



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

**Influencia de la levadura en el perfil sensorial y de los compuestos volátiles
de sidra espumosa artesanal elaborada con dos cultivares de manzana**
Tesis

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

Presenta:

I.Q. en A. Gabriela Moguel Antonio

Dirigido por:

Dr. Ramón Álar Martínez Peniche

Co-dirigido por:

Dra. Pilar Escalante Minakata

Dr. Ramón Álar Martínez Peniche
Presidente

Dra. Pilar Escalante Minakata
Codirector

Dra. Marcela Gaytán Martínez
Vocal

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Suplente

Dra. Dalía Elizabeth Miranda Castilleja
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Diciembre, 2019
México

RESUMEN

Querétaro cuenta con condiciones agroecológicas adecuadas para la producción de manzana. Sin embargo, la baja calidad del fruto propicia pérdidas económicas importantes. Para lograr un mejor aprovechamiento se propone la elaboración de la sidra, bebida alcohólica obtenida de la fermentación del jugo de manzana. El objetivo del trabajo fue determinar las características físicas, químicas y sensoriales, así como el tipo de compuestos volátiles presentes en sidras elaboradas con dos cultivares de manzana a partir de levaduras nativas seleccionadas en la región productora de Querétaro. Se evaluó el comportamiento fermentativo de las cepas y se realizaron los análisis físicos y químicos de las sidras tranquilas. Para un segundo experimento se seleccionó la cepa 436.4 para la sidra base, y se probaron cuatro levaduras para la segunda fermentación, midiendo la evolución de la presión en la botella. Al final de la fermentación se realizaron los análisis físicos y químicos de las sidras espumosas, junto a una evaluación sensorial de los tratamientos y el análisis de compuestos volátiles mediante Cromatografía de gases (CG). Las sidras tranquilas elaboradas con las levaduras nativas mostraron comportamientos fermentativos comparables a los de la cepa K1-V1116, y superiores a los obtenidos con la microbiota nativa, con menor AV (MM7 y 436.4 con 0.07 y RY5 con 0.08 g ácido acético L⁻¹) que K1-V1116 en ambas variedades. Para la evolución de la presión, 'Red Delicious' obtuvo mayores valores (de 3.1 atm para MM7 a 4.0 atm con RY5) que 'Golden Delicious' (de 2.6 atm en 436.4 a 3.1 atm en K1-V1116), con un incremento de al menos 2 °GL en ambas variedades. En la evaluación sensorial en 'Golden Delicious' se obtuvieron diferencias (P≤0.05) en "fresco", sobresaliendo K1-V1116 (SR=32.5) contrastando con RY5 (SR=14.5), mientras que MM7 resulto menos "amargo" (SR=15.5). En 'Red Delicious' hubo diferencias en olor a nivel "floral" y "fresco", así como en calidad gustativa en "dulce", destacando en las tres RY5 (SR=32, SR=30.5 y SR=32.5, respectivamente). Finalmente, no se observaron diferencias en la producción de compuestos volátiles mayoritarios entre tratamientos. Se concluye que las cepas nativas seleccionadas cuentan con potencial para ser usadas como cultivos iniciadores.

Palabras clave: manzana, *Saccharomyces* sp., sidra espumosa, compuestos volátiles y análisis sensorial.

SUMMARY

Querétaro has adequate agroecological conditions for the production apple. However, the low quality of the fruit leads to significant economic losses. In order to obtain a better profit, cider making, an alcoholic beverage obtained from fermentation of apple must is proposed. The objective of the work was to determine the physical, chemical and sensory characteristics, as well as the type of volatile compounds present in ciders made with two apple cultivars from selected native yeasts in the Querétaro producing region. Fermentative behavior of the strains was evaluated and physical and chemical analyses of the quiet ciders. In a second experiment, strain 436.4 was selected to obtain the base cider, and four yeasts were tested for the second fermentation, measuring the evolution of the pressure in the bottle. At the end of the second fermentation, physical and chemical analyses of the sparkling ciders were realized; also a sensory evaluation and analysis of the volatile compounds by gas chromatography (GC). Quiet ciders obtained with the native selected yeast showed fermentative behaviors comparable with the strain K1-V1116, but higher than those obtained with the native microbiota. Moreover, native strains also produced less volatile acidity (MM7 and 436.4 with 0.07 and RY5 with 0.08 g acetic acid L⁻¹) than the strain K1-V1116 in both apple varieties. For the evolution of the pressure, 'Red Delicious' had higher values (from 3.1 atm for MM7 to 4.0 atm with RY5) than 'Golden Delicious' (2.6 atm in 436.4 to 3.1 atm in K1-V1116), with an increase of at least 2 °GL in both varieties. In the sensory evaluation in 'Golden Delicious' there are differences ($P \leq 0.05$) in "fresh", standing out K1-V1116 (SR=32.5) contrasting with RY5 (SR=14.5), where obtained MM7 was less "bitter" (SR=15.5) In 'Red Delicious' there were differences in odor at the "floral" and "fresh" level, as well as in taste quality in "sweet" were obtained, standing out in the three RY5 (SR=32, SR=30.5 and SR=32.5, respectively). Finally, no differences were observed in the production of major volatile compounds between treatments. It is concluded that the selected native strains have the potential to be used as starter cultures.

Key words: apple, *Saccharomyces* sp., sparkling cider, volatile compounds and sensory analysis.

DEDICATORIA

“La humanidad también necesita soñadores, para quienes el desarrollo de una tarea sea tan cautivante que les resulte imposible dedicar su atención a su propio beneficio”

Marie Curie.

Con amor para mi mamá, papá y hermano por siempre estar ahí cada que los necesito.

A mis abuelos por su herencia y tradiciones que me inculcaron.

A mi familia porque siempre me apoyaron y me enseñaron que todo esfuerzo tiene su recompensa, por sus charlas, risas y cientos de consejos.

Gracias siempre.

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento a mi director de tesis el Dr. Ramón Alvar Martínez Peniche quién me acompañó a lo largo de estos dos años en la elaboración de la presente investigación, porque siempre me dio palabras de aliento y total apoyo, porque a pesar de sus propios problemas siempre me guio y confió en mí. También quiero agradecer a la Dra. Pilar Escalante Minakata por permitir me trabajar bajo su supervisión mientras estuve de estancia de investigación en la Universidad de Colima, porque ambos me otorgaron comentarios prácticos que fueron necesarios para crear mi tesis.

Un agradecimiento a todos los que formaron parte de mi comité de tesis, por sus críticas constructivas, sugerencias y correcciones, que permitieron construir y concluir mi proyecto de investigación.

Agradezco el financiamiento y el apoyo recibido por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) al otorgarme la beca y también por el cual me fue posible hacer una estancia de investigación en la Universidad de Colima, Colima.

Gracias a la Universidad Autónoma de Querétaro y al posgrado en Ciencia y tecnología de Alimentos, por permitirme seguir con la preparación profesional en el ámbito académico que se requiere para ejercer la investigación en el área de alimentos.

Finalmente quiero agradecer a mi familia que me ha apoyado durante todo este tiempo, gracias por su paciencia y amor. A mis amigos que me acompañaron en esta travesía, a todos y cada uno de ellos que siempre me motivaron, me escucharon y confiaron en mí.

TABLA DE CONTENIDO

INDICE DE TABLAS	viii
INDICE DE FIGURA.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBIOGRAFICA	3
2.1. Generalidades del manzano	3
2.1.1. Antecedentes y distribución	3
2.1.1.1. Origen	3
2.1.1.2. Importancia	4
a) Mundial	4
b) Nacional.....	4
c) Regional.....	6
2.1.2. Botánica	7
2.1.2.1. Taxonomía	7
2.1.2.2. Morfología	7
2.1.2.3. Fisiología.....	9
2.1.3. Hábitat.....	10
2.1.4. Variedades	10
2.1.5. Composición del fruto.....	12
2.1.5.1. Composición Nutrimental	12
2.1.5.2. Compuestos Volátiles	13
2.2. La sidra	14
2.2.1. Definición	14
2.2.2. Importancia	15
a) Mundial	15
b) Nacional.....	15
2.2.3. Tipos de sidra.....	16
2.2.4. Proceso de elaboración de sidra tranquila	16
2.2.5. Elaboración de sidra espumosa por el método “ <i>champenoise</i> ”	20
2.2.6. Calidad sensorial de la sidra espumosa	24
2.2.6.1. Características visuales	25
2.2.6.2. Características aromáticas.....	26
2.2.6.3. Características gustativas	27

2.3. Levaduras	27
2.3.1. Generalidades	27
2.3.2. Características genéticas	28
2.3.3. Morfología	28
2.3.4. Fisiología	29
2.3.5. Levaduras encontradas en mostos y sidra	30
2.3.6. Contribución de las levaduras en la fermentación	31
2.3.7. Criterios de selección	32
OBJETIVOS	34
General	34
Específicos	34
III. MATERIALES Y MÉTODOS	35
3.1. Sitio experimental	35
3.2. Material biológico	35
3.2. Preparación de inóculo de levaduras	35
3.3. Evaluación del efecto de las levaduras en la primera fermentación	36
3.4. Evaluación de las cepas de levaduras en la segunda fermentación	36
3.5. Análisis de las sidras obtenidas	37
3.5.1. Comportamiento fermentativo de las cepas de levaduras	37
3.5.2. Análisis físicos y químicos	38
3.5.2.1. Densidad	38
3.5.2.2. pH	38
3.5.2.3. Sólidos solubles totales (°Bx)	38
3.5.2.4. Anhídrido sulfuroso total (Método de Ripper)	38
3.5.2.5. Acidez total titulable	39
3.5.2.6. Acidez volátil	40
3.5.2.7. Azúcares reductores totales	40
3.5.2.8. Análisis de azúcares mediante HPLC	41
3.5.2.9. Grado alcohólico	42
3.5.2.10. Determinación de nitrógeno total	43
3.5.3. Evaluación sensorial	43
3.5.4. Determinación de los principales compuestos volátiles mediante cromatografía de gases	44
3.6. Diseño de los experimentos	46
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47

4.1. Evaluación de las distintas levaduras en la primera fermentación.....	47
4.1.1. Características físicas y químicos del mosto.....	47
4.1.2. Evolución de la densidad durante la fermentación para la elaboración de sidra tranquila en dos cultivares de manzana	48
4.1.4. Características físicas y químicas de la sidra tranquila	50
4.2. Evaluación de las distintas levaduras en la segunda fermentación	54
4.2.1. Características físicas y químicas de los mostos utilizados	54
4.2.2. Evaluación de la sidra de base	55
4.2.2.1. Evolución de la densidad durante la fermentación en dos cultivares de manzana	55
4.2.2.2. Características físicas y químicas de las sidras bases	56
4.2.3. Evaluación de la calidad química y física de la sidra espumosa	59
4.2.3.1. Evolución de la presión de la botella.....	59
4.2.3.2. Características físicas y químicas de la sidra espumosa.....	61
4.3. Determinación de ácido málico, ácido acético, azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) y glicerol en la sidra por HPLC a partir del mosto hasta el término de la segunda fermentación.....	65
4.4. Determinación de Nitrógeno total durante la segunda fermentación	71
4.5. Análisis Sensorial de las sidras espumosas	72
4.5.1. 'Golden Delicious'.....	72
4.5.2. 'Red Delicious'.....	76
4.6. Determinación de los compuestos Aromáticos	79
4.6.1. 'Golden Delicious'.....	79
4.6.2. 'Red Delicious'.....	85
V. CONCLUSIONES	90
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	93
VII. ANEXOS.....	108
ANEXO 7.1. Formato de Consentimiento Informado para Participantes de la Evaluación Sensorial.	108
ANEXO 7.2. Programa de Evaluación Sensorial.	110
ANEXO 7.3. Ficha de Prueba Sensorial Para Sidra Espumosa	116

