BAL

De las fermentaciones espontáneas llevadas a cabo con el mosto de 3 variedades de manzana (Figura 5.1) se lograron un total de 120 aislamientos, los cuales fueron sometidos a pruebas de diferenciación: prueba de catalasa y tinción Gram. Únicamente 5 cepas de las 120 aisladas, resultaron ser catalasa negativa y Gram positivas, características pertenecientes al grupo de BAL (GD1.1, GD1.2, RD2.1, RD3.2 y RD3.1).

El contenido de BAL autóctonas en frutas y verduras crudas generalmente varían de 2 a 4 log UFC/mL (Di Cagno *et al.*, 2013) y pueden verse afectado por la presencia de algunos nutrientes como la fibra y la inulina, difíciles de asimilar por estos microorganismos, lo que impide su crecimiento y desarrollo en estos medios (Balthazar *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2021). Aunado a esto, la gran mayoría de BAL depende de ciertos requerimientos tales como acidez y concentración de azúcares por mencionar algunos, y que son características que pueden llegar a variar en el fruto (Sánchez *et al.*, 2012).

Ya que uno de los objetivos iniciales de la investigación era trabajar con la selección de cepas BAL, las obtenidas de mosto de manzana resultaron ser insuficientes para una selección robusta, por lo que, se decidió incluir en el estudio 84 cepas BAL aisladas previamente en el grupo de trabajo en ambientes enológicos. De esta forma, se tuvo un punto de comparación más amplio, pudiendo contrastar además, el potencial que presentaron las distintas cepas, tanto las aisladas de mosto de manzana, como las aisladas de diferentes procesos en la producción de vino.



Figura 5. 1 Mosto obtenido de tres variedades de manzana: a) ‘Red Delicious’; b) ‘Golden Delicious’; c) ‘428’.

5.2. Pruebas de selección de las cepas BAL

5.2.1. Tolerancia a etanol y sulfitado

Para esta primera prueba de selección, las 84 cepas aisladas de ambientes enológicos ya habían sido evaluadas en trabajos previos y a un porcentaje de alcohol (12%) aún mayor que el que se evaluó para fines de este experimento, ya que como se sabe, las sidras manejan un porcentaje alcohólico menor que los vinos. Por lo que en esta etapa del trabajo se buscó saber si las cepas aisladas de mosto de manzana eran tolerantes a estas condiciones estresantes.

En la Tabla 5.1 se muestra la densidad óptica relativa (DOr) de cada una de las 5 cepas BAL sometidas a estrés durante su crecimiento. Recordando que a un nivel bajo de estrés se tenía 5% de etanol y 30 mg/L de SO₂ (T1), mientras que a un nivel alto 8% etanol y 50 mg/L de SO₂ (T2). La DOr se refiere a la relación de la diferencia de crecimiento de cepas estresadas con respecto a cepas no estresadas. Un valor positivo indica un desarrollo superior de las cepas bajo condiciones estresantes, mientras que un valor negativo indica cierto grado de inhibición de su crecimientos en estas condiciones con respecto al control. No hubo diferencias significativas entre tratamientos, sn embargo en la Figura 5.2 se puede apreciar que la mayoría de cepas BAL desarrollan mejor a condiciones bajas de estrés, como es el caso de las cepas GD1.1, GD1.2 y RD3.2. Las dos cepas restantes mostraron valores de incremento relativos negativos; ambas crecieron menos respecto al control en los medios estresantes: la cepa RD3.1 creció 13% y 22% menos en el medio T1 y T2 respectivamente, mientras que para la cepa RD2.1 estos decrementos fueron de 8% y 45%.

Tabla 5. 1 Densidad óptica relativa (DOr) de cepas BAL sometidas a estrés durante su crecimiento

Estrés	Cepa de BAL				
	GD1.1	GD1.2	RD3.1	RD3.2	RD2.1
Bajo(T1)	0.063±0.016 ^a	0.062±0.073 ^a	-0.065±0.277 ^a	0.096±0.028 ^a	-0.043±0.313 ^a
Alto(T2)	0.032±0.078 ^a	0.016±0.067 ^a	-0.159±0.278 ^a	0.025±0.039 ^a	-0.442±0.151 ^a

Medias provenientes de tres repeticiones ± desviación estándar. Dentro de una columna medias conectadas por la misma letra son significativamente iguales (P<0.05)

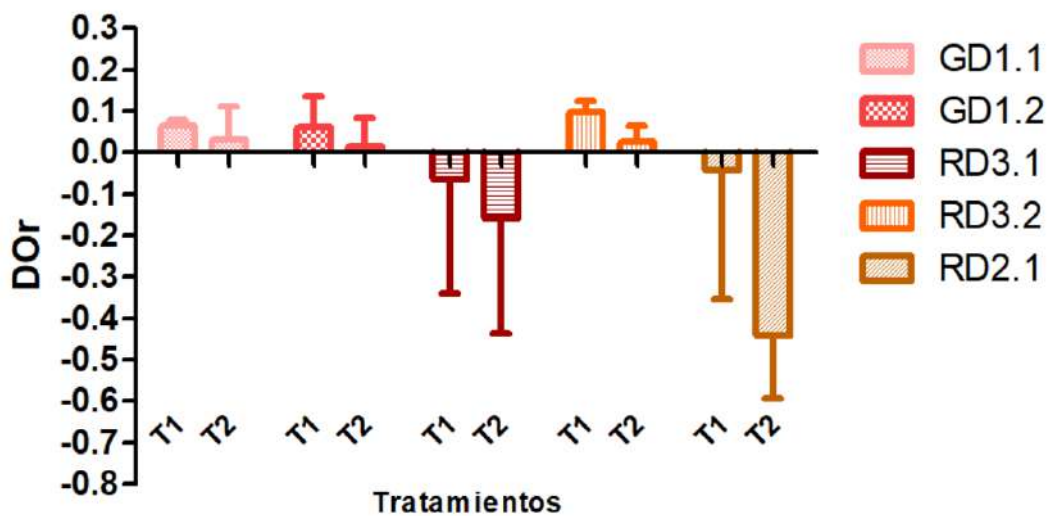


Figura 5. 2 Incremento relativo de DOr de cepas BAL en medio adicionado con etanol y SO₂. Las barras representan el valor medio de tres repeticiones y su desviación estándar.

Debido a que la FML suele ocurrir después de la FA, la proliferación de BAL y la eficiencia de la FML se ven afectadas por la composición de la sidra. La producción y liberación de compuestos por la levadura, como ácidos grasos, péptidos, polisacáridos, otras macromoléculas y principalmente etanol y SO₂ afectarán el crecimiento de las BAL y la FML (Capello *et al.*, 2017).

El SO₂ es el aditivo más frecuentemente empleado para controlar el crecimiento de las BAL y el desarrollo de la FML, debido a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas selectivas, especialmente frente a estas (García-Ruiz *et al.*, 2011; Izquierdo-Cañas *et al.*, 2011), este aditivo junto con concentraciones elevadas de etanol son dos de los mayores inhibidores de BAL. Es por ello, que es importante evaluar la capacidad de cepas BAL de desarrollar en condiciones estresantes como las que se presentan en la sidra.

5.2.2. Compatibilidad levadura-BAL

En esta prueba se analizó el comportamiento de las 89 cepas BAL ante un medio donde se dejó actuar a las levaduras nativas MM7 y RY5 previo a la inoculación de las cepas BAL. En la Figura 5.3 se observa el incremento relativo de DO de cepas BAL en medio gastado por las levaduras nativas mencionadas anteriormente. Se empleó un criterio de análisis similar al experimento pasado, en este caso valores de incremento positivo indicaron un mejor desarrollo de las BAL en el medio proveniente de la levadura y valores de incremento negativo indicaron que los compuestos producidos por la levadura disminuyeron el desarrollo de las BAL con respecto al control.

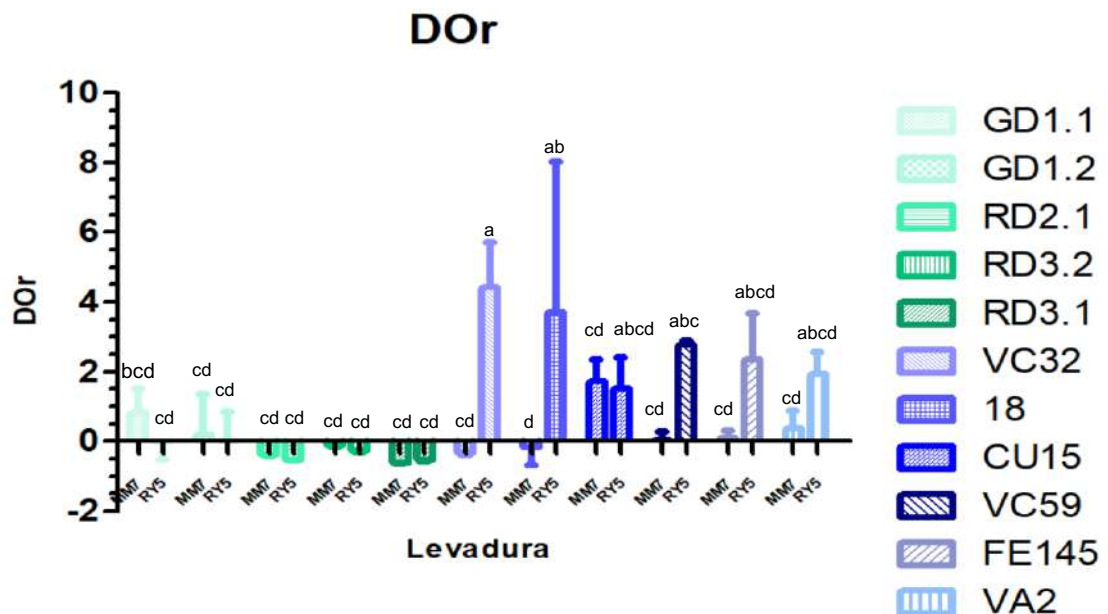


Figura 5.3 Incremento relativo de DOr de cepas BAL en medio gastado por levaduras nativas MM7 y RY5. Las barras representan el valor medio de tres repeticiones y su desviación estándar. Letras distintas indican significancia estadística ($P < 0.05$).