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Producción, consumo e importaciones de manzana en México.....	5
Tabla 2.2. Principales entidades productoras de manzana.....	5
Tabla 2.3. Producción de manzana de los municipios del estado de Querétaro.....	6
Tabla 2.4. Clasificación de variedades de sidra en función del contenido de ácidos y taninos.....	11
Tabla 2.5. Composición química nutrimental de la manzana por cada 100 g.....	12
Tabla 2.6. Tipos de sidra.....	16
Tabla 3.1. Características físicas de dos variedades de manzana.....	35
Tabla 3.2. Formato de codificación de las muestras de sidra espumosa.....	44
Tabla 3.3. Condiciones del equipo de cromatografía.....	45
Tabla 4.1. Densidad, Acidez total titulable, pH y sólidos solubles (°Bx) de los mostos de manzana para la elaboración de sidra tranquila.....	47
Tabla 4.2. Energía fermentativa (EF) acumulada de los mostos de manzana de dos cultivares en función de la cepa de levadura.....	50
Tabla 4.3. Azúcares residuales (AR), grado alcohólico (GA) y acidez total titulable (ATT) de sidras tranquilas elaboradas con cuatro cepas de levadura en dos cultivares de manzana.....	51
Tabla 4.4. Acidez volátil (AV) y SO ₂ total de la sidra tranquila de los mostos de manzana de dos cultivares en función de la cepa de levadura.....	53
Tabla 4.5. Densidad, Acidez total titulable (ATT), pH y sólido solubles (°Bx) de los mostos de manzana para la elaboración de sidra espumosa.....	55
Tabla 4.6. Contenido de azúcares, grado alcohólico, acidez total titulable y anhídrido sulfuroso total de sidras de base elaboradas con la cepa 436.4 en dos cultivares de manzana.....	57
Tabla 4.7. Contenido de azúcares (AR), grado alcohólico (GA) y acidez total titulable (ATT) de sidras espumosas elaboradas con distintas cepas en dos cultivares de manzana.....	62
Tabla 4.8. Acidez volátil (AV) y SO ₂ total de la sidra espumosa de manzana de dos cultivares en función de la cepa de levadura.....	64

Tabla 4.9. Suma de rangos (SR) en la prueba de Friedman para la evaluación sensorial de sidras espumosas elaboradas con cuatro cepas de levaduras en 'Golden Delicious'	74
Tabla 4.10. Suma de rangos (SR) en la prueba de Friedman para la evaluación sensorial de la calidad de sidras espumosas elaboradas con cuatro cepas de levaduras en 'Red Delicious'	77
Tabla 4.11. Compuestos volátiles de la sidra espumosa para la variedad 'Golden Delicious'	83
Tabla 4.12. Compuestos volátiles de la sidra espumosa para la variedad 'Red Delicious'	87
Tabla 7.1. Sabores básicos de los alimentos	114

Dirección General de Bibliotecas UAQ

INDICE DE FIGURA

Figura 2.1. Anatomía de la flor del manzano.....	8
Figura 2.2. Anatomía de la manzana	8
Figura 2.3. Estados fenológicos 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	9
Figura 2.4. Elaboración de sidra tranquila tradicional.....	17
Figura 2.5. Elaboración de sidra espumosa.	21
Figura 2.6. Sidra de segunda fermentación	23
Figura 2.7. Fase dos de la elaboración de sidra por el método <i>champenoise</i>	24
Figura 2.8. Reacción de la fermentación alcohólica.	29
Figura 3.1. Primera fermentación en matraces de 1 L para la obtención de sidra tranquila.....	36
Figura 3.2. Dispositivos en las botellas para el monitoreo de la evolución de la segunda fermentación de las diferentes cepas de levadura para la obtención de sidra espumosa.....	37
Figura 3.3. Esquema de trabajo en ELLd.....	45
Figura 4.1. Evolución de la densidad de los mostos de dos cultivares de manzana en función de la cepa de levadura (A) 'Golden Delicious'; (B) 'Red Delicious'	49
Figura 4.2. Evolución de la densidad de mostos de manzana de dos cultivares con la cepa 436.4 (roja) 'Red Delicious'; (amarilla) 'Golden Delicious'.	56
Figura 4.3. Evolución de la presión en la botella de sidras espumosas de manzana de dos cultivares en función de la cepa de levadura (A) 'Golden Delicious'; (B) 'Red Delicious'.	60
Figura 4.4. Evolución de los diferentes compuestos durante la segunda fermentación de sidras de base elaboradas con la variedad 'Golden Delicious' en función de la levadura.	66
Figura 4.5. Evolución de los diferentes compuestos durante la segunda fermentación de sidras de base elaboradas con la variedad 'Red Delicious'	69

Figura 4.6. Porcentaje de Nitrógeno total conforme evoluciona la fermentación de los mostos de manzana A) 'Golden Delicious'; B) 'Red Delicious'	72
Figura 4.7. Cromatogramas de los compuestos volátiles en la sidra espumosa elaborados con cuatro cepas seleccionadas, así como en el mosto.....	80
Figura 4.8. Cromatogramas de los compuestos volátiles en la sidra espumosa elaborados con cuatro cepas seleccionadas, así como en mosto.....	86
Figura 7.1. Datos de información sobre la participación de jueces	112

Dirección General de Bibliotecas UAQ

I. INTRODUCCIÓN

México ocupa el 20° lugar en producción de manzana en el mundo siendo las principales variedades cultivadas: 'Golden Delicious', 'Red Delicious', 'Gala', 'Rome Beauty' y 'Starking Delicious' (SAGARPA, 2017c). Dentro del territorio nacional, el estado de Querétaro cuenta con climas y suelos favorables para la producción de manzana, principalmente en los municipios de San Joaquín, Cadereyta, Amealco y Pinal de Amoles (Flores-Lui *et al.*, 2017). Sin embargo, la presencia de accidentes climatológicos y un deficiente manejo pos cosecha del fruto, propicia pérdidas económicas importantes. La búsqueda de alternativas para el aprovechamiento industrial de esta fruta que no logró posicionarse en el mercado como fruta fresca es una opción para resolver esta problemática. Siendo la sidra espumosa tipo champaña una excelente alternativa, dadas las características de la manzana. La sidra espumosa es una bebida alcohólica que se produce mediante una segunda fermentación en botella de la sidra base, la cual genera efervescencia en la bebida al momento del servido. Ambas fermentaciones son llevadas a cabo comúnmente por levaduras del género *Saccharomyces* (Arthey & Ashurst, 1996; Qin *et al.*, 2018), las cuales tendrán un efecto importante en la calidad de la sidra. Las levaduras que realizan la primera fermentación pueden provenir del ambiente (nativas), o bien ser añadidas deliberadamente al mosto (cepas seleccionadas), mientras que aquellas que realizan la segunda fermentación son inoculadas en la sidra base. Los principales criterios para su selección son: tolerancia a la presión, al alcohol, los sulfitos y a las bajas temperaturas, así como alta capacidad fermentativa y el disponer de elevada capacidad de floculación o aglutinación (Herrero *et al.*, 2010). Además de transformar los azúcares en alcohol, las levaduras liberan diferentes compuestos al medio extracelular que mejoran las características de la sidra, principalmente su perfil aromático (Lobo *et al.*, 2005).

Por otra parte, se sabe que el perfil sensorial de la sidra va a variar en función del cultivar de manzana. Alberti *et al.* (2016) encontraron que sidras elaboradas con las variedades 'Gala' y 'Lis Gala' contenían 24 a 52 % más de

concentración de compuestos volátiles que las de la variedad 'Fuji Suprema'. Dentro de los principales compuestos volátiles presentes en la sidra se encuentran los ésteres que aportan aromas afrutados y florales. Otros compuestos volátiles producidos durante el envejecimiento son los alcoholes superiores, aldehídos, ácidos grasos y terpenos que, aunque se encuentren en concentraciones más bajas, llegan a tener gran relevancia a nivel sensorial (Le Quéré *et al.*, 2006). Por ejemplo, en las sidras, las altas concentraciones de alcoholes, particularmente el 2-feniletanol, contribuyen de manera importante al sabor típico de la bebida ("floral") (Beech 1972), mientras que el propanol, el butanol y el isobutanol aportan el olor típico de una bebida alcohólica, mientras que el alcohol amílico y el alcohol isoamílico aportan un aroma a "mazapán" o "plátano". Por otra parte, los terpenoides son compuestos aromáticos que definen características varietales en frutas, produciendo aromas descritos como "rosa" y "floral" (Swiegers & Pretorius 2005).

Los aromas de la sidra pueden ser evaluados por métodos sensoriales o bien por métodos instrumentales, a través de técnicas cromatográficas que permiten la separación y la cuantificación de los compuestos volátiles (Qin *et al.*, 2018).

En nuestro laboratorio se está trabajando en la selección de levaduras nativas para la elaboración de sidra espumosa de manzana, basándose en criterios clásicos de selección. Sin embargo, hasta ahora no se ha estudiado la influencia de las levaduras seleccionadas sobre la presencia de los principales compuestos volátiles en distintas variedades de manzana, por lo que el objetivo del presente trabajo es determinar las características físicas, químicas y sensoriales, así como el tipo de compuestos volátiles presentes en sidras elaboradas con dos cultivares de manzana a partir de levaduras nativas seleccionadas en la región productora de Querétaro.

II. REVISIÓN BIBIOGRAFICA

2.1. Generalidades del manzano

2.1.1. Antecedentes y distribución

2.1.1.1. Origen

El manzano (*Malus domestica* Borkh) es uno de los cultivos más importantes del mundo, domesticado y establecido desde hace miles de años en Asia y Europa. La distribución del género *Malus* se cree que se originó en los Himalaya, India, Pakistán, las montañas del Caucásico, Asia menor y Asia central, en este último se encuentra su antepasado *M. sieversii*, nativo de las regiones del oeste de China y la antigua Unión Soviética (Juniper *et al.*, 1998).

Se cree que las antiguas rutas comerciales que unían a China con el Medio Oriente y Europa facilitaron la dispersión de *M. sieversii* hacia el este y el oeste, desde su origen en Asia Central (Harris *et al.*, 2002; Velasco *et al.*, 2010), propiciando la dispersión de frutas y semillas (Harris *et al.*, 2002; Hancock *et al.*, 2008). Como resultado de este movimiento, los híbridos podrían haber ocurrido al este con especies nativas de China (*M. baccata*, *M. mandshurica* y *M. prunifolia*) y, al oeste, con especies europeas (*M. orientalis* y *M. sylvestris*) (Juniper *et al.*, 1998; Hancock *et al.*, 2008).

Por otro lado, se ha encontrado evidencia arqueológica e histórica de los frutos de manzana, que sugiere que ya se cultivaba durante la edad neolítica y la época de bronce en toda Europa. Historiadores del Imperio Persa sugieren que las manzanas fueron ampliamente distribuidas desde 500 A.C., desde la época en la que Alejandro el grande conquistó Persia en los años 300 A.C., y donde también los griegos estaban familiarizados con el arte de injertar. En los inicios del primer siglo D.C gracias al ascenso del imperio Romano, el cultivo del manzano fue ampliamente distribuido. Para el año 1200 los cultivos de manzano eran cada vez más populares en toda Europa. En 1826 la Real sociedad de Horticultura de Inglaterra ya había reconocido al menos 1200 variedades, y hacia 1900 se convirtió en uno de los periodos más populares de cultivos de manzana (Harris *et al.*, 2002; Hancock *et al.*, 2008).

Mientras tanto en América, *M. domestica* fue introducida por primera vez por sacerdotes españoles en misiones de Chile y California en el siglo XVI, además de en zonas templada de América central y del sur, 100 años después, desde Iberoamérica, el manzano emigró a América del Norte y posteriormente a África y Australia (CFIA, 2014).

2.1.1.2. Importancia

a) Mundial

El cultivo de manzano se desarrolla comercialmente en 98 países del Mundo; China es el primer productor mundial con un total de 31 millones de toneladas de manzana, mientras que la Unión Europea mejoró su producción en 40 % respecto a 2018, con un total de 14.0 millones de toneladas, en Estados Unidos (EE.UU.) se pronostica una producción de 5.0 millones de toneladas, seguido de Turquía (2.3 millones de toneladas), India (2.3 millones de toneladas), Chile (1.4 millones de toneladas), Rusia (1.3 millones de toneladas), Sudáfrica (840,000 toneladas).

En cuanto a México, se visualiza una producción de 660,000 toneladas de manzana en el año en curso, a consecuencia de las malas condiciones climáticas principalmente en el estado de Chihuahua. Continuando con los países de mayor producción, en Nueva Zelanda se espera una producción total de 560,000 toneladas de Manzana y en Argentina de 590,000 toneladas (USDA, 2019).

En general entre 2018 y 2019 se proyecta una disminución en la producción mundial de manzana de 5.7 millones de toneladas métricas del anterior año, esto debido a los cambios en las condiciones climáticas en China afectando el mercado de importaciones y exportaciones (USDA, 2019).

b) Nacional

El Manzano ocupa en México el primer lugar en superficie establecida entre los frutales de clima templado, con más de 67,000 ha, aportando 1 % de la producción mundial. Éste se cultiva en 23 estados de la república (SAGARPA,

2017b). En México, pese a los importantes incrementos en su productividad en el periodo de 2003 a 2016, en que la producción fue de 716,931 toneladas, en 2016 sólo se cubrió 77.26 % de consumo nacional (Tabla 2.1), el restante corresponde a importaciones provenientes de Estados Unidos y Chile (SIAP, 2017).

Tabla 2.1. Producción, consumo e importaciones de manzana en México

Producción	714,149 Ton
Consumo nacional	927.95 Mt
Importaciones	284,110 Ton

(SIAP & SAGARPA, 2017)

De acuerdo con el cierre 2016, la producción total de manzana alcanzó un valor de 4.666 mil millones de pesos, en una superficie cosechada de 54,248 ha. Chihuahua aportó 81.8 % del volumen nacional recolectado, seguido a distancia por Durango y Puebla con 5.9 % y 5.2 %, respectivamente (Tabla 2.2) (SIAP, 2017).

Tabla 2.2. Principales entidades productoras de manzana en México

Posición	Entidad Federativa	Volumen (Ton)	Variación % (2012-2017)
1	Chihuahua	586,227	184
2	Puebla	36,773	7.8
3	Durango	32,652	-46.6
4	Coahuila	22,653	-38.4
5	Veracruz	9,431	2.3
6	Nuevo León	3,967	-38.6
7	Zacatecas	3,411	-6.6
8	Hidalgo	3,270	-.19.9
9	Chiapas	3,238	-14.1
10	Sonora	2,395	47.7
	otros	7,105	0.4

(SAGARPA, 2018; SIAP, 2018)

c) Regional

El estado de Querétaro cuenta con clima y suelo favorables para la producción de manzana, principalmente en laderas de las zonas altas o serranas. Los principales municipios productores se muestran en la Tabla 2.3 (Flores-Lui *et al.*, 2017).

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

Municipio	Superficie plantada (ha)	Superficie cosechada (ha)	Producción (ton)	Rendimiento obtenido (ton ha ⁻¹)
San Joaquín	200	199	280	1.407
Cadereyta de Montes	139	139	97	0.7
Pinal de Amoles	50	35	80	2.3
Amealco	32	19	53	2.8

(SIAP, 2018)

Las variedades introducidas en primera instancia fueron: 'Rayada' y 'Rosada' (hace más de 200 años), lo que ha resultado en nuevos tipos que difieren en adaptación, y posteriormente se hizo la introducción de variedades tales como 'Golden Delicious', 'Red Delicious', 'Jonathan' y 'Rome Beauty'. Las principales variedades que se cultivan en la actualidad son 'Golden Delicious', 'Red Delicious' y 'Rayada', las cuales presentan grandes atributos de calidad, pero a la vez serias limitaciones en su comercialización, debido a daños por granizo, roña, mosca de manzana, heladas durante la floración o por maduración tardía (Fernández-Montes *et al.*, 2010).

Además, otro de los principales problemas al que se enfrenta la producción de manzana en Querétaro es la falta de tecnología, ya que durante muchos años se ha trabajado de manera rústica, no existiendo una política de apoyo al sector. Todo lo anterior propicia que ésta se comercialice deficientemente y a bajos precios. Entre las alternativas para mejorar la calidad y el precio de la fruta destaca la

introducción, evaluación y selección de materiales genéticos, la elaboración de materiales industrializados y el almacenamiento de productos a bajas temperaturas (SAGARPA, 2016).

2.1.2. Botánica

2.1.2.1. Taxonomía

El manzano pertenece a la familia *Rosaceae*, subfamilia *Pomoideae*, género *Malus* y especie *M. domestica* Borkh; en la actualidad, se considera que tiene como principal ancestro a *M. sieversii* con influencia de *M. sylvestris* (Hancock *et al.*, 2008).

2.1.2.2. Morfología

El manzano se caracteriza por ser un frutal caducifolio, aunque en pocas ocasiones puede ser siempre verde; es un árbol de una altura entre 1.5 y 7 m (dependiendo del portainjerto) y un ancho en la copa de 1.0 a 4.5 m. Presenta hojas ovaladas, elípticas, lanceoladas, oblongas, lobuladas o aserradas. Las yemas son ovoides con pequeñas escamas que sobresalen y las yemas mixtas contienen entre cinco y ocho flores y un número similar de hojas, la flor central en la mayoría de los casos es más grande y precoz que las laterales. Una flor contiene cinco sépalos, cinco pétalos, cinco pistilos y unos 20 estambres. Las flores son blancas a rosas o carmín, y se organizan en corimbos (Figura 2.1) (Cárdenas-Hernández & Fischer, 2013).

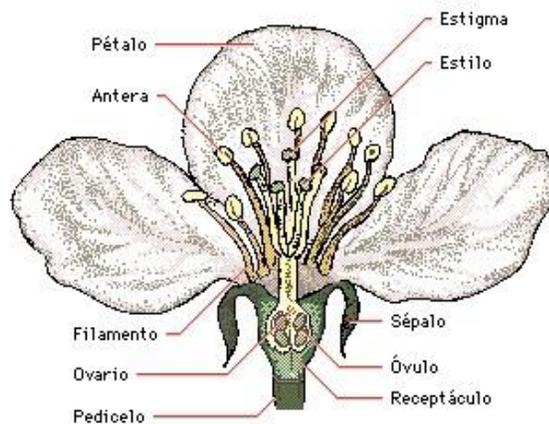


Figura 2.1. Anatomía de la flor del manzano

El fruto es un pomo, que se caracteriza por tener un ovario ínfero con un endocarpio lignificado, es una fusión entre ovario y receptáculo, y las semillas nacen en cinco carpelos formados de tejidos del mesocarpio y receptáculo. El fruto es oblongo, cónico u oblicuo, con diámetro entre 2 a 13 cm, presenta varias tonalidades: verdes, amarillas y rojas (Figura 2.2). Según el cultivar, algunos maduran en solo 70 días, mientras otros necesitan 180 días o más (Cárdenas-Hernández & Fischer, 2013). En promedio, las manzanas alcanzan la madurez alrededor de 120 a 150 días después de la floración.

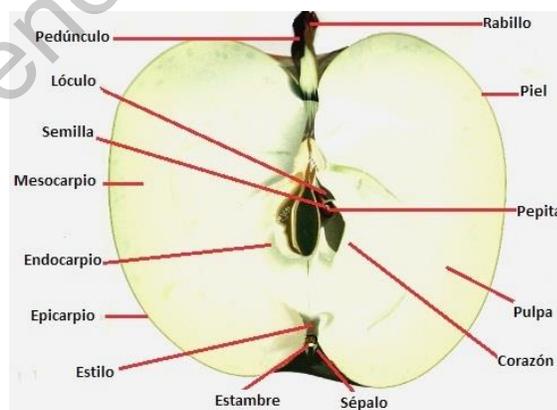


Figura 2.2. Anatomía de la manzana

2.1.2.3. 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).

Todos estos procesos están regulados por hormonas (auxinas, citocininas, giberelinas, etc.) generadas por la propia planta. El periodo de floración se inicia con la apertura de las yemas de flor, de la cual se pueden observar distintas fases (estados fenológicos), desde que comienza el hinchamiento de la yema de flor hasta la maduración del fruto. Su duración depende de la variedad y de la climatológica. Cuando concluye la floración comienzan a caer las flores no fecundadas y se produce el cuajo de la manzana. Continúa la diferenciación de los botones florales para el año siguiente, seguido de la brotación y evolución de las yemas de madera, que da lugar al desarrollo vegetativo. De manera general hay dos periodos de crecimiento activo (primavera y verano) con una parada intermedia de la actividad. La primer brotación ocurre en primavera, de febrero a mayo, después hay una parada de crecimiento de los brotes, y a finales de junio y hasta otoño se produce el segundo crecimiento. Hasta finales de invierno, o principio de la primavera, comienza el desborre o hinchamiento de yemas nuevamente (Figura 2.3) (Coque-Fuertes *et al.*, 2012).

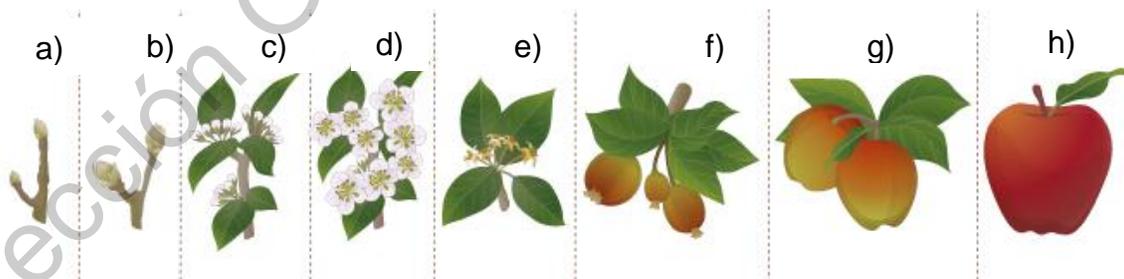


Figura 2.3. Estados fenológicos del manzano; a) hinchamiento de la yema de flor, b) apertura de yema, c) capullo de la flor, d) floración, e) conjunto de frutas, f) desarrollo del fruto. g) maduración, h) cosecha

2.1.3. Hábitat

En general, *M. domestica* es considerada como la especie mejor adaptada a regiones templadas, en áreas con alta intensidad de luz, días cálidos y noches frías. Tiene un rango de adaptación más al norte que muchos otros cultivos frutales debido a su floración relativamente tardía y resistencia al frío (Hancock, 2008). También se cultiva en menor medida en áreas semiáridas, subtropicales y tropicales, donde el riego, la altitud y diversas estrategias agrícolas se utilizan para superar las limitaciones climáticas (Stanivuković *et al.*, 2017). Jackson (2003) ha estudiado los rangos de temperatura con el que se puede lograr altos rendimientos de producción de manzanas, con temperaturas mínimas en invierno de -17 °C y temperaturas máximas de verano de 30 °C, y lugares como Egipto con temperaturas mínimas de invierno de 1 °C y máximas en verano de 43 °C (Jackson, 2003), de los que se pueden obtener cultivos de calidad.