Únicamente 6 de las 89 cepas evaluadas mostraron un comportamiento óptimo en las evaluaciones realizadas previamente. Esas 6 cepas se muestran en la Figura 5.3 en matices azules del lado derecho del gráfico, las 5 restantes en matices verdes del lado izquierdo son las 5 cepas aisladas de mosto de manzana. Lo que puede contrastarse en este gráfico, es la capacidad de desarrollo que tuvieron las 6 cepas en tonos azules aisladas de ambientes enológicos contra las cepas de mosto de manzana, las cuales, en su mayoría no desarrollaron en el medio proveniente de las levaduras, por lo que tuvieron que ser descartadas al no demostrar un buen potencial ante el medio resultante de la fermentación de las levaduras que se utilizaron en evaluaciones posteriores.

Las 6 cepas BAL seleccionadas en este experimento para ser evaluadas en la prueba siguiente fueron VC32, 18, CU15, VC59, FE145 y VA2. Las combinaciones más destacadas fueron las de las cepas BAL VC32 y 18 contra la levadura RY5. De forma general se puede observar que la mayoría de las BAL desarrollaron mejor ante una levadura que fue la RY5.

La estimulación en el desarrollo de la FML se ha relacionado comúnmente con la liberación de nutrientes como vitaminas y aminoácidos así como con el aumento de las proteínas y compuestos nitrogenados resultantes de la lisis de la levadura, favoreciendo el crecimiento de BAL (Alexandre *et al.*, 2004; Balmaseda *et al.*, 2018). Sin embargo, el aumento de los compuestos liberados dependerá de la cepa de levadura, además no todos los compuestos liberados durante su proceso de autólisis pueden tener un efecto positivo estimulante (Herrero *et al.*, 2003; Balmaseda *et al.*, 2021).

Entre los inhibidores producidos por la levadura se encuentran el etanol, el SO₂, los ácidos grasos de cadena media, el β-feniletanol, el ácido succínico y ciertos péptidos (Lucio *et al.*, 2018), lo cual puede explicar el por qué no todas las cepas BAL evaluadas fueron capaces de desarrollar en el medio resultante de la fermentación de las levaduras nativas.

5.2.3. Eficiencia fermentativa de BAL seleccionadas en medio sintético

Para llevar a cabo el análisis de eficiencia fermentativa, se emplearon las 6 cepas seleccionadas y que demostraron ser tolerantes a un ambiente similar a las condiciones que presenta la fermentación del mosto de manzana, además de demostrar una alta

compatibilidad con las 2 cepas de levaduras nativas empleadas. Las cepas se agregaron al sistema mediante una inoculación secuencial o en co-inoculación con las levaduras.

En la Tabla 5.2 se puede observar los efectos que resultaron significativos en la producción de ácido láctico, recordando que el análisis se llevó a cabo considerando 4 factores y sus respectivas interacciones: BAL, levadura, tipo de inoculación y tiempo. El tipo de inoculación fue el efecto que demostró una mayor significancia estadística, ya que se pudo apreciar una mayor producción de ácido láctico para la inoculación secuencial, seguido del efecto de la interacción tiempo y tipo de inoculación (Figura 5.4) donde se aprecia un incremento en la producción de ácido láctico conforme transcurre el tiempo de fermentación para el caso de la inoculación secuencial, caso contrario a lo que ocurre en la coinoculación, donde los valores tienden a disminuir conforme transcurre el tiempo, y lo cual podría atribuirse al efecto antagónico de la levadura, que ejerce una competencia por el consumo de nutrientes además de llevar a cabo la producción de ciertas sustancias que inhiben el desarrollo bacteriano (Fundación para la cultura del Vino, 2006).

Tabla 5. 2 Efectos significativos sobre la producción de ácido láctico determinados por un ANOVA

Factor	Valor P
Tipo inoculación	0.00000*
Tiempo*Tipo inoculación	0.00001*
Levadura*BAL	0.01235*

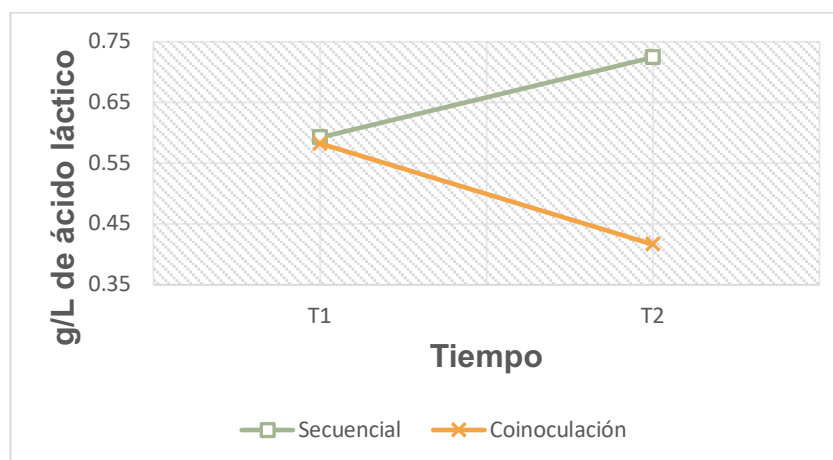


Figura 5. 4 Interacción tiempo*tipo de inoculación sobre la producción de ácido láctico
T1: inicio de la fermentación; T2: Fin de la fermentación

El mejor momento para la inoculación de bacterias lácticas sigue siendo objeto de discusión. De forma habitual, la FML se lleva a cabo de forma secuencial una vez concluida la FA sin embargo, la producción de alcohol y de algunos metabolitos producidos por las levaduras llegan a afectar el crecimiento de algunas cepas BAL, lo que dificulta la iniciación de la FML (Li *et al.*, 2020). Por su parte, la coinoculación puede reducir el tiempo de fermentación pero también puede inhibir el crecimiento y metabolismo de las levaduras debido a que puede producirse un rápido crecimiento de BAL, conduciendo a la producción de ácidos volátiles excesivos o la terminación de la FA (Nehme *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2020).

La Figura 5.5 muestra los recuentos obtenidos de las cepas BAL durante este análisis y las cuales fueron inoculadas secuencialmente. Se aprecia que las cepas FE145 y VA2 lograron desarrollar en el medio producido por ambas levaduras y alcanzar las concentraciones más altas en el medio producido por la levadura nativa RY5, lo cual coincide con los resultados obtenidos en la evaluación anterior, en la que la levadura RY5 muestra el mejor comportamiento en la interacción con las cepas BAL.

Son precisamente estas dos cepas BAL en interacción con la levadura RY5, las que produjeron las mayores concentraciones de ácido láctico (Figura 5.6), demostrando así, su capacidad de interacción con esta levadura nativa, su tolerancia al medio y su capacidad de degradación de ácido málico.

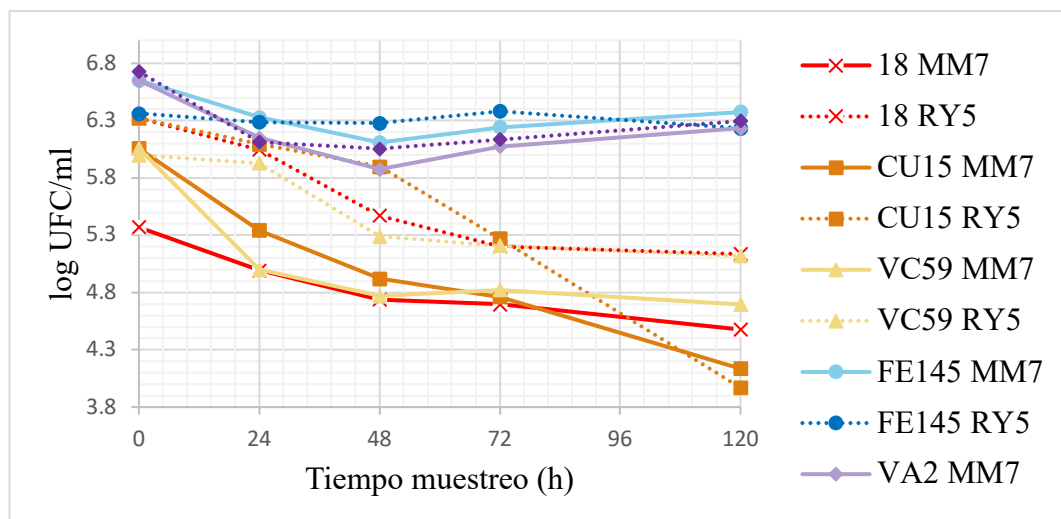


Figura 5. 5 Comportamiento de BAL durante el proceso de FML empleando una inoculación secuencial.

Cada punto representa el valor medio de tres repeticiones.