La tolerancia climática varía significativamente entre los cultivares de *M. domestica*. El tiempo hasta la madurez varía con la temperatura (las temperaturas más cálidas reducen el tiempo de maduración) de modo que varía para un cultivar dado de un lugar a otro; sin embargo, las clasificaciones de variedades "tempranas" o "tardías" entre sí son bastante consistentes (Jackson, 2003). *M. domestica* puede cultivarse en una amplia variedad de tipos de suelos, pero se desempeña de manera óptima en suelos profundos, bien drenados, con un pH de 6 a 7 y con alto contenido de materia orgánica. Los suelos arenosos producen un crecimiento menos vigoroso y requieren más riego, ya que tienen menos materia orgánica y son propensos a la lixiviación. Los suelos arcillosos son más altos en materia orgánica y producen un crecimiento más vigoroso, pero proporcionan un drenaje pobre y son menos adecuados para el crecimiento de las raíces (Ashebir *et al.*, 2010; AAFC, 2011).

2.1.4. Variedades

Las variedades de manzano se clasifican de acuerdo con el color de su epidermis, precocidad y características como intensidad y tipo de color. Se estima que existen entre 5,000 y 20,000 variedades de manzana, aunque el número de

variedades que se utilizan a nivel comercial es reducido (FIRCO, 2017). La elección varietal es un factor importante para la viabilidad de cualquier explotación frutal. Entre las variedades de mesa que se encuentran en el mercado se pueden distinguir: ‘Gala’, ‘Granny Smith’, ‘Elstar’, ‘Jonagold’, ‘Fuji’, ‘Braeburn’, ‘Golden Delicious’, ‘Gala’, ‘Reineta Blanca de Canada’ y ‘Reineta Encarnada’, éstas deben contar con características que condicionan su calidad como son: el tamaño, apariencia y sabor. En cuanto a las manzanas sidreras, éstas suelen ser más pequeñas, amargas y más astringentes que las manzanas de mesa, además de tener cierta similitud con las manzanas de la especie *M. sylvestris* (Cornille *et al.*, 2012). Las variedades de manzana de sidra por su denominación de origen protegida (DOP) del principado de Asturias son: ‘Coloradona’, ‘Collaos’, ‘Dela riega’, ‘Durona de Tresali’, ‘Raxao’, ‘Regona’, ‘Panquerina’, ‘Carrió’, ‘Fuentes’, ‘Prieta’, ‘Perezosa’, ‘Solarina’, ‘Limón Montes’ y ‘Perico’ (Coque-Fuertes *et al.*, 2012). Éstas muestran algunas ventajas para elaborar sidra, por ejemplo, pueden presentar elevados contenidos de azúcar (hasta 15 %), tienen un elevado intervalo de acidez (0.1 a 1 % de ácido málico), como se clasifican en la Tabla 2.4 en función de la acidez y taninos, por otro lado, su estructura fibrosa facilita la extracción e incrementa el rendimiento en mosto, en algunos casos presentan elevados contenidos de taninos y la maduración complementaria que experimentan, cuando son separadas del árbol, facilita la conversión del almidón en azúcar sin que exista una pérdida importante de firmeza (Lea & Piggott, 2003).

Tabla 2.4. Clasificación de variedades de sidra en función del contenido de ácidos y taninos

Característica de la variedad sidrera	Acidez (g H ₂ SO ₄ L ⁻¹)	Taninos (g ácido tánico L ⁻¹)
Amargo	<3.29	>2.00
Ácido	>4.80	<1.45
Dulce	<3.29	<1.45
Dulce-amargo	<3.29	1.45 a 2.00
Ácido-amargo	>4.80	1.45 a 2.00
acidulado	3.29 a 4.80	<1.45

(Lea & Piggott, 2003; Blanco-Gomis & Mangas-Alonso, 2010)

Las condiciones que determinan la calidad en la elaboración de sidra son el rendimiento en el mosto, los azúcares solubles y totales, la acidez total, los compuestos fenólicos y las pectinas (Coque-Fuertes *et al.*, 2012).

2.1.5. Composición del fruto

2.1.5.1. Composición Nutricional

La manzana es ampliamente usada en la alimentación, ya sea en fresco, deshidratada o procesada. Los principales componentes de la manzana se muestran en la Tabla 2.5 (USDA, 2018).

Tabla 2.5. Composición química nutricional de la manzana por cada 100 g

Componente	Unidad	Cantidad
Agua	g	85.56
Proteína	g	0.26
Grasas	g	0.17
Carbohidratos	g	13.81
Fibra	g	2.4
Azúcares totales	g	10.39
Calcio, Ca	mg	6
Magnesio, Mg	mg	5
Hierro, Fe	mg	0.12
Fósforo, P	mg	11
Potasio, K	mg	107
Vitamina C	mg	4.6
Vitamina A, IU	IU	54

(USDA, 2018)

Otros compuestos bioactivos (que tienen impacto sobre el metabolismo humano) como los flavonoides y más concretamente los flavonoles: quercetina,

kamferol e isoramnetina y el glutati3n, son importantes por sus posibles efectos beneficiosos sobre la salud. Por otra parte, el 1cido m1lico (0.3 a 1 %) es el principal 1cido org1nico presente en la manzana, y en menores proporciones el 1cido c1trico, isoc1trico, succ1nico, fum1rico, qu1nico y siqu1mico. Por lo que se refiere a los amino1cidos principales, 90 % del total de la fracci3n aminoac1dica est1 constituida por los 1cidos asp1rtico y glut1mico, la asparagina, la serina y la glutamina, siendo la asparagina y el 1cido asp1rtico los amino1cidos (Herrero *et al.*, 2010).

2.1.5.2. Compuestos Vol1tiles

Se ha identificado una mezcla compleja de compuestos vol1tiles en el mosto de la manzana, en su mayor1a han sido los 1steres (de 78 a 92 %) (acetatos de butilo, 2-metilbutilo, pentilo y hexilo; propanoatos de etilo, butilo y hexilo; butanoatos de etilo, propilo, butilo y hexilo; 2-metilbutanoatos de metilo, etilo, propilo, butilo y hexilo; y hexanoatos de butilo, isoamilo y hexilo) (Dixon & Hewett, 2000; Lea & Piggott, 2003). El propionato de etilo, acetato de butilo y el 2-metilbutirato de etilo proporcionan un aroma t1pico de manzana, en particular, este 1ltimo; otros compuestos vol1tiles como el acetato de hexilo y 1-butanol aportan notas dulces y afrutadas, la trans- β -damascenona contribuye con notas dulces, perfumadas y afrutadas (Lea & Piggott, 2003). Dixon & Hewett (2000), Fuhrmann & Grosch (2002) y Tobergte & Curtis (2013), mencionan que otros compuestos arom1ticos significativos son los siguientes: aldeh1dos (acetaldeh1do, 3-(metiltio)-propionaldeh1do, hexanal, trans-2-hexenal, cis-3-hexenal, trans-2-octenal, cis-2-nonenal y trans-2-nonenal), alcoholes (1-butanol, 1-hexanol y trans-2-hexenol), etc.

Estos compuestos arom1ticos se forman a trav1s de diferentes rutas metab3licas donde intervienen los 1cidos grasos, amino1cidos y carbohidratos. Los 1cidos grasos son importantes precursores de compuestos vol1tiles. A partir de estos sustratos, las rutas metab3licas que conducen a la formaci3n de aromas son: la β -oxidaci3n, la α -oxidaci3n, la lactonizaci3n de hidroxi1cidos y la oxidaci3n catalizada por la lipoxigenasa (Dixon & Hewett, 2000).

La mayor1a de los compuestos arom1ticos se encuentran en proporciones variables en las distintas variedades de manzana, pero no parece haber un

compuesto característico clave para ninguna de ellas. A pesar de esto, existen grandes diferencias sensoriales en sabor y aroma entre las variedades (Arthey & Ashurst, 1996).

Los compuestos volátiles de las manzanas ha sido clasificados según el tipo y cantidad de ésteres o alcoholes, patrón de producción de aroma, color de epidermis o aldehídos. Las variedades han sido clasificadas de acuerdo al tipo y cantidad de éster: ésteres de acetato ('Calville Blanc', 'Golden Delicious'), ésteres del tipo de butanoato ('Belle de Boskoop', 'Canada Blanc', 'Richared'), ésteres de tipo propanoato ('Reinette du Mans', 'Richared', 'Starking') y ésteres etanólicos ('Starking'). Se ha encontrado que variedades de epidermis amarilla producen principalmente ésteres de ácido acético y variedades de epidermis roja producen en su mayoría ésteres de ácido butírico. Se han encontrado altas concentraciones de acetato de hexilo y acetato de butilo en variedades como; 'Cox's Orange Pippin', 'Elstar', 'Golden Delicious', 'Jonagold' y 'Jublie Delbar', mientras que en las variedades 'Granny Smith', 'Nico', 'Paulared', y 'Summerred' se cuantifican altas concentraciones de butanoato de etilo. Las variedades 'Boskoop' y 'Jacques Lebel' han sido caracterizadas por compuestos del tipo; α -famesene y 2-metilbutanoato de hexilo. En cuanto a la concentración de aldehídos, en las manzanas 'Cox's Orange Pippin' y 'Jonathan' se han encontrado cuatro a cinco veces más que en la 'Golden Delicious', de compuestos como hexanal y 100 veces más de trans-2-hexenal. Adicionalmente, también difieren en concentraciones de otros compuestos volátiles como el 4-metoxililbenceno (un compuesto aromático similar a especias,) que puede constituir hasta 0.27 % de volátiles en algunas variedades (Dixon & Hewett, 2000).

2.2. La sidra

2.2.1. Definición

La palabra sidra proviene del vocablo hebreo 'shekar' el cual designa toda bebida alcohólica diferente del vino, 'shekar' es el antecesor directo de la palabra latina Sicera que designa únicamente el jugo fermentado de manzana. La sidra es 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 (SAGARPA, 2016; AICV, 2017).

La sidras desde un punto de vista nutricional, 100 cc., aporta sólo 4 g de alcohol, 6 g de hidratos de carbono y 52 cal siendo una fuente rica en vitaminas y minerales como el potasio, zinc, magnesio, fósforo y sodio, también es rica en antioxidantes naturales, que ayudan a reducir los efectos negativos de los radicales libres (SAGARPA, 2016).