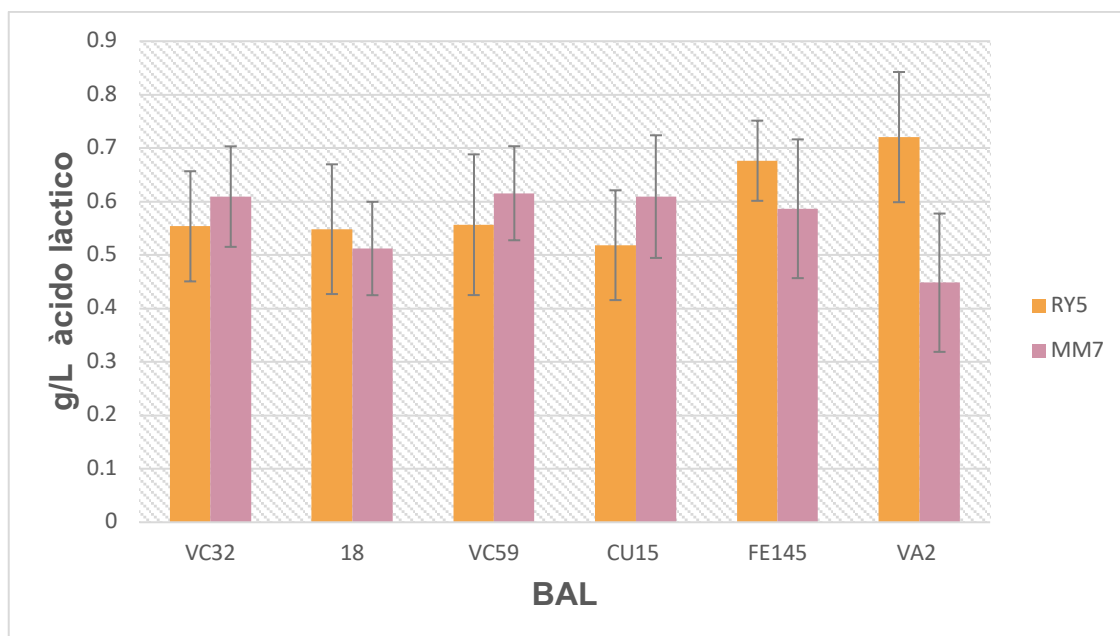


Figura 5. 6 Producción de ácido láctico derivado de la interacción levadura-BAL.

Las barras representan el valor medio de tres repeticiones y su desviación estándar.

5.2.4. Detección de cepas BAL productoras de aminas biogénicas (AB)

De acuerdo a lo reportado por Bonkova *et al.*(2013), histamina, tiramina y putrescina son las 3 AB con el mayor reporte de incidencia en alimentos fermentados. Por ello, las 6 cepas BAL seleccionadas en el análisis previo fueron sometidas a un proceso de extracción de ADN, para posteriormente detectar aquellas con potencial para la producción de AB, esto mediante la técnica de PCR múltiple dirigida a genes asociados a la producción de las tres AB previamente mencionadas (Bozic *et al.*, 2022).

De las 6 cepas evaluadas, ninguna mostró capacidad genética para producir AB (Figura 5.7), lo cual resulta benéfico para este estudio, ya que al ser utilizadas para la elaboración de un producto alimenticio, se desea que esté libre de sustancias que pudieran poner en riesgo la salud de quien lo consuma.

Para muchos productos alimenticios, la fermentación con cultivos iniciadores de BAL es una parte esencial del proceso de producción, por lo cual, la inducción de la FML empleando estos cultivos iniciadores seleccionados se está convirtiendo en la mejor opción a nivel industrial (Smid *et al.*, 2005; Sánchez *et al.*, 2012).

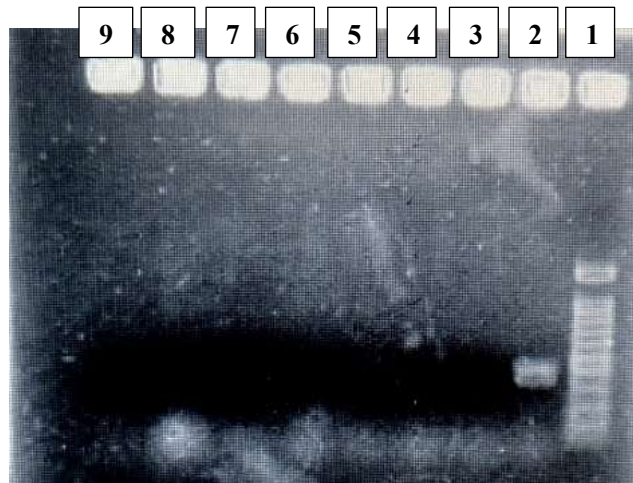


Figura 5. 7 Productos de la PCR múltiplex dirigida a genes asociados con la producción de AB. Carril 1: marcador de peso molecular (100 pb); carril 2: cepa control de producción de histamina (ATCC 33222); carril 3: control negativo; carril 4-9: cepas BAL (VC32, 18, CU15, VC59, FE145 y VA2).

Es importante tener en cuenta que no todas las cepas BAL son buenas candidatas para ser utilizadas como iniciadores. Hoy en día, los atributos sensoriales deseables y la reducción de los riesgos toxicológicos se consideran criterios de selección importantes además de una actividad maloláctica eficiente (Sánchez *et al.*, 2012).

Y son precisamente las AB uno de los principales productos de deterioro en vino y en sidra y cuya producción debe evitarse para asegurar un producto final de alta calidad ya que pueden causar intoxicación alimentaria si se ingieren grandes cantidades, o si los mecanismos humanos naturales para su catabolismo están inhibidos o genéticamente deficientes en el consumidor (Cotton *et al.*, 2010; Diez-Ozaeta *et al.*, 2019).

5.3.Elaboración de sidra

La elaboración de sidra tranquila se llevó a cabo siguiendo el método tradicional, empleando la cepa de levadura nativa RY5 que tuvo mayor compatibilidad con las cepas BAL seleccionadas FE145 y VA2. Cabe mencionar que de acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba de eficiencia fermentativa, se optó por llevar a cabo una inoculación secuencial, inoculando en primera instancia la cepa RY5 la cual concluyó el

proceso de FA en 8 días, presentando valores de densidad constante ($0.9945 \text{ g/cm}^3 \pm 0.00042$).

Una vez concluida esta fase fermentativa, se inocularon las cepas BAL FE145 y VA2 para dar comienzo al proceso de FML y el cual tuvo una duración de 7 días.

5.3.1. Análisis físicos y químicos

En la Tabla 5.3 se muestran los valores obtenidos para las variables evaluadas de la sidra tranquila

Tabla 5.3 Características físicas y químicas de la sidra tranquila antes de la fermentación maloláctica

Características físicas y químicas	Valor¹
pH	4.11 ± 0.008
Acidez titulable (g/L de ácido málico)	3.752 ± 0.16
Grado alcohólico (°GL)	7.975 ± 1.05
°Brix	5.45 ± 0.1
Azúcares reductores (g/L de sacarosa)	1.225 ± 0.509
Acidez volátil (g ácido acético/L)	0.297 ± 0.0282
SO₂ (mg/L)	79.314 ± 0.922

¹Medias provenientes de 3 repeticiones

a) Acidez total titulable y pH

El mosto de manzana contiene una gran variedad de componentes que imparten ciertas características a la sidra, entre los que destacan azúcares, alcoholes, aminoácidos, compuestos fenólicos y ácidos orgánicos (Zhang *et al.*, 2010). Estos últimos le aportan una característica ácida influyendo en el pH y su estabilidad química, contribuyendo a un equilibrio en aromas, sabores y color además de inhibir la acción de algunos microorganismos indeseables (Kerem *et al.*, 2004; León-Teutli *et al.*, 2020).

El pH inicial del mosto fue de 3.44 y al concluir la fermentación alcohólica se elevó a 4.11. Wei *et al.* (2020) evaluaron la variación del pH durante la fermentación del mosto de manzana de la variedad 'Fuji', empleando levaduras no-*Saccharomyces P.*

kluyveri X31-10 (Pk), *H. vineae* X11-10 (Hv), *H. uvarum* X22-9 (Hu), y *T. quercuum* X24-4 (Tq) inoculadas individualmente y en parejas; partieron de un mosto con pH de 3.81 ± 0.002 y al final del proceso fermentativo el pH se incrementó en la mayoría de las sidras inoculadas, con excepción del mosto control con Pk, el cual disminuyó su pH a 3.67 ± 0.01 . Este comportamiento se ve favorecido por la disminución de la acidez durante la fermentación alcohólica donde pudiera estarse produciendo etanol a partir del ácido málico presente en el mosto disminuyendo así su carácter ácido (Mangas *et al.*, 2010).

En cuanto a la ATT hubo un ligero descenso en los valores de esta variable, y era de esperarse debido a la actividad de las cepas BAL inoculadas. Para llevar a cabo la FML se partió de una sidra base, una vez concluida la fase de FA se llevó a cabo la inoculación de las dos cepas BAL a evaluar; una vez finalizado el proceso se obtuvieron valores de 3.58 y 3.52 g/L de ácido málico con las cepas FE145 y VA2, respectivamente, ambos tratamientos fueron significativamente diferentes con respecto al control (Tabla 5.4); siendo la cepa VA2 la que mostró el mayor descenso en la ATT, lo que supone una mayor desacidificación del medio, contribuyendo al perfil de aromas y logrando una estabilidad microbiana al convertir mayores cantidades de ácido málico en ácido láctico (Hu *et al.*, 2021). Cabe señalar que ambos valores obtenidos se encuentran en el límite mínimo permitido por la norma NOM-199-SCFI-2017 (3.5-7.5 g/L ácido málico).

Tabla 5. 4 pH y acidez total titulable de la sidra tranquila después de la FML con BAL seleccionada

Parámetro	Inicial	Final	
		FE145	VA2
pH	4.11 ± 0.008	$4.22 \pm 0.005a$	$4.20 \pm 0.005b$
ATT (g/L de ácido málico)	3.752 ± 0.16	$3.584.20 \pm 0.048a$	$3.524.20 \pm 0.048b$

Medias provenientes de tres repeticiones \pm desviación estándar. Dentro de una fila medias conectadas por la misma letra son significativamente iguales ($P < 0.05$).

La importancia de la medición y control de la ATT, radica en la notable influencia que esta ejerce sobre una variedad de características de la sidra, estando directamente relacionada con su estabilidad microbiológica y química y teniendo un fuerte impacto en los atributos organolépticos del producto final (Sánchez *et al.*, 2019).

b) Grado alcohólico

Durante el proceso de fermentación de la sidra, el mosto de manzana sufre una gran cantidad de transformaciones bioquímicas cuyo control es fundamental para obtener una sidra de alta calidad. Uno de los más relevantes es la fermentación alcohólica, donde las levaduras transforman la mayoría de los azúcares del mosto en etanol y CO₂ (de la Roza *et al.*, 2003). El grado alcohólico de la sidra y cualquier otra bebida fermentada, está directamente relacionado con la concentración de azúcares inicialmente presentes en el mosto. Un mosto para sidra de 15.8 °Bx equivale aproximadamente a 144.8 g/L en azúcares totales, que correspondería a un grado alcohólico potencial de 8.6 (Pereda, 2011).

El contenido inicial de azúcares en el mosto en el presente trabajo fue de 16° Brix (146.63 g/L de azúcares totales), generándose una sidra con 7.98 °GL, mediante la acción de la cepa de levadura nativa RY5. El rendimiento de azúcar/alcohol fue de 18.37 g azúcar/ ° GL, mayor a lo obtenido por León-Teutli *et al.*, 2020 para la cepa MM7 (16.48 g azúcar/ ° GL) y la cepa comercial K1 (18.17 g azúcar/ ° GL).

Por su parte, el grado alcohólico obtenido (7.98 °GL) excede los límites permisibles por la norma NOM-199-SCFI-2017 (de 3 a 6 °GL), sin embargo, en otros países como es el caso de la región española de Asturias que cuenta con amplia tradición en elaboración y consumo de esta bebida fermentada, las sidras pueden llegar a tener 8 °GL esto varía dependiendo de la variedad de manzana empleada, cantidad inicial de azúcares presentes, así como el microorganismo que lleve a cabo el proceso fermentativo y su capacidad de conversión y degradación de azúcares.

a) Azúcares residuales

El mosto de manzana es abundante en azúcares solubles y carbohidratos estructurales (Jin *et al.*, 2019). Entre los azúcares fermentables, la fructosa es el mayoritario (alrededor de 60-65 g/L), seguido de sacarosa y glucosa. Al concluir la fase de fermentación alcohólica, se dice que la sidra está desprovista de azúcares, sin embargo, hay ciertos azúcares que las levaduras son incapaces de metabolizar, como xilosa y arabinosa por mencionar algunas. Incluso pueden encontrarse también pequeñas cantidades de fructosa residual (1-2 g/L) (Iribas & Chasco, 2005).

El valor de azúcares residuales en la sidra elaborada para fines de este trabajo fue de 1.225 g/L, de acuerdo a la norma NOM-199-SCFI-2017 se clasificaría entonces como una sidra seca, pues se encuentra muy por debajo de los 10 g/L que es el valor máximo dentro de esta categoría.

León-teutli *et al.* (2020) elaboró sidra a partir de la misma variedad de manzana ('Golden delicious') empleando la levadura nativa MM7 y la comercial K1, obteniendo valores de 1.70 g/L y 1.78 g/L de azúcares residuales, respectivamente. Cabe mencionar, que la cepa nativa RY5 obtuvo valores ligeramente más bajos que estas dos mencionadas anteriormente, por lo que puede decirse que RY5 demostró ser una buena fermentadora.

b) Acidez volátil

La acidez volátil corresponde a la concentración de ácidos libres tales como acético, propiónico, butírico y sulfúrico. Lo que se espera en la determinación de esta variable son valores bajos, ya que si la acidez volátil llegara a ser muy elevada, con el paso del tiempo la presencia de grandes cantidades de ácido acético y los demás ácidos involucrados pueden llegar a alterar la consistencia y sabor del producto (Gallego, 2008).

Como se muestra en la Tabla 5.3 el valor de acidez volátil obtenido fue de 0.297 g ácido acético/L, el cual se encuentra dentro de los límites permisibles por la norma (1.2 g ácido acético/L). Cabe señalar que valores arriba de 1 g ácido acético/L puede ser percibido ya sea por gusto u olfato (Herrero, 1999).

Ramírez-Mora *et al.* (2005) evaluaron el efecto de la levadura sobre diversas variables físicas y químicas, dentro de ellas la acidez volátil. Se emplearon tres cepas de levaduras *S. cerevisiae*, una de ellas usada para panificación se obtuvieron niveles de 0.454, 0.555 y 0.935 g ácido acético/L, respectivamente, todos inferiores tanto a los límites permitidos por la norma como a la concentración requerida para poder ser percibida. Sin embargo, los tres valores, un poco por arriba del obtenido en este estudio.

c) Anhídrido sulfuroso total

A pesar de que el SO₂ es un aditivo versátil y eficaz por sus propiedades antisépticas y antioxidantes ejerciendo una acción diferencial en las poblaciones microbianas de vinos y sidras, este compuesto se ha relacionado con intolerancias o incluso reacciones alérgicas en algunos consumidores (Santos *et al.*, 2013), lo que ha

llevado a las autoridades sanitarias a regular los niveles aceptables en estas bebidas (Saidane *et al.*, 2013).

En la Tabla 5.3 se puede apreciar que el valor de SO₂ total obtenido en esta sidra fue de 79.314 mg/L, el cual se encuentra muy por debajo de los niveles máximos permitidos por la norma NOM-199-SCFI-2017 (300 mg/L de SO₂), por lo cual puede considerarse un producto apropiado para el consumo.

d) Determinación de ácido láctico

El ácido L-láctico es producido naturalmente por BAL y se encuentra presente en una diversidad de alimentos y bebidas fermentadas. En la industria del vino y la sidra, el curso de la FML se controla siguiendo el descenso de la concentración de ácido L-málico y el nivel creciente de ácido L-láctico (Megazyme, 2018). En la Tabla 5.5 se observan las concentraciones obtenidas en g/L de ácido láctico en cada uno de los 3 tratamientos evaluados. Primeramente, las sidras sometidas a un proceso de FML, en donde se analizó el comportamiento de las BAL VA2 y FE145 se obtuvieron valores de 0.296 g/L y 0.267 g/L de ácido láctico respectivamente. La sidra control, la cual únicamente pasó por el proceso de FA mostró un valor de 0.155 g/L de ácido láctico. Aunque ninguno de los tratamientos tuvo diferencias significativas, se puede observar que la cepa BAL que demostró una mayor capacidad de degradación de ácido málico a ácido láctico fue la VA2.

Tabla 5. 5 Producción de ácido láctico de cada uno de los tratamientos evaluados

Tipo de fermentación	Tratamiento	g/L ácido láctico
FA	S/BAL	0.155 ± 0.063 ^a
FML	VA2	0.296 ± 0.037 ^a
	FE145	0.267 ± 0.14 ^a

Medias provenientes de tres repeticiones ± desviación estándar. Dentro de una columna medias conectadas por la misma letra son significativamente iguales (P<0.05)

Zuriarrain *et al.* (2015), llevaron a cabo la cuantificación de ácido L-láctico en 10 muestras comerciales de sidra, empleando técnicas enzimáticas, obteniendo concentraciones que fueron de 0.91 hasta los 8.42 g/L de ácido láctico. Cabe mencionar que esta investigación fue realizada en territorio español, donde la manzana empleada para realizar la sidra es sembrada y cultivada para uso único en el proceso de elaboración de esta bebida, a diferencia de México, donde el fruto empleado es el mismo que se destina al consumo en fresco. Además, las características edafoclimáticas varían de una región a otra, produciéndose frutos generalmente más ácidos en países europeos, y lo cual podría explicar las cantidades tan elevadas de producción de ácido láctico en dicho estudio.

Por su parte, Chen *at al.* (2019), cuantificaron el ácido láctico total, es decir la suma de los isómeros L y D del ácido láctico, empleando jugo de manzana comercial en el cual se evaluaron 4 cepas BAL produciendo cantidades que oscilan entre 5.30 y 5.90 g/L de ácido láctico, aunque estos valores se refieren a concentraciones totales y la medición de este estudio fue únicamente del isómero L, nos sirve como punto de partida para comparar los valores obtenidos con otras sidras y las posibles razones por las cuales pueden llegar a variar. Como ya se ha venido mencionando, las características que presentan cada una de las sidras, responde en primera instancia a las características de la materia prima empleada, en este caso la manzana, además de ello, existen diversos procesos de elaboración dependiendo de la región, influyendo también factores como el clima y temperatura.

5.4. Análisis sensoriales

5.4.1. Prueba hedónica no estructurada

La prueba hedónica lineal no estructurada consistió en la evaluación de los aspectos visual, olfativo y gustativo de sidras tranquilas, y la cual fue llevada a cabo por 39 consumidores, quienes previo a la evaluación firmaron un consentimiento informado (ANEXO 1) y durante la evaluación calificaron en una escala de 0 (me disgusta mucho) a 10 (me gusta mucho).

En la Tabla 5.6 se pueden observar los resultados obtenidos para cada uno de los aspectos evaluados, recordando que se tenían tres sidras tranquilas, dos de ellas sometidas

a un proceso de FML mediante la inoculación de las cepas BAL: VA2 y FE145, y la levadura RY5 que únicamente pasó por el proceso de FA.

Tabla 5. 6 Evaluación sensorial por medio de prueba hedónica de sidras tranquilas sometidas a FML

Tratamiento	Visual	Olfativo	Gustativo
RY5	5.26±1.86 ^b	5.96±2.32 ^a	5.31±2.23 ^a
VA2	7.71±1.77 ^a	6.83±2.23 ^a	6.15±2.32 ^a
FE145	7.07±1.95 ^a	6.06±2.36 ^a	5.58±2.35 ^a

Medias provenientes de tres repeticiones ± desviación estándar. Dentro de una columna medias conectadas por la misma letra son significativamente iguales (P<0.05)

Para el aspecto visual, se puede apreciar que los mayores puntajes otorgados fueron para las sidras con FML con las cepas BAL, VA2 y FE145 y las cuales, no presentan diferencias significativas entre sí. La sidra RY5 (solo con FA), fue la que presentaba una mayor turbidez, una característica negativa en cuanto a apariencia y aceptación general del producto y la cual se vió reflejada en las bajas calificaciones proporcionadas por los evaluadores.