2.2.2. Importancia

a) Mundial

La sidra es conocida en numerosas partes del mundo, principalmente en Europa, de donde es originaria, el término “sidra” engloba una gran diversidad de productos derivados de la fermentación del mosto de manzana. En 2018, a nivel comercial 55.1 % de las ventas totales de la sidra se realizó dentro de la Unión Europea; con una producción anual de 981.3 millones de litros de sidra y perada, dentro del cual, 525.4 millones proceden del Reino Unido, 127 millones de Francia, 81.4 millones de Irlanda, 80 millones de Alemania y 78 millones de España (D.O.P Sidra de Asturias, 2017), América del Norte aportó 10.9 %, África, 13.3 %, Australia, 7.8 %, este de Europa 7.0 %, América latina 4.6 % y Asia tan solo 1. 2 % de las ventas totales (AICV, 2019).

b) Nacional

En México se producen las variedades de manzana: ‘Golden Delicious’, ‘Red Delicious’, ‘Gala’, ‘Rome’, ‘Starking’, ‘Red Chief’ y ‘Top Red’, los estados que destacan en rendimiento son Chihuahua y Durango. Dichas variedades también son usadas para la producción de sidra (SAGARPA, 2016). Actualmente las regiones de mayor producción de sidra en México se ubican en los estados de Puebla, Hidalgo, y Chihuahua (SAGARPA, 2018).

2.2.3. Tipos de sidra

Existen diferentes tipos de sidra (Tabla 2.6), y los países tradicionalmente productores de ésta, como Gran Bretaña y Francia, tienen sus propias especialidades. Por ejemplo; la sidra francesa a menudo se produce de una manera más natural sin aditivos y tratamientos modernos (Heikefelt, 2011).

Tabla 2.6. Tipos de sidra

Clasificación General	Sidra dulce	Mosto que sale directamente de exprimir la manzana tras la recolección y que no ha fermentado.
	Sidra de hielo	Obtenida a partir de mosto de manzana congelada naturalmente, por lo que tiene una mayor concentración de azúcares y más grados alcohólicos al eliminar parte del líquido.
	Sidra achampada o gasificada	Es un producto de reciente creación que no requiere verter de la botella a la copa, tiene una graduación de alcohol de unos 6 a 8 grados. En su elaboración está sometida a un proceso de filtrado que elimina impurezas y sedimentos
Clasificación en base a dulzor.	Seca	<30 g azúcar L ⁻¹ .
	Semiseca	30 a 50 g azúcar L ⁻¹ .
	Dulce	>50 g azúcar L ⁻¹ . Límite máximo 80 g L ⁻¹ .

(Gutiérrez *et al.*, 2016)

2.2.4. Proceso de elaboración de sidra tranquila

Para la elaboración de la sidra natural tradicional es preciso tener en cuenta los aspectos que se describen en la Figura 2.4 (Herrero *et al.*, 2010; D.O.P Sidra de Asturias, 2018).

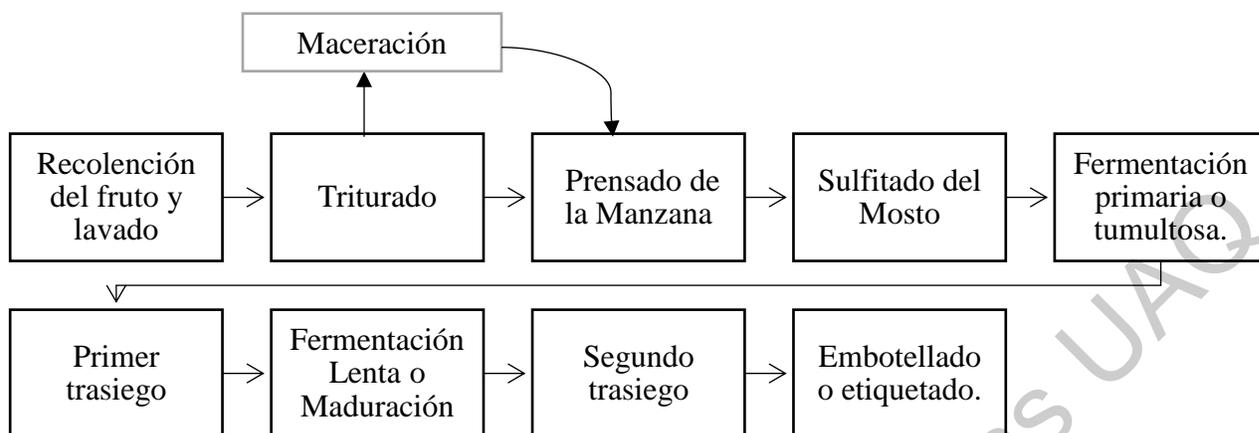


Figura 2.4. Elaboración de sidra tranquila tradicional

a) Recepción y lavado del fruto. Se deben asegurar condiciones sanitarias e higiénicas óptimas de la manzana (Gutiérrez *et al.*, 2016).

b) Triturado de la manzana. El fruto está constituido por la epidermis, la pulpa, las semillas y el tallo interior. El triturado supone la fragmentación mecánica del mismo, produciendo la ruptura de los tejidos celulares y la liberación del mosto contenido en las vacuolas de las células que componen la pulpa del fruto. El mosto obtenido en esta etapa suele denominarse mosto flor o primer mosto (Herrero *et al.*, 2010). Este mosto presenta una densidad variable, que oscila entre 1.040 a 1.060 y está constituido por 75 a 85 % de agua y azúcares, sustancias ácidas (ácido málico, cítrico, etc.), tanino, pectina, nitrógeno, minerales, vitaminas (C, B2, A, D, B3, etc.) y enzimas en disolución (D.O.P Sidra de Asturias, 2017; SAGARPA, 2017a).

c) Maceración prefermentativa. Consiste en dejar reposar el mosto durante 12 a 24 h, lo que favorece el desarrollo de aromas y compuestos fenólicos y mejora el rendimiento en mosto (Gutiérrez *et al.*, 2016). Esta etapa influye en las características organolépticas del producto final, las variables que definen una maceración adecuada son la temperatura y el tiempo. La temperatura deberá ser como máximo de 10 °C, siendo el intervalo óptimo entre 7 a 8 °C, ya que en este rango se consigue reducir apreciablemente la solubilidad de los polifenoles y la

actividad de las polifenoloxidasas, sin que se limite la solubilidad y difusión de los compuestos aromáticos en el medio azucarado (Herrero *et al.*, 2010).

d) Prensado de la pulpa. El prensado es una operación mecánica que permite la extracción del mosto que todavía permanece en la pulpa. Finalizada la etapa de prensado, se conducirá 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).

e) Sulfitado. Ejerce una acción diferencial sobre las poblaciones de levaduras, si bien esta actividad va a depender de la concentración empleada, del pH del mosto y de la presencia de compuestos que se unen al SO₂. Se considera, en general, que las poblaciones de levaduras no-*Saccharomyces* son más sensibles a la acción inhibitoria de este compuesto (Dueñas *et al.*, 2002). Además de eliminar microorganismos nativos, el sulfitado inhibe la acción de enzimas oxidantes que pueden perjudicar la calidad de la sidra y prepara la clarificación estática del mosto cuando se someta a esta operación (Flanzy, 2003).

f) Inoculación. La inoculación de cepas de levaduras seleccionadas reduce el desarrollo de cepas autóctonas que puedan tener un efecto negativo sobre la calidad de la fermentación. Para ello se añade una población de levaduras secas activas; esto permite disponer de una importante población de levaduras, lo que produce un rápido arranque y desarrollo de la fermentación (Hidalgo, 2002).

g) Fermentación. La fermentación es una sucesión de transformaciones bioquímicas de los componentes del mosto llevados a cabo por levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas (Martínez, 2005). Los dos procesos microbiológicos principales en la fermentación de la sidra son la fermentación alcohólica y la fermentación maloláctica.

- Fermentación alcohólica (FA)

A la primera fase del proceso de fermentación de la sidra se le suele denominar fermentación primaria o tumultuosa. Se caracteriza porque la llevan a cabo levaduras del género *Saccharomyces*, que transforman los azúcares (fructosa y glucosa, principalmente) del mosto en etanol y CO₂ mediante el proceso microbiológico de la FA. El CO₂ producido arrastra materiales en suspensión y forma gran cantidad de espuma. Posteriormente, la velocidad del consumo de azúcares y liberación del CO₂ se ralentiza hasta llegar al final del proceso (Gutiérrez *et al.*, 2016).

- Maduración o fermentación maloláctica

El proceso más importante durante la fase de maduración es la fermentación maloláctica (FML), la cual ocurre después de que la fermentación alcohólica (FA) ha terminado y cuando la población nativa de bacterias ácidolácticas (LAB) ha aumentado, ésta consiste en la transformación del ácido málico en ácido láctico, con desprendimiento de CO₂, por acción de un grupo de bacterias lácticas que poseen la enzima maloláctica, este proceso permite reducir la acidez de la sidra pero, además, mejora las características sensoriales como la complejidad de los aromas y favorece la estabilidad microbiológica del producto final. Las bacterias responsables de esta transformación pertenecen, en su mayoría, a los géneros *Oenococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactobacillus*, reduce la acidez de la sidra pero, además, mejora las características sensoriales como la complejidad de los aromas y favorece la estabilidad microbiológica del producto final (Muñoz *et al.*, 2014; Mendoza *et al.*, 2017)

h) Trasiego. Se efectúa al final de la fase fermentativa y persigue la separación de las borras de fermentación de la sidra para garantizar su estabilidad fisicoquímica y microbiológica. El trasiego consiste en el cambio de la sidra de un tonel a otro para separar las borras. Esta operación persigue tres objetivos (Martínez, 2005):

- El primero eliminar los residuos (borras) producidos en el proceso fermentativo con el fin de clarificar la sidra y garantizar una adecuada estabilidad.
- El segundo mezclar la sidra de los distintos toneles con el fin de homogeneizar el producto.
- Evitar alteraciones indeseables causadas por microorganismos, capaces de metabolizar compuestos que darían lugar a productos secundarios responsables de características organolépticas inaceptables para la sidra

2.2.5. Elaboración de sidra espumosa por el método “*champenoise*”

La sidra espumosa se caracteriza por presentar abundante espuma en el momento de ser servida y consumida. La elaboración de la sidra se lleva a cabo a través de dos fermentaciones alcohólicas (Figura 2.5). La primera de ellas dará lugar a la sidra base, que se obtiene por fermentación total del mosto de manzana a presión atmosférica; existen diversos métodos para la elaboración de bebidas espumosas como el método de transferencia o transfer, el método *Charmat* y uno de los métodos más utilizados es el “*Champenoise*” o tradicional.

En el método *Champenoise*, la segunda fermentación se realiza en botella, donde tiene lugar la toma de espuma una vez añadido a la sidra de base el denominado licor de “*tirage*” (Arthey & Ashurst, 1996; D.O.P Sidra de Asturias, 2018).