La cepa de levadura nativa, RY5, fue evaluada previamente por León-Teutli *et al.* (2020) y en combinación con la cepa MM7, fueron los tratamientos que presentaron las evaluaciones más bajas, a pesar de ser dos de las cepas que presentaron una mayor capacidad de floculación. Cabe mencionar que la turbidez de los mostos se ve afectada por diversos factores, destacando el método de extracción y prensado, estado de madurez y la limpieza y desinfección del fruto, así como la presencia de compuestos tánicos y proteicos, los cuales se encargan de facilitar la suspensión de componentes que lo enturbian (Eugenin, 2019; Quicazán *et al.*, 2019).

En lo que respecta al aspecto olfativo ninguno de los tres tratamientos mostró diferencias significativas, sin embargo, el tratamiento con la cepa VA2 fue la que tuvo la mayor preferencia por parte de los consumidores, quien en su mayoría coincidió que fue la sidra que presentó un mayor aroma frutal y dulce. Por su parte la sidra RY5 es la que obtuvo el puntaje más bajo en esta evaluación, coincidiendo con los resultados obtenidos por León-Teutli *et al.* (2020), donde los jueces otorgaron calificaciones bajas a esta cepa

al percibir aromas a fósforo y floral. Lerm *et al.* (2011) indican que la inoculación de ciertas cepas BAL al mosto podrían modificar significativamente el perfil aromático de la bebida que se esté produciendo, debido a la diversidad del perfil enzimático que estos microorganismos podrían presentar sobre algunos otros, como es el caso de las levaduras. Por ejemplo, se ha demostrado que cepas de *L. plantarum* pueden llegar a sintetizar péptidos antimicrobianos que pudieran ayudar a prevenir la producción de compuestos no deseados, mediante la inhibición de la microbiota presente de forma natural en el mosto (Sun *et al.*, 2016).

De la misma forma que para el aspecto olfativo, en el gustativo no se aprecian diferencias significativas en ninguno de los tres tratamientos. No obstante, es apreciable que las mejores evaluaciones fueron obtenidas por las sidras inoculadas con las BAL, las cuales son producto del proceso de FML cuya finalidad es la de desacidificar la sidra, mejorar su estabilidad microbiana, así como otorgar sabores más agradables y palpables al gusto (Henschke *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2020). Los evaluadores señalaron que la sidra RY5 era la que presentaba una mayor acentuación en sabores ácidos y astringentes, mostrando mayor preferencia sobre las otras dos sidras que presentaban sabores más dulces, destacando en este sentido la cepa VA2.

En México, no se acostumbra a beber sidra de forma habitual, y la que se acostumbra es una sidra dulce, por lo que podría decir que nuestro paladar no está familiarizado con los sabores que esta pudiera llegar a tener, y sobre todo en comparación con algunos países europeos, donde tienen una mayor cultura en la producción y consumo de esta bebida, además con sabores que tienden a ser más ácidos y pocos dulces.

De esta evaluación se puede resaltar que las sidras inoculadas con cepas BAL tienen una mayor aceptación en el gusto del consumidor, y esto se debe al proceso bioquímico al que son sometidas, generando sabores y olores más suaves, agradables y acordes al gusto del consumidor mexicano.

VI. CONCLUSIONES

Aislamiento y selección de BAL

- Las cepas BAL aisladas de mosto de manzana no demostraron potencial fermentativo ante condiciones estresantes en medio tipo sidra.
- La mayor compatibilidad con las BAL seleccionadas (FE145 y VA2) fue con la levadura nativa RY5, sugiriendo un comportamiento dependiente de la cepa de levadura.
- Ninguna de las cepas seleccionadas resultó ser productora de AB, asegurando así que su uso en la elaboración de sidra no tendrá algún problema perjudicial asociado a las toxinas producidas por estas.
- La inoculación secuencial favorece la sobrevivencia de las BAL en la producción de fermentados, como es el caso de la sidra.

Elaboración de sidras tranquilas

- Las sidras tranquilas obtenidas a partir de la fermentación con las cepas de levaduras y BAL presentaron características físicas y químicas dentro de los rangos establecidos por la norma NOM-199-SCFI-2017.
- Las sidras sometidas al proceso de FML mejoran la aceptación con base a sus características organolépticas por parte de los evaluadores.

VII. REFERENCIAS

- Alexandre, H., Costello, P. J., Remize, F., Guzzo, J., & Guilloux-Benatier, M. (2004). *Saccharomyces cerevisiae*–*Oenococcus oeni* interactions in wine: current knowledge and perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, 93(2), 141-154
- Arias, V. M. (2015). *MF1064_3* - Aprovechamiento en restauración. Ed.ELEARNING S.L.: Madrid, España: 396p.
- Arribas, M. V. M. (2011). *El vino* (Vol. 20). Editorial CSIC-CSIC Press:Madrid, España. 100p.
- Ayivi, R. D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S. O., Worku, M., Tahergorabi, R., ... & Ibrahim, S. A. (2020). Lactic acid bacteria: Food Safety and Human Health applications. *Dairy*, 1(3), 202-232.
- Azhar, S. H. M., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Faik, A. A. M., et al. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10, 52–61.
- Balmaseda, A., Bordons, A., Reguant, C., & Bautista-Gallego, J. (2018). Non-*Saccharomyces* in wine: Effect upon *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 534
- Balmaseda, A., Rozès, N., Bordons, A., & Reguant, C. (2021). Simulated lees of different yeast species modify the performance of malolactic fermentation by *Oenococcus oeni* in wine-like medium. *Food Microbiology*, 103839.
- Baraona Cockrell, M. & Sancho Barrantes, E. (1992). Manzana, melocotón, fresa y mora (No. 634.11 B225m). EUNED.
- Bartowsky, E. J. (2005). *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation—moving into the molecular arena. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 174-187.

- Bartowsky, E. J., & Borneman, A. R. (2011). Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(3), 441-447.
- Bordons, A., & Reguant, C. (2013). Bioquímica de las bacterias lácticas del vino y la fermentación maloláctica. *Revista SEBBM* (176), 14-16.
- Božič, J. T., Butinar, L., Marušič, M. B., Korte, D., & Vodopivec, B. M. (2022). Determination of biogenic amines formation by autochthonous lactic acid bacteria from 'Refošk' grapes using different analytical methods. *LWT*, 156, 112908.
- Camelo, A. (2003). Manual para la preparación y venta de frutas y hortalizas. Roma, Italia: Servicios Agrícolas de la FAO. 207pp.
- Campos, F. M., Couto, J. A., Figueiredo, A. R., Tóth, I. V., Rangel, A. O., & Hogg, T. A. (2009). Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 135(2), 144-151.
- Cappello, M. S., Zapparoli, G., Logrieco, A., & Bartowsky, E. J. (2017). Linking wine lactic acid bacteria diversity with wine aroma and flavour. *International journal of food microbiology*, 243, 16-27
- Cañas, P. I., Romero, E. G., Alonso, S. G. & Herreros, M. P. (2008). Changes in the aromatic composition of Tempranillo wines during spontaneous malolactic fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(8), 724-730.
- Cárdenas, J. & 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.

- Carreté, R., Vidal, M. T., Bordons, A. & Constantí, M. (2002). Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiology Letters*, 211(2), 155-159.
- Carr, F. J., Chill, D. & Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281-370.
- CEE. (1990). Analyses des mouts et des vins. *Journal Officiel des Communautés Européenne*, 2676 (90): 52–57.
- Chaïb, A., Claisse, O., Delbarre, E., Bosviel, J., & Le Marrec, C. (2022). Assessment of the lysogenic status in the lactic acid bacterium *O. oeni* during the spontaneous malolactic fermentation of red wines. *Food Microbiology*, 103, 103947.
- Chen, C., Lu, Y., Yu, H., Chen, Z. & Tian, H. (2019). Influence of 4 lactic acid bacteria on the flavor profile of fermented apple juice. *Food Bioscience* 27: 30-36.
- Clarke, G., Cryan, J. F., Dinan, T. G. & Quigley, E. M. (2012). probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome—focus on lactic acid bacteria. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 35(4), 403-413.
- Coque, M., Díaz, M. & García, J. (2012). El cultivo del manzano: Variedades de sidra y de mesa. España: Ed. Mundi-Prensa. pp.11-13
- Coton, M., Romano, A., Spano, G., Ziegler, K., Vetrana, C., Desmarais, C., & Coton, E. (2010). Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiology*, 27(8), 1078-1085
- Couchenehy F., Desroche N., Bou M., Tourdot-Maréchal R., Dalau L. & Guzzo J. (2005). A new approach for selection of *Oenococcus oeni* strains in order to produce malolactic starters. *International Journal of Food Microbiology* 105:463-470.
- da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J. M. D. & de Souza Oliveira, R. P. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 527-536.