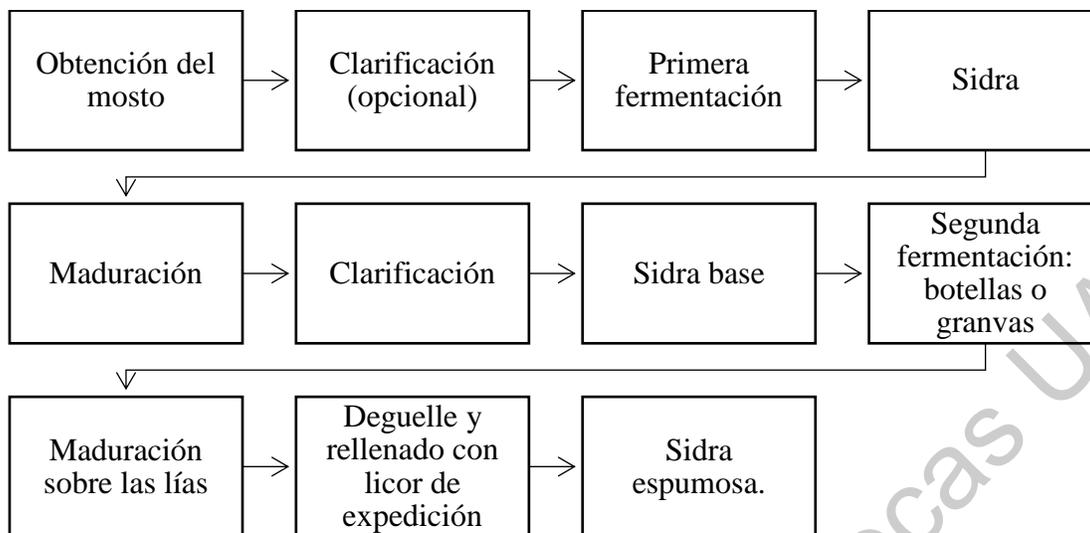


Figura 2.5. Elaboración de sidra espumosa (Herrero *et al.*, 2010; D.O.P Sidra de Asturias, 2018).

a) Sidra base. La elaboración de la sidra base sigue el mismo protocolo que en el caso de la sidra natural, recomendándose que la concentración de azúcares residuales no exceda de 5 g L^{-1} . Hay que hacer especial énfasis en el proceso de maduración de la sidra, que se desarrolla una vez finalizada la fermentación alcohólica y es consecuencia de la actividad de un grupo complejo de microorganismos, como levaduras y bacterias lácticas y acéticas (Blanco-Gomis & Mangas-Alonso, 2010).

b) Clarificación. Es una etapa que se lleva a cabo desde que se obtiene el mosto hasta el término de la fermentación, dentro de las cual está implicado los trasiegos: el primero se realiza con el mosto previo a la primera fermentación, el segundo después de concluido la fermentación alcohólica y el tercero después de una segunda fermentación en la elaboración de las bebidas espumosos (Flanzy, 2003). Estas etapas del proceso pueden ser asistido por una clarificación química, que consiste en añadir proteínas al mosto, generalmente gelatina. Esta proteína, al pH del mosto, está cargada positivamente, por tanto, interaccionar con las partículas negativas insolubilizándolas; por otra parte, dado que es una molécula rica en residuos de prolina puede también interactuar con los polifenoles del mosto dando

lugar a la formación y sedimentación de flóculos que producen su clarificación (Lea & Raymond, 1990; Herrero *et al.*, 2010).

Esta etapa suele ser importante ya que, el perfil aromático de la sidra también está condicionado por la tecnología de clarificación prefermentativa. Asimismo, la utilización de la precipitación vía enzimática reduce el contenido de los alcoholes superiores (amílicos, isobutanol y 2-feniletanol), el caprilato de etilo y el 3-metil-1-propanol e incrementa el de acetato de etilo (Mangas *et al.*, 1996; Herrero *et al.*, 2010).

c) Segunda fermentación. Durante esta fermentación se lleva a cabo la aplicación del “licor de tiraje” a la sidra base; éste consiste de una mezcla de azúcar disuelto en una pequeña porción de la sidra base, junto al cultivo de levaduras. Este jarabe se mezcla con el total de la sidra. Las levaduras que consumen el azúcar durante la segunda fermentación se van a multiplicar formando un depósito y van a liberar el gas carbónico que incrementará la presión en la botella (Flanzy, 2003).

d) Maduración. Es el tiempo que la sidra permanece en los toneles o depósitos, previo a su embotellado. Durante esta etapa se realizan controles sistemáticos de acidez total, volátil y pH, como indicadores de su evolución. El proceso más importante durante la fase de maduración es la fermentación maloláctica (FML), que consiste en la transformación del ácido málico en ácido láctico, con desprendimiento de CO₂, por acción de un grupo de bacterias lácticas que poseen la enzima maloláctica (Herrero *et al.*, 2010).

Para eliminar los sedimentos de la fermentación y que el líquido quede completamente claro, se colocan las botellas con el cuello hacia abajo y en un ángulo de unos 45 grados en los pupitres (Figura 2.6).

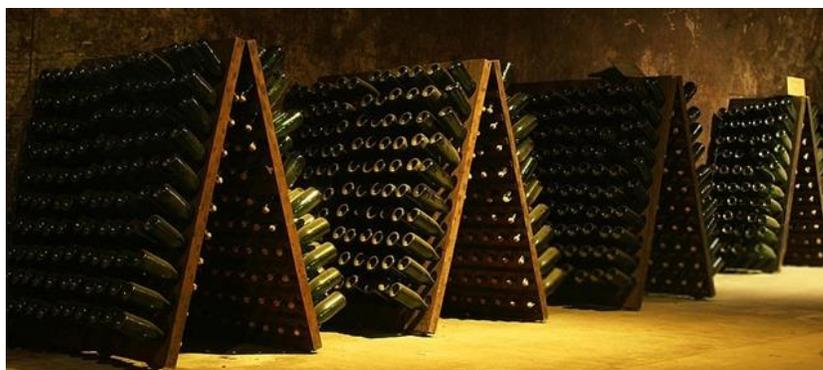


Figura 2.6. Sidra de segunda fermentación

b) Degüelle. Este proceso se lleva a cabo para eliminar los sedimentos acumulados en el cuello de la botella. Previamente, el producto se enfría de 4 a 10 °C y, a continuación, el cuello de la botella es introducido en una disolución de cloruro de calcio o de glicol a -15 °C, lo que permite que se congele el sedimento y una pequeña proporción de líquido. La presión que existe en el interior de la botella permite expulsar el sedimento congelado cuando ésta se destapa (Herrero *et al.*, 2010).

c) Licor de expedición. La expulsión de las lías de fermentación en la operación de degüelle origina una merma de volumen. Con el fin de recuperar dicho volumen se añade el licor de expedición. El principal componente es el azúcar, que permite edulcorar el producto, equilibrar la acidez, enmascarar la astringencia, el amargor y modificar ligeramente el sabor. La concentración de azúcar añadido define el tipo de bebida espumosa así, por ejemplo, entre 0 y 15 g L⁻¹ se define la categoría “Brut”, distinguiéndose las subcategorías “Extra Brut”, con menos de 6 g L⁻¹ y “Brut Nature”, con menos de 3 g L⁻¹; entre 12 y 20 g L⁻¹ la clase “Extra Seco”; entre 17 y 35 g L⁻¹ “Seco”; entre 33 y 50 g L⁻¹ “Semiseco” y por encima de 50 g L⁻¹ “Dulce” (Ferrer, 2016).

La Figura 2.7 ilustra el proceso de obtención de sidra espumosa por el método *champenoise*.



Figura 2.7. Fase dos de la elaboración de sidra por el método *champenoise* (Pando, 2011).

2.2.6. Calidad sensorial de la sidra espumosa

La caracterización de productos alimenticios basada en evaluaciones sensoriales juega un papel importante en el control de calidad para todos los productos, entre los que destacan los alimentos y las bebidas (alcohólicas o no) que en gran medida se ingieren por placer, por lo tanto, deben cumplir con requisitos sensoriales bien definidos y, de no hacerlo, no pueden salir al mercado con la certificación deseada (Antón, 2015).

Los términos de descripción y valoración en las sidras engloban vocablos comunes a otras bebidas y productos alimenticios como: el color, la turbidez, la acidez, el equilibrio, etc. Por ejemplo, la espuma es una de las características más importantes de la sidra, debido a que es el primer atributo que perciben los consumidores y que consta de: espuma inicial, área/características de la espuma, número de sitios de nucleación, tamaño de burbuja y collar de la espuma. Muchos estudios han conducido a las proteínas, polisacáridos y ácidos grasos como importantes moléculas en la constitución y estabilización de la espuma (Cabranes, *et al.*, 1996).

2.2.6.1. Características visuales

Alrededor de 80 % de la información que recibimos del entorno nos llega por vía visual y, aproximadamente, 40 % de ella es cromática. Esto explica la repercusión que tiene la apariencia en la percepción, así como su interacción en la evaluación de otras propiedades del alimento. Además del color, la transparencia y la turbidez pueden ser también importantes. La transparencia se refiere a la resistencia de un cuerpo a ser atravesado por la luz, mientras que la turbidez se debe a la difusión de la luz en el seno del cuerpo. Por tanto, un cuerpo turbio será poco transparente, porque la difusión de luz en su seno reduce la cantidad de luz que lo atraviesa. En el caso de ciertos productos como la cerveza, los vinos espumosos o gasificados y las sidras, algunas otras cualidades de la apariencia también son importantes para su calidad (Herrero *et al.*, 2010). Por ejemplo; el color de la sidra, que debe ser claro, se debe a la presencia de pigmentos presentes en las manzanas, clorofilas, carotenoides y compuestos fenólicos. Estos últimos son incoloros en su gran mayoría, pero se oxidan fácilmente dando tonos amarillos, dorados, marrones, etc., según avanza el grado de oxidación (Antón, 2015).

También cabe recalcar que la espuma es una de las características más importantes de la sidra espumosa. La formación y la estabilidad han sido consideradas como las principales características que definen el fenómeno espumante. Asimismo, la composición química juega una influencia en las características de la espuma. Principalmente aminoácidos y polisacáridos que al interaccionar modifican sus propiedades en consecuencia la formación y estabilidad de la espuma (Bishop, 1975). Algunos ácidos no volátiles, como los ácidos tartárico y málico, también tienen una influencia positiva en formación de espuma, mientras que etanol, acidez volátil y el dióxido de azufre total tienen una contribución negativa a este factor de calidad (Valles *et al.*, 2007). Es por ende que se aprecia como primer atributo de calidad, englobados en variables sensoriales como, la cantidad de espuma, el empalme (la estabilidad de la espuma), la formación de burbujas, la persistencia de la espuma en la superficie del líquido, etc. (Herrero *et al.*, 2010).

2.2.6.2. Características aromáticas

En la sidra se pueden encontrar distintos compuestos aromáticos en función de factores tales como la variedad de manzana, el año de cosecha, las prácticas culturales, la fase prefermentativa, la fermentación y las condiciones de conservación del producto. Éstos se clasifican según su origen, distinguiéndose (Antón, 2015):

- d) Aromas varietales. Provenientes del fruto y dependientes esencialmente de la variedad, el portainjerto y de factores agroecológicos (fertilización, condiciones climáticas, maduración, etc.).
- e) Aromas prefermentativos. Formados desde la recolección hasta la fermentación alcohólica, y que incluyen la molienda, maceración, prensado y tipo de clarificación de los mostos.
- f) Aromas fermentativos. Debidos a las levaduras y bacterias involucradas en la transformación de los mostos, así como a las condiciones que rigen el proceso fermentativo (pH, temperatura de fermentación, nutrientes, etc.).
- g) Aromas posfermentativos. Constituidos por los compuestos volátiles que se forman durante la maduración de la sidra en el tonel, o con posterioridad, durante el embotellado.

Una de las técnicas mayormente usadas para el estudio de estos perfiles aromáticos es la cromatografía, en particular la de gases (Arias-Abrodo *et al.*, 2010). Por ejemplo Wang *et al.* (2016) por medio de cromatografía de gases (HS-SPME-GC-MS) encontró que en vinos comerciales los ésteres eran los componentes volátiles predominantes, así como; β -damascenona, 3-metilbutil acetato, etil hexanoato y 3-MHA. Específicamente, se descubrió que la β -damascenona es uno de los compuestos aromáticos clave asociados con los caracteres “frutales” en el vino rosado. Mientras que tioles como el 3-MH y 3-MHA, se han considerado compuestos aromáticos claves con notas “afrutadas” y “cítricas”.

2.2.6.3. Características gustativas

Las sensaciones olfativas y gustativas que produce un alimento llevan a una respuesta conjunta que definirán la calidad del producto. En el caso de la sidra, los sabores característicos son el dulce, ácido y el amargo. La importancia de estos dos sabores, por ejemplo, ha permitido la clasificación de las sidras francesas e inglesas en grupos dependiendo de su acidez total, asociada al sabor ácido y por el contenido de taninos, asociado al amargo, sin tener en cuenta la concentración de azúcares. Así, sidras con poca acidez ($<4.5 \text{ g L}^{-1}$) y con pocos taninos ($<2 \text{ g L}^{-1}$) son clasificadas como dulces (Lea *et al.*, 1990). En el caso de las sidras naturales, los rangos de dulzor son menores y en general son secas. Los máximos responsables de las sensaciones ácidas son los ácidos málico, quínico, láctico, dihidrosiquímico, citramálico y succínico, que estarán en mayor o menor cantidad, dependiendo del desarrollo de la fermentación alcohólica y maloláctica. La acidez de ciertas sidras también se debe a la presencia del ácido acético en cantidades por encima de su umbral de percepción (Herrero *et al.*, 2010; Antón, 2015).

2.3. Levaduras

2.3.1. Generalidades

Entre los factores que van a determinar las características organolépticas de las sidras, los microorganismos tienen un papel prominente. Éstos afectarán a la materia prima, al desarrollo de la fermentación y, en definitiva, a la calidad de la sidra, ya que metabolizan los azúcares y otros componentes del mosto para producir un gran número de productos finales (Herrero *et al.*, 2010).

Las levaduras son microorganismos eucariontes, definidos como hongos microscópicos, unicelulares, pueden reproducirse tanto asexualmente por gemación, como sexualmente mediante la formación de ascosporas. Sus condiciones óptimas de desarrollo se encuentran entre 25 y 30 °C con un máximo de 47 °C, pH de 4 a 4.5, y en general los azúcares son su fuente energética (Faria-Oliveira *et al.*, 2013).

2.3.2. Características genéticas

Las cepas de levaduras pueden ser haploides, aneuploides o poliploides. Una cepa haploide contiene aproximadamente de 12 a 13 mega bases (mb) de ADN nuclear organizado en 16 cromosomas, cuyos tamaños varían entre 250 y 2.000 kilo bases (kb). Muchas de las cepas de *Saccharomyces* spp. usadas en el laboratorio son haploides o diploides, con longitudes cromosómicas definidas (Pando *et al.*, 2010). Sin embargo, las cepas vínicas son predominantemente diploides, aneuploides y ocasionalmente poliploides (Pretorius, 2000).

2.3.3. Morfología

Las células de las levaduras presentan características estructurales y funcionales de las células eucariotas. Están constituidas de una pared celular rígida, que les permite soportar la elevada presión osmótica extracelular, periplasma y membrana plasmática, que rodea al citoplasma celular. El medio intracelular contiene diferentes orgánulos, cuya organización es mantenida por un citoesqueleto. El citosol contiene numerosas enzimas, entre ellas las responsables de la fermentación alcohólica (Lea & Raymond, 1990; Herrero *et al.*, 2010).

La vacuola es el organelo clave implicado en el tráfico intracelular de proteínas. Su principal actividad es la ruptura proteolítica no específica de proteínas. Además, constituye un reservorio de aminoácidos básicos, polifosfatos y ciertos iones metálicos y está implicada en la homeostasis de las concentraciones iónicas citoplasmáticas y en la osmoregulación. Las mitocondrias de la levadura contienen su propio material genético y su maquinaria de transcripción y traducción. Son estructuras dinámicas cuyo tamaño, forma y número varía ampliamente de acuerdo con el tipo de cepa, fase del ciclo celular, concentración de glucosa, presencia de sustratos no fermentables y disponibilidad de esteroides y ácidos grasos. En los mostos predomina la actividad fermentativa frente al metabolismo respiratorio, incluso en condiciones de aerobiosis, debido a que la presencia de glucosa en el medio reprime la síntesis de enzimas respiratorias (Faria-Oliveira *et al.*, 2013).

2.3.4. Fisiología

La mayoría de las especies de levadura (incluida *S. cerevisiae*) generalmente existen en una etapa diploide. Estos microorganismos involucrados durante la fermentación pueden producir una amplia variedad de compuestos, que dan atributos sensoriales típicos (Johansen *et al.*, 2019).

Los rasgos más deseables de las levaduras incluyen la degradación rápida y completa de azúcares en etanol y CO₂ (Figura 2.8), para proporcionar metabolitos y compuestos aromáticos que impactan positivamente el equilibrio sensorial del vino o sidra dando como resultado la producción de cantidades considerables de ésteres (Id *et al.*, 2017), sin producir compuestos indeseables. Así como, numerosos subproductos fermentativos (glicerol, ácidos carboxílicos, aldehídos, alcoholes superiores, ésteres, compuestos de carbonilo, compuestos de azufre, etc.), procedentes de la degradación de azúcares, aminoácidos y ácidos grasos. Por ejemplo, en la vinificación, los componentes principales de las uvas deben incluir azúcares (glucosa principal azúcar metabolizado y fructosa, presentes en altas concentraciones, 180 a 300 g L⁻¹), ácidos orgánicos (tartárico y málico), cationes minerales (especialmente potasio), compuestos de nitrógeno y lípidos (fitosteroles) (Marsit & Dequin, 2015). Además, la actividad humana ha dado forma a la genética de la población de levaduras para obtener levaduras con propiedades adaptativas para su uso en varios procesos de fermentación industrial (Brice *et al.*, 2018).

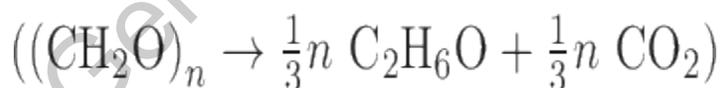


Figura 2.8. Reacción de la fermentación alcohólica (Jansen *et al.*, 2017)

Desde una perspectiva más particular, la fermentación es un proceso redox influenciado por el equilibrio NAD⁺/NADH. La mayor parte de NAD⁺ se reduce durante la glucólisis, reacción catalizada por la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Por ende, es esencial reciclar NAD⁺ y oxidar NADH; de lo contrario, el flujo glucolítico disminuye, lo que puede conducir al agotamiento de la carga de energía ATP que podría ser letal para la célula. La mayor parte del NADH producido durante la glucólisis se oxida posteriormente durante la formación de

etanol. Además del etanol, la producción de varios metabolitos, como el glicerol y el ácido acético, está relacionada con el equilibrio redox (Goold *et al.*, 2017).

2.3.5. Levaduras encontradas en mostos y sidra

La fermentación del mosto de manzana es un proceso microbiológico complejo que implica la evolución secuencial de varias especies de levaduras, bacterias lácticas y acéticas (Beech, 1972). Entre éstas, las levaduras tienen una influencia dominante, dado que realizan la fermentación alcohólica (Herrero *et al.*, 2010). En cuanto a la microbiota encontrada en la manzana madura, hay que destacar la presencia de varios géneros de levaduras, tales como *Rhodotorula*, *Candida*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Kloeckera/Hanseniaspora* (Beech, 1972).

Las principales levaduras que se pueden encontrar en la sidra son del género *Saccharomyces*, predominantemente del tipo diploide o aneuploide y ocasionalmente poliploides (Pretorius, 2000). En la elaboración de la sidra natural, la fermentación espontánea y durante el desarrollo del proceso de elaboración intervienen estirpes de levaduras procedentes de la manzana, así como del equipamiento de bodega (Beech, 1972). Un estudio de sidras no pasteurizadas y mostos de sidra obtenidos de diferentes sidrerías de las regiones del noroeste de Francia encontró 15 especies de levadura de 208 aislados seleccionados. La principal especie en este estudio fue *S. bayanus* que representa 34.5 % de los aislamientos, seguida por *S. cerevisiae*, *Lachancea cidri*, *Dekkera anomala* y *Hanseniaspora valbyensis* que representan 16 %, 15 %, 10.5 % y 6.5 % de los aislamientos, respectivamente. Las proporciones de cada una de las otras 10 especies, como, *Candida oleophila*, *C. sake*, *C. stellate*, *C. tropicalis*, *H. uvarum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia delftensis*, *P. misumaiensis* y *P. nakasei*, nunca excedieron el 3.5 % del total de aislamientos. La diversidad de levadura fue mayor en los mostos de sidra que en las sidras embotelladas (Id *et al.*, 2017). Se hizo la misma observación en sidras naturales de Asturias (España), los aislamientos indicaron que las especies *Saccharomyces* presentes fueron *S. cerevisiae* y *S. bayanus* aparentemente, donde *S. bayanus* fue

la especie predominante al inicio y mitad de la fermentación, mientras que *S. cerevisiae* se hizo cargo del proceso en las etapas finales (Suárez *et al.*, 2007)

Se observa una gran similitud en la sucesión de levaduras entre los procesos de fermentación de sidras y vinos. Durante las etapas iniciales de la fermentación alcohólica se desarrollan principalmente especies no-*Saccharomyces*, siendo mayoritarias las levaduras apiculadas del tipo *Hanseniaspora/Kloeckera*, que se caracterizan por un bajo poder fermentativo y poca tolerancia al etanol. Posteriormente, durante la fase más activa de la fermentación, se imponen las levaduras del género *Saccharomyces* que tienen una gran capacidad fermentativa. Con respecto a las levaduras del género *Saccharomyces*, las especies *S. cerevisiae* y *S. bayanus* son consideradas como las más importantes del proceso fermentativo (Herrero *et al.*, 2010; Id *et al.*, 2017). Es importante destacar que las poblaciones de levaduras fluctúan de un año de producción a otro. Estas variaciones constituyen una "microbiota transitoria" (Pando, 2011).