- Da Silveira, M. G. & Abee, T. (2009). Activity of ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells: a flow cytometric approach. *Journal of Applied Microbiology*, 106(5), 1690-1696.
- De las Rivas, B., Marcobal, A., Crrascosa, A., Muñoz, R. (2006). Pcr detection of foodborne bacteria producing the biogenic amines histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine. *Journal of Food Protection*, 69, 2509–2514.
- de la Roza, C., Laca, A., García, L. A., & Díaz, M. (2003). Ethanol and ethyl acetate production during the cider fermentation from laboratory to industrial scale. *Process Biochemistry*, 38(10), 1451-1456.
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33(1), 1-10.
- Diez-Ozaeta, I., Amarita, F., Lavilla, M., & Rainieri, S. (2019). Ecology of indigenous lactic acid bacteria from Rioja Alavesa red wines, focusing on biogenic amine production ability. *LWT*, 116, 108544.
- Doyle, M. P., & Meng, Jianghong (2006). *Bacteria in food and beverage production*. Ed. Prokaryotes. Springer, New York, USA. 797-811.
- Elsanhoty, R., Ramadan M. (2016). Genetic screening of biogenic amines production capacity from some lactic acid bacteria strains. *Food Control*, 68, 220-228.
- Eugenin, E. A. S. (2019). *Fundamentos Para La producción De Sidra y Destilado De Manzana En Chile* (Doctoral dissertation, Pontificia Universidad Católica de Chile (Chile)).
- Faria-Oliveira, F., Puga, S. & Ferreir, C. (2013). Yeast: World's Finest Chef. In *Food Industry*. 529–539 pp. Recuperado en febrero 2020 de: <https://doi.org/10.5772/53156>

- Fernández-Pérez, R., Rodríguez, C. T., & Ruiz-Larrea, F. (2019). Fluorescence microscopy to monitor wine malolactic fermentation. *Food Chemistry*, 274, 228-233.
- Fernández, R., Parra, R., Pérez, S., Vera, M. & Zacatenco, G. (2010). Variedades de manzana recomendadas para las serranías de Hidalgo y Querétaro. México, D.F. 7 p.
- Figueiredo, A. R., Campos, F., de Freitas, V., Hogg, T. & Couto, J. A. (2008). Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Food Microbiology*, 25(1), 105-112.
- Fleet, G. H. (2008). Wine yeasts for the future. *FEMS yeast research*, 8(7), 979-995.
- Flores, M. G., Rodríguez, M. E., Oteiza, J. M., Barbagelata, R. J., & Lopes, C. A. (2017). Physiological characterization of *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces eubayanus* from Patagonia and their potential for cidermaking. *International Journal of Food Microbiology*, 249, 9-17.
- Fundación para la Cultura del Vino (2006). INFORME TÉCNICO. Fermentación maloláctica (FML). Madrid: Fundación para la Cultura del Vino.
- Gallego, J. G. (2008). Maridaje, enología y cata de vinos. Innovación y Cualificación.
- García-Ruiz, A., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J. & Bartolomé, B. (2011). Comparative study of the inhibitory effects of wine polyphenols on the growth of enological lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 145(2-3), 426-431.
- Gonzalez Flores, M. (2019). *Saccharomyces uvarum* de ambientes naturales y bebidas fermentadas de la Norpatagonia: caracterización y potencial para elaborar sidras a bajas temperaturas.
- Guarcello R., De Angelis M., Settanni L., Formiglio S., Gaglio R., Minervini F., Moschetti G., Gobbetti M., (2016). Selection of amine-oxidizing dairy lactic acid

- bacteria and identification of the enzyme and gene involved in the decrease of biogenic amines. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 23, pp 6870-6880
- Hancock, J., Luby., Brown, S. & Lobos, G. (2008). *Apples. In: J.F. Hancock eds., Temperate Fruit Crop Breeding: Germplasm to Genomics. Estados Unidos. Ed. Springer Science & Business Media. p.1–38.*
- Harris, S. A., Robinson, J. P. & Juniper, B. E. (2002). Genetic clues to the origin of the apple. *Trends in Genetics*, 18(8), 426–430.
- Henschke, P. A., Costello, P. J., & Bartowsky, E. (2002). Management of malolactic fermentation: wine flavour manipulation. *Australian and New Zealand grapegrower and winemaker*, (461), 7-14
- Hernandez, A. G. D. (2010). *Tratado de nutricion/Nutrition Treatise: Composicion y Calidad Nutritiva de los Alimentos/Composition and nutritional quality of foods (Vol. 2). Ed. Médica Panamericana.*
- Herrero, M., García, L. A., & Díaz, M. (2003). Malolactic bioconversion using a *Oenococcus oeni* strain for cider production: effect of yeast extract supplementation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(12), 699-704
- Herrero, M., Gonzalo, Á. & García, L. (2010). Tecnología de la producción de sidra. Equipamiento industrial. *In: D. Blanco y J. Mangas Eds., La manzana y la sidra: bioprocesos, tecnologías de elaboración y control. Ed. D. Blanco: Asturias, España: pp. 198, 207. Asturgraf.*
- Hu, K., Zhao, H., Kang, X., Ge, X., Zheng, M., Hu, Z., & Tao, Y. (2021). Fruity aroma modifications in Merlot wines during simultaneous alcoholic and malolactic fermentations through mixed culture of *S. cerevisiae*, *P. fermentans*, and *L. brevis*. *LWT*, 112711

- ICEX (2018). El consumo mundial de manzanas crece gracias al apetito asiático. Recuperado el 26 de enero de 2020 de: <https://www.icex.es/icex/es/Navegacion-zona-contacto/revista-el-exportador/noticias/NEW2018792728.html>
- Iorizzo M., Testa B., Lombardi S.J., García-Ruiz A., Muñoz-González C., Bartolomé B., & Moreno Arribas M.V. 2016. Selection and technological potential of *Lactobacillus plantarum* bacteria suitable for wine malolactic fermentation and grape aroma release. *LWT - Food Sci Technol* Doi: 10.1016/j.lwt.2016.06.062.
- Iribas, A. I., & Chasco, M. T. D. 4 (2005). Microbiología de la sidra.
- Jiang, J., Sunby, K. M., Sundstrom, J. F., Grbin, P. R. & Jiranek, V. (2018). Directed evolution of *Oenococcus oeni* strains for more efficient malolactic fermentation in a multi-stressor wine environment. *Food Microbiology*, 73, 150-159.
- Jin, Q., Qureshi, N., Wang, H., & Huang, H. (2019). Acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation of soluble and hydrolyzed sugars in apple pomace by *Clostridium beijerinckii* P260. *Fuel*, 244, 536-544.
- Jolly, N. P., Augustyn, O. P. H., & Pretorius, I. S. (2003). The occurrence of non-*Saccharomyces cerevisiae* yeast species over three vintages in four vineyards and grape musts from four production regions of the Western Cape, South Africa. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 24(2), 35-42.
- Kerem, Z., Bravdo, B., Shoseyov, O. and Tugendhaft, Y. (2004). Rapid liquid chromatography–ultraviolet determination of organic acids and phenolic compounds in red wine and must. *Journal of Chromatography* 1052: 211–215.
- Kurtzman, C., Fell, J. W., & Boekhout, T. (Eds.). (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Ed. Elsevier: Oxford, Reino Unido. 1076p.
- Ladero, V., Coton, M., Fernández, M., Buron, N., Martín, M. C., Guichard, H., ... & Alvarez, M. A. (2011). Biogenic amines content in Spanish and French natural ciders: application of qPCR for quantitative detection of biogenic amine-producers. *Food microbiology*, 28(3), 554-561.

- Lai, E. P., Iqbal, Z., & Avis, T. J. (2016). Combating antimicrobial resistance in foodborne microorganisms. *Journal of Food Protection*, 79(2), 321-336.
- Larsen, J. T., Nielsen, J. C., Kramp, B., Richelieu, M., Bjerring, P., Riisager, M. J. & Edwards, C. G. (2003). Impact of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* on malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(4), 246-251.
- Lehane, L., Olley, J., 2000. Histamine fish poisoning revisited. *Int. J. Food Microbiol.* 58, 1e37.
- León-Teutli, A. K., Hernández-Iturriaga, M., Miranda-Castilleja, D. E., Aldrete-Tapia, J. A., Soto-Muñoz, L., & 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(1), 29-47.
- Lerm E., Engelbrecht L. and du Toit M. (2010) Malolactic Fermentation: The ABC's of MLF. *South Africa Journal for Enology and Viticulture*. 31(2):186-212
- Lerm E., Engelbrecht L. & du Toit M. (2011). Selection and characterization of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* South African wine isolates for use as malolactic fermentation starter cultures. *South Africa Journal for Enology and Viticulture*. 32(2): 280-291.
- Li, C. X., Zhao, X. H., Zuo, W. F., Zhang, T. L., Zhang, Z. Y., & Chen, X. S. (2020). The effects of simultaneous and sequential inoculation of yeast and autochthonous *Oenococcus oeni* on the chemical composition of red-fleshed apple cider. *LWT*, 124, 109184
- Li, S., Tao, Y., Li, D., Wen, G., Zhou, J., Manickam, S., ... & Chai, W. S. (2021). Fermentation of blueberry juices using autochthonous lactic acid bacteria isolated from fruit environment: Fermentation characteristics and evolution of phenolic profiles. *Chemosphere*, 276, 130090.

- Lorencová, E., Salek, R. N., Buňková, L., Szczybrochová, M., Černíková, M., & Buňka, F. (2021). Assessment of biogenic amines profile in ciders from the Central Europe region as affected by storage time. *Food Bioscience*, 41, 100957.
- Lorentzen, M. P., Campbell-Sills, H., Jorgensen, T. S., Nielsen, T. K., Coton, M., Coton, E., ... & Lucas, P. M. (2019). Expanding the biodiversity of *Oenococcus oeni* through comparative genomics of apple cider and kombucha strains. *BMC genomics*, 20(1), 1-15.
- Lorenzini, M., Simonato, B., Slaghenaufi, D., Ugliano, M., & Zapparoli, G. (2019). Assessment of yeasts for apple juice fermentation and production of cider volatile compounds. *LWT-Food and Science and Technology*, 99, 224-230.
- Lucio, O., Pardo, I., Heras, J. M., Krieger, S., & Ferrer, S. (2018). Influence of yeast strains on managing wine acidity using *Lactobacillus plantarum*. *Food control*, 92, 471-478
- Mangas-Alonso, J. J.; Díaz-Llorente, D.; Botas-Velasco, C.; Blanco-Gomis, D.; Dueñas-Chasco, M. T.; Herrero, M. & 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. D. Blanco: Asturias, España: p. 12-221.
- Mendes Ferreira, A., & Mendes-Faia, A. (2020). The role of yeasts and lactic acid bacteria on the metabolism of organic acids during winemaking. *Foods*, 9(9), 1231
- Mendoza-González, S., Martínez-Peniche, R. Á., Fernández-Montes, M. R., Rumayor-Flores, A., & Castillo-Castañeda, E. (2008). Época de maduración y calidad del fruto de genotipos de manzana en Cadereyta, Qro. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 14(1), 71-78.
- Mendoza, L. M., de Nadra, M. C. M., & Farías, M. E. (2010). Antagonistic interaction between yeasts and lactic acid bacteria of oenological relevance: Partial characterization of inhibitory compounds produced by yeasts. *Food Research International*, 43(8), 1990-1998.

- Manera, C., Bravo-Ferrada, B. M., Tymczynszyn, E., Delfederico, L., Olguín, N., Semorile, L. C., & Valdés La Hens, D. (2017). Aislamiento y selección de cepas psicrotolerantes de bacterias lácticas enológicas de la región patagónica. In IV Congreso Internacional Científico y Tecnológico-CONCYT 2017. Recuperado en marzo de 2020 de <https://digital.cic.gba.gob.ar/handle/11746/6684>
- Marmolejo, X. Y. O. (2021). Producción de aminas biogénicas y susceptibilidad a germicidas de bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos fermentados.
- Megazyme. (2018). Obtenido de https://www.megazyme.com/documents/Assay_Protocol/K-LATE_DATA.pdf
- Miranda-Castilleja, D. E., Ortiz-Barrera, E., Arvizu-Medrano, S. M., Ramiro-Pacheco, J., Aldrete-Tápia, J. A., & Martínez-Peniche, R. Á. (2015). Aislamiento, selección e identificación de levaduras *Saccharomyces* spp. nativas de viñedos en Querétaro, México. *Agrociencia*, 49(7), 759-773.
- Miyoshi, A., Rochat, T., Gratadoux, J. J., Le Loir, Y., Oliveira, S. C., Langella, P., & Azevedo, V. (2003). Oxidative stress in *Lactococcus lactis*. *Genetics and Molecular Research*, 2(4), 348-359.
- Moguel-Antonio, G. (2020). Influencia de la levadura en el perfil sensorial y de los compuestos volátiles de sidra espumosa artesanal elaborada con dos cultivares de manzana. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México. 119 p.
- Montoya, H. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines* (2ª Ed.). Ed. Universidad de Antioquia. Antioquia, Colombia. 160 p.
- NCBI. (2017). Taxonomy browser. Recuperado el 26 de enero de 2020, a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=3750>
- Nehme, N., Mathieu, F., & Taillandier, P. (2008). Quantitative study of interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* strains. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(7), 685-693.

- Nehme, N., Mathieu, F., & Taillandier, P. (2010). Impact of the co-culture of *Saccharomyces cerevisiae*–*Oenococcus oeni* on malolactic fermentation and partial characterization of a yeast-derived inhibitory peptidic fraction. *Food Microbiology*, 27(1), 150-157.
- OIV. (2016). Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts (vol. 2). Paris. Recuperado en septiembre 2021 de:<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.). Recuperado en septiembre 2021 de:<http://www.oiv.int/fr/normes-et-documents-techniques/methodes-danalyse/recueil-des-methodes-internationales-danalyse-des-vins-et-des-mouts-2-vol>
- Osborne, J. P. & Edwards, C. G. (2006). Inhibition of malolactic fermentation by *Saccharomyces* during alcoholic fermentation under low-and high-nitrogen conditions: a study in synthetic media. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(1), 69-78.
- Pando, R., Querol, A. & Suárez, B. (2010). Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. *Food Microbiology* 27: 503–508.
- Pereda, M. (2011). Elaboración de sidra natural ecológica. Ed. Mundi-Prensa. España: 66, 115-117.
- Phipps, J. B., Robertson, K. R., Smith, P. G., & Rohrer, J. R. (1990). A checklist of the subfamily Maloideae (Rosaceae). *Canadian Journal of Botany*, 68(10), 2209-2269.

- Prieto, V. M. G., Chacón, A. R., Avitia, J. A. O., Reyes, D. I. B., Béjar, A. A. G., & Quezada, R. Á. P. (2006). Polinización en manzanos *red delicious* y *golden delicious*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29(1), 41-45.
- Quicazán, M. C., Cuenca, M. M., & Paz, A. B. (2019). Producción de hidromiel en el contexto de la apicultura en Colombia. Universidad Nacional de Colombia.
- Ramírez, E.; Martínez, R. & Fernández, M. (2005). Efecto de la concentración de azúcar y la cepa de levadura en la calidad de sidra espumosa. *Brazilian Journal of Food Technology*, 6(1), 89-95.
- Ramírez-López, C. & Vélez-Ruiz, J. F. (2016). Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas autóctonas de leche y queso fresco artesanal de cabra. *Información Tecnológica*, 27(6), 115-128.
- Ramírez-Mora, E., Martínez, R. A., & Fernández-Montes, M. R. (2005). Efecto de la concentración de azúcar y la cepa de levadura en la calidad de sidra espumosa. *Brazilian Journal of Food Technology*, 5, 89-95.
- Ramirez Ramirez, J. C., Rosas Ulloa, Petra, Velázquez González, M. Y., Ulloa, J. A., & Arce Romero, Francisco. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *CONACYT*. Recuperado en marzo de 2020 de <http://dspace.uan.mx:8080/jspui/handle/123456789/436>
- Redagícola (2017). Manzana, un mercado de alta competitividad y complejidad. Recuperado el 24 de enero de 2020 de: <http://www.redagricola.com/cl/un-mercado-de-alta-competitividad-y-complejidad/>
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (Eds.). (2006). *Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications*. Ed. John Wiley & Sons. 928p.
- Rodríguez, M. H., & Gallego, A. S. (1999). *Tratado de nutrición*. Ediciones Díaz de Santos: Madrid, España: 1499p.

- Roger, J. D. P. (2007). Salud por los alimentos. Ed. Safeliz: Madrid, España: 384pp.
- Ruiz-Barba, J. L., Maldonado-Barragán, A. & Jiménez Díaz, R. (2005). Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Analytical Biochemistry*, 347(2), 333-335
- Ruiz, P., Izquierdo, P. M., Seseña, S., & Palop, M. L. (2010). Analysis of lactic acid bacteria populations during spontaneous malolactic fermentation of Tempranillo wines at five wineries during two consecutive vintages. *Food Control*, 21(1), 70-75.
- Saez-Lara, M. J., Gomez-Llorente, C., Plaza-Diaz, J.& Gil, A. (2015). The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: a systematic review of randomized human clinical trials. *BioMed Research International*, 2015,505878.
- Saidane, D., Barbe, J. C., Birot, M., & Deleuze, H. (2013). Reducing the sulfur-dioxide binding power of sweet white wines by solid-phase extraction. *Food chemistry*, 141(1), 612-615.
- SAGARDOA (2019). Asociación de Sidra Natural de Gipuzkoa. Elaboración de la sidra. Recuperado el 1 de marzo de 2020 de : <https://www.sagardotegiak.com/sidra/produccion-sidra/como-hacer-sidra>
- SAGARPA. (2012). Plan Rector. Recuperado el 24 de marzo de 2020, a partir de <http://www.unifrut.com.mx>
- SAGARPA. (2016). Sidra tan natural como saludable. Recuperado de <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/sidra-tan-natural-como-saludable>
- SAGARPA b. (2016). La manzana, importante fuente alimenticia en el campo mexicano. Recuperado en marzo de 2020 de <https://www.gob.mx/firco/articulos/la-manzana-importante-fuente-alimenticia-en-el-campo-mexicano>

- SAGARPA (2017). Planeación Agrícola Nacional 2017-2030 (Vol. I). Manzana Mexicana.
- Sarmiento, A., & Ossa, C. N. (1993). Frutales caducifolios: manzano, peral, durazno, ciruelo. Siac-Fenalce. Ed. Siac-Fenalce: Bogotá, Colombia: 211p.
- Sánchez, A., Coton, M., Coton, E., Herrero, M., García, L. A., & Díaz, M. (2012). Prevalent lactic acid bacteria in cider cellars and efficiency of *Oenococcus oeni* strains. *Food microbiology*, 32(1), 32-37.
- Sánchez Martínez, J. I. (2005). Potencial biotecnológico de bacterias lácticas silvestres en productos lácteos fermentados: actividad metabólica y producción de exopolisacáridos (tesis doctoral). Universidad de Oviedo, Departamento de Biología Funcional y Molecular, y del Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), España.
- Sández, N., Calvo-López, A., Vidigal, S. S., Rangel, A. O., & Alonso-Chamarro, J. (2019). Automated analytical microsystem for the spectrophotometric monitoring of titratable acidity in white, rosé and red wines. *Analytica chimica acta*, 1091, 50-58.
- Santos, M. C., Nunes, C., Rocha, M. A. M., Rodrigues, A., Rocha, S. M., Saraiva, J. A., & Coimbra, M. A. (2013). Impact of high pressure treatments on the physicochemical properties of a sulphur dioxide-free white wine during bottle storage: Evidence for Maillard reaction acceleration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20, 51-58.
- SIAP a. (2020). Anuario Estadístico de la producción agrícola. Recuperado en septiembre de 2021, de: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- SIAP b. (2020). *Panorama agroalimentario 2020*. México: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Recuperado en enero 2022, de: https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2020/Atlas-Agroalimentario-2020

- SIAP c. (2020). Avance de siembras y cosechas, resumen por estado. Recuperado en septiembre de 2021, de: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do
- Sidra de Asturias (2015). [El trasiego de la sidra. Recuperado el 26 de febrero de 2020 de: http://www.sidradeasturias.es/detalle.php?var=910](http://www.sidradeasturias.es/detalle.php?var=910)
- Smid, E. J., Van Enckevort, F. J. H., Wegkamp, A., Boekhorst, J., Molenaar, D., Hugenholtz, J., ... & Teusink, B. (2005). Metabolic models for rational improvement of lactic acid bacteria as cell factories. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1326-1331
- Soto-Herrera, J.; Castillo-Castañeda, E. & 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.
- Suárez-Machín, C.; Garrido-Carralero, N. & Guevara-Rodríguez, C. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 50 (1): 20-28.
- Sumby, K. M., Grbin, P. R., & Jiranek, V. (2014). Implications of new research and technologies for malolactic fermentation in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(19), 8111-8132.
- Sun, S. Y., Gong, H. S., Liu, W. L., & Jin, C. W. (2016). Application and validation of autochthonous *Lactobacillus plantarum* starter cultures for controlled malolactic fermentation and its influence on the aromatic profile of cherry wines. *Food microbiology*, 55, 16-24.
- Valles, B. S., Bedrinana, R. P., Queipo, A. L., & Alonso, J. J. M. (2008). Screening of cider yeasts for sparkling cider production (Champenoise method). *Food*

- Microbiology, 25(5), 690-697.
- Vega, S., & Gancedo, P. (2017). *Aprovisionamiento en restauración MF1064_3*. Ed. Paraninfo S.A.: Madrid, España. 200pp.
- Velázquez, A. (2014). El precio de la manzana nacional por debajo del precio de manzana de importación. Recuperado el 4 de febrero de 2020, a partir de <http://observatoriodeprecios.com.mx/index.php/precios-productos/productos-agropecuarios/manzana/169-el-precio-de-la-manzana-nacional-por-debajo-del-precio-de-manzana-de-importacion>.
- Teng, Z., Luo, Y., Alborzi, S., Zhou, B., Chen, L., Zhang, J., ... & Wang, Q. (2018). Investigation on chlorine-based sanitization under stabilized conditions in the presence of organic load. *International Journal of Food Microbiology*, 266, 150-157.
- Teusink, B., & Molenaar, D. (2017). Systems biology of lactic acid bacteria: For food and thought. *Current Opinion in Systems Biology*, 6, 7-13.
- Togores, J. H. (2018). *Tratado de Enología*. Ed. Mundi-Prensa: Madrid, España. 1936pp.
- Watson, B. (2013). *Cider, Hard and Sweet: History, Traditions, and Making Your Own*, 3. izd.
- Wei, J., Zhang, Y., Wang, Y., Ju, H., Niu, C., Song, Z., ... & Yue, T. (2020). Assessment of chemical composition and sensorial properties of ciders fermented with different non-Saccharomyces yeasts in pure and mixed fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 318, 108471.
- Zhang, Y., Li, P., & Cheng, L. (2010). Developmental changes of carbohydrates, organic acids, amino acids, and phenolic compounds in 'Honeycrisp' apple flesh. *Food Chemistry*, 123(4), 1013-1018.

Zuriarrain, A., Zuriarrain, J., Puertas, A. I., Dueñas, M. T., & Berregi, I. (2015). Quantitative determination of lactic and acetic acids in cider by ^1H NMR spectrometry. *Food Control*, 52, 49-53.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento Informado para Participantes de la Evaluación Sensorial

Fecha: _____

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos
C.U., Cerro de las Campanas s/n, Colonia Las Campanas,
C.P. 76010, Querétaro, Qro.

Título del proyecto: Aislamiento y selección de bacterias lácticas para la elaboración de sidra tranquila en Querétaro, México.

Investigador responsable: Dr. Ramón Álar Martínez Peniche

Nombre del evaluador: Paola Zahutli Pérez Olvera

En el Laboratorio de Fermentaciones y Fisiología de Poscosecha ubicado en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, dirección; Centro Universitario, Cerro de las Campanas s/n C.P. 76010. Santiago de Querétaro, Qro. México, se preparó la evaluación de sidra, una bebida alcohólica, generalmente de baja graduación con un rango que va desde 1.2 a 8.5% en alcohol, la cual se obtiene de la fermentación del jugo de manzana. Una gran variedad de sidras tradicionales se producen por microorganismos seleccionados naturalmente del fruto, evitando cualquier alteración sensorial y asegurando la calidad del producto terminado. La bebida cumple con los requerimientos de inocuidad y no contendrá aditivos perjudiciales a la salud.

La presente investigación es dirigida por: Dr. Ramón Álar Martínez Peniche (alvar@uaq.mx/ Ext.5574) y la alumna Paola Zahutli Pérez Olvera (pperez109@alumnos.uaq.mx/ Tel.951-182-9926)

Justificación del estudio

En el estado de Querétaro se encuentran zonas favorables para el cultivo del manzano, sin embargo, el fruto generalmente no cumple con los estándares para su comercialización en fresco. Una alternativa de solución es la elaboración de sidra, de la cual se han realizado diversos estudios localmente, particularmente relacionados con la selección de

levaduras nativas fermentativas. No obstante, aún se requiere explorar el efecto de la actividad de bacterias ácido lácticas (BAL) durante la fermentación sobre la calidad del producto.

Objetivo del estudio

Evaluar la calidad y aceptabilidad sensorial de sidra tranquila artesanal producida por microorganismos seleccionados.

Duración del estudio

El estudio tendrá una duración aproximada de 15 minutos.

Riesgos asociados con el estudio

A pesar que es muy conocido el hecho de que las bebidas fermentadas son más seguras que los productos no fermentados. Ocasionalmente, la presencia de patógenos como *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, provenientes del suelo, equipos agrícolas y de procesamiento o fuentes humanas, pueda ocurrir o estar presente en el mosto de manzana. Se ha encontrado, que ácidos orgánicos, principalmente ácido málico ($\cong 5 \text{ g/l}$) en el mosto de manzana y ácido láctico (3 a 4 g/l) en la Sidra, generan cierta acidez (pH entre 3.0 a 3.5 y 3.3 a 4.0, respectivamente) lo que normalmente previene el crecimiento de estos patógenos, que pueden sobrevivir unas pocas horas (Id *et al.*, 2017). Sin embargo, no se debe descartar tener el control y monitoreo de los peligros que se puedan presentar por presencia de patógenos en sidra; como las bacterias patógenas, protozoos y aminas biogénicas. Por lo que se mantuvo vigilancia durante todo el proceso de sidra, garantizando a su vez la calidad de la materia prima.

Por ende, es importante mencionar, que si durante la evaluación se detecta algún síntoma que pudiera requerir tratamiento médico, se informará al área de Coordinación de Seguridad e Higiene de La Facultad de Química con el Dr. Julio Armando de Lira Flores (julio.lira@uaq.mx).

Declaración de consentimiento

La participación de esta Evaluación sensorial es estrictamente voluntaria y no se usará para ningún otro propósito fuera de esta investigación. Si tiene alguna duda sobre este proyecto, puede hacer preguntas en cualquier momento durante su participación en él. La

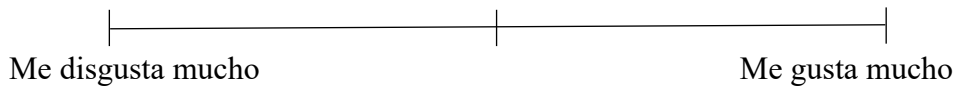
información que se recoja será única y exclusiva para el análisis sensorial de la calidad de la Sidra tranquila elaborada de forma tradicional, dicho producto se obtuvo bajo los procedimientos de la NOM-251-SSA1-2009 y NOM-142-SSA1/SCFI-2014, que garantizan la seguridad e inocuidad del mismo, destinado para pruebas sensoriales.

Acepto participar voluntariamente en este proyecto de investigación, conducido por; Dr. Ramón Álvar Martínez Peniche (alvar@uaq.mx/ Ext.5574) y la alumna Paola Zahutli Pérez Olvera (pperez109@alumnos.uaq.mx/ Tel.951-182-9926). He sido informado (a) del objetivo de esta investigación es determinar la calidad y aceptabilidad sensorial del producto por el consumidor.

Reconozco que la información que yo provea en el transcurso de este proyecto de investigación es con mi consentimiento, con fines de información estadística para calificar la calidad y aceptación de la bebida fermentada, garantizando la confidencialidad de los datos proporcionados por el participante. He sido informado de que puedo hacer preguntas de duda o aclaración sobre el proyecto en cualquier momento.

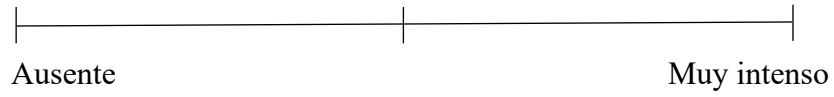
Tomando todo ello en consideración y en tales condiciones, CONSIENTO participar en el análisis sensorial y que los datos que se deriven de mi participación sean utilizados para cubrir los objetivos especificados en el documento.

General

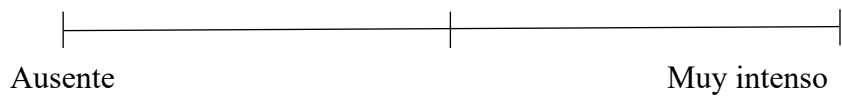


▪ **GUSTATIVO**

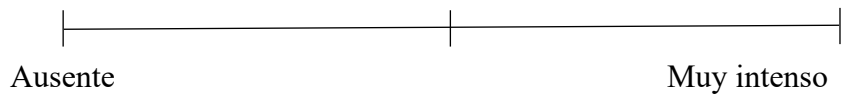
Dulce



Ácido



Astringente



General