2.3.6. Contribución de las levaduras en la fermentación

Durante la fermentación alcohólica se producen muchos subproductos como ésteres, alcoholes superiores y compuestos fenólicos como metabolitos secundarios. Los ésteres proporcionan principalmente notas afrutadas y florales; los alcoholes superiores proporcionan "sabores de fondo"; mientras que los compuestos fenólicos pueden generar notas aromáticas interesantes o desagradables. Los ésteres son los principales compuestos volátiles en la sidra detrás del etanol (Valappil *et al.*, 2009). Se caracterizan por una alta presencia de acetato de etilo, que puede representar hasta 90 % de los ésteres totales (Lilly *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2006). La mayoría de los ésteres son responsables de las características afrutadas de las sidras, de los cuales pueden considerarse dos grupos importantes: los ésteres de acetato y los ésteres etílicos (Mangas *et al.*, 1996). Los primeros son el resultado de la esterificación de acetyl-CoA y un alcohol. El segundo grupo, los ésteres etílicos, están compuesto de etanol y un ácido graso de cadena media (Saerens *et al.* 2010). En particular, los acetatos de hexilo, isoamilo, 2-feniletilo y el caprilato de etilo aportan aromas "afrutados", y el acetato

de 2-feniletilo, contribuye al aroma general con notas “florales” (Le Quéré *et al.*, 2006). Sin embargo, una cantidad excesiva de acetato de etilo puede conducir a un desagradable olor a solvente (Id *et al.*, 2017).

Los alcoholes superiores que tienen un umbral olfativo de hasta 300 mg L⁻¹, a pesar de que constituyen una cantidad menor de las sustancias totales (Vidrih & Hribar, 1999), se derivan directamente del metabolismo de las levaduras. Éstos se generan durante la fermentación a partir de oxoácidos que se originan de los aminoácidos y el metabolismo del azúcar (Blanco-Gomis & Mangas-Alonso, 2010). En las sidras, están mayoritariamente representadas por isopentanoles (2-metilbutanol y 3-metilbutanol) seguidos de isobutanol, propanol, butanol, hexanol, 2-feniletanol y tirosol. Aunque constituyen una cantidad relativamente baja de los compuestos totales, los alcoholes superiores pueden influir en gran medida en las características sensoriales (Id *et al.*, 2017).

La tercera clase de productos secundarios, son los compuestos fenólicos, que también tienen efectos importantes sobre las propiedades organolépticas de las sidras de manzana. Estos compuestos derivados de la materia prima tienen un impacto principalmente en el color, el amargor y la astringencia. Se sabe que las procianidinas de alto peso molecular en las sidras contribuyen a la astringencia, mientras que los compuestos más pequeños contribuyen al sabor amargo. Simultáneamente, influyen en la dulzura y la acidez, resaltando aún más su importancia en el desarrollo general del sabor. Además de los compuestos fenólicos no volátiles, los fenoles volátiles formados principalmente por la descarboxilación enzimática durante la fermentación contribuyen al aroma (Id *et al.*, 2017), seguido de aldehídos como el succinato de dietilo, ácidos grasos y los terpenos que se aprecian en concentraciones relativamente bajas (Qin *et al.* 2018).

2.3.7. Criterios de selección

El uso de cepas aisladas es una estrategia interesante para mantener la calidad y la reproducibilidad de las bebidas fermentadas. Esto es especialmente cierto cuando se aplica el método *champenoise*. El cultivo y la selección de cepas de levadura se cree que es más efectivo que el uso de cepas comerciales, ya que

estas cepas endémicas están potencialmente mejor aclimatadas a las condiciones ambientales que las cepas comerciales (Suárez-Valles *et al.*, 2008).

Las levaduras que se utilizan para la elaboración de sidras espumosas deben presentar atributos como: tolerancia a la presión, al alcohol, los sulfitos y a las bajas temperaturas, tener alta capacidad fermentativa, disponer de elevada capacidad de floculación o aglutinación, no ser productoras de aromas indeseables, presentar un efecto positivo sobre la carbonatación, entre otras (Herrero *et al.*, 2010; Eleutério dos Santos *et al.*, 2016).

Dirección General de Bibliotecas UAQ

OBJETIVOS

General

Determinar las características físicas, químicas y sensoriales, así como el tipo de compuestos volátiles presentes en sidras elaboradas con dos cultivares de manzana a partir de levaduras nativas seleccionadas en la región productora de Querétaro.

Específicos

- Evaluar el comportamiento fermentativo de distintas cepas de levaduras durante la fermentación del mosto de dos variedades de manzana.
- Determinar las características físicas y químicas de las sidras espumosas obtenidas con distintas cepas de levaduras en dos cultivares de manzana.
- Evaluar la calidad sensorial de las sidras espumosas obtenidas con distintas levaduras.
- Determinar el perfil de los compuestos aromáticos en las sidras espumosas obtenidas mediante cromatografía de gases (CG).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. 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.

3.2. Material biológico

Se utilizaron manzanas de los cultivares 'Red Delicious' y 'Golden Delicious' provenientes de huertos comerciales del estado de Querétaro. Las principales características de las variedades se detallan en la Tabla 3.1. Así mismo, se emplearon tres cepas de levaduras (RY5, MM7 y 436.4) aisladas de distintas variedades de manzana de un huerto localizado en Amealco, Querétaro, México (León, 2019), y como cepa de referencia, se empleó *Saccharomyces cerevisiae* K1-V1116.

Tabla 3.1. Características físicas de dos variedades de manzana

Variedad	Maduración	Color	Destino
'Golden Delicious'	intermedia	amarillo	Fruto de mesa e industrial.
'Red Delicious'	intermedia	rojo estriado	Fruto de mesa y e industrial.

(Mendoza-González *et al.*, 2008)

3.2. Preparación de inóculo de levaduras

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) en placas 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 minutos, se eliminó el sobrenadante y se ajustó a una concentración de 10⁶ UFC mL⁻¹. Finalmente, las células se lavaron con solución salina isotónica (SSI) a 0.85 % (Sandoval *et al.*, 2011). Previamente, para estimar la tasa de crecimiento de los microorganismos en el medio nutritivo, y así preparar el inóculo con

aproximadamente 10^6 UFC mL⁻¹ de la cepa de levadura seleccionada, se realizaron pruebas preliminares de cuenta viable con algunas cepas seleccionadas adaptado de la metodología de Sandoval *et al.* (2011).

3.3. Evaluación del efecto de las levaduras en la primera fermentación

Se seleccionaron manzanas sanas de ambos cultivares y se lavaron y desinfectaron con hipoclorito de sodio (50 ppm). El jugo se obtuvo usando un extractor TURMIX estándar, se filtró con manta de cielo estéril, se sulfitó con metabisulfito de potasio ($K_2S_2O_5$) (6 g HL^{-1}) y se desfangó mediante el trasiego del jugo claro después de mantenerlo a $3 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Se determinó la acidez total titulable, sólidos solubles totales y pH. 500 mL de mosto preclarificado se repartió en matraces de 1 L (Figura 3.1), los cuales se inocularon de manera independiente con cada cepa de levadura; la fermentación se llevó a cabo a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta llegar a una densidad menor a 0.996 g cm^{-3} (9 ± 1 día). Durante este proceso se determinó el comportamiento fermentativo de las distintas cepas de levadura (inciso 3.6). La sidra obtenida al final de la fermentación se sometió a análisis físicos y químicos (Miranda, 2013).



Figura 3.1. Primera fermentación en matraces de 1 L para la obtención de sidra tranquila

3.4. Evaluación de las cepas de levaduras en la segunda fermentación

Un volumen de aproximadamente 16 L de jugo de manzana de las dos variedades se colocó en sendos contenedores de vidrio de 20 L, los cuales se inocularon con la cepa seleccionada en el experimento anterior con el fin de obtener

la sidra base. Para la segunda fermentación se utilizó el método *champenoise*. La sidra tranquila (producto de la primera fermentación) obtenida se dejó reposar durante una semana a 3 ± 1 °C y se clarificó con albúmina (27.5 mL HL^{-1}); posteriormente se depositó en botellas de PET de 250 mL de capacidad (Figura 3.2) y se adicionó el licor de tiraje (levadura 10^6 UFC mL^{-1} y sacarosa 25 g L^{-1}). La segunda fermentación se llevó a cabo a 15 ± 1 °C durante aproximadamente 28 días. La fermentación se monitoreo midiendo la presión interna de la botella, empleando un manómetro AUTOTEC (Soto-Herrera *et al.* 2008). Durante la fermentación se analizaron los distintos tipos de azúcares, ácidos orgánicos y nitrógeno total y al finalizar la segunda fermentación se analizaron las variables químicas, físicas, sensoriales y compuestos volátiles de las sidras.



Figura 3.2. Dispositivos en las botellas para el monitoreo de la evolución de la segunda fermentación de las diferentes cepas de levadura para la obtención de sidra espumosa

3.5. Análisis de las sidras obtenidas

3.5.1. Comportamiento fermentativo de las cepas de levaduras

Para evaluar el comportamiento de las distintas cepas de levaduras en la primera fermentación, se midió diariamente la pérdida de peso de los matraces que contenían 500 mL de mosto de manzana hasta obtener un peso constante (Miranda, 2013). Con ello se calculó la energía fermentativa (EF) la cual se obtuvo a partir de las pesadas, la cual se expresa en g de CO_2 desprendido cada 48 horas, y nos proporciona una medida de la velocidad de fermentación de la levadura en el medio probado (CEE, 1990).

3.5.2. Análisis físicos y químicos

3.5.2.1. Densidad

La densidad se midió en función de la masa por unidad de volumen de la Sidra o mosto a 20 °C mediante un picnómetro Pyrex de 25 mL de capacidad (OIV, 2018). Expresándose en gramos por mililitro (g mL⁻¹).

$$\rho_{20^{\circ}\text{C}} = \frac{p'' - p}{V_{20^{\circ}\text{C}}}$$

p= picnómetro vacío

m= masa del aire

p''= peso del picnómetro con muestra

ρ = densidad mg L⁻¹

3.5.2.2. pH

Se evaluó mediante un potenciómetro CONDUCTRONIC pH10 calibrado con soluciones amortiguadoras de 4 y 7 de acuerdo a la OIV (2018).

3.5.2.3. Sólidos solubles totales (°Bx)

Se tomó una gota del mosto de manzana, el cual se depositaba en un refractómetro Atago, modelo SPR-N. Los resultados obtenidos se reportaron como °Brix, basado en lo reportado por Morán (2014).

3.5.2.4. Anhídrido sulfuroso total (Método de Ripper)

Previo al experimento se preparó una solución de almidón, en donde se mezclaron 0.5 g de almidón en 50 mL de agua, se llevaron a ebullición agitando continuamente y se calentó durante 10 min. Se agregaron 20 g de cloruro de sodio, se enfrió y llevó a 100 mL.

El anhídrido sulfuroso libre se determinó en la sidra por valoración directa con Yodo. El anhídrido sulfuroso combinado se determina por valoración iodométrica después de hidrólisis alcalina.

SO₂ Libre. Se colocaron 50 mL de sidra en un matraz Erlenmeyer al cual se le agregaron 3 mL de H₂SO₄, 30 mg de EDTA y 5 mL de una solución de almidón al 2.0 %. Posteriormente se tituló con una solución de yodo 0.02 M, hasta obtener el vire a color marrón-violeta. La concentración de SO₂ libre en mg L⁻¹ fue calculada como sigue:

$$\text{SO}_2 \text{ libre (mg L}^{-1}\text{)} = 32(n)$$

Para el SO₂ combinado, a esa misma solución se le adicionaron 8 mL de NaOH 4 M, se agitó y dejó reposar durante 5 min. Agitando manualmente se adicionaron 10 mL de H₂SO₄ e inmediatamente se titula con una solución de yodo 0.025 M. n' fueron los mL de yodo gastados.

A la misma solución 20 mL de NaOH 4 M, se agitó y dejó reposar durante 5 min. Posteriormente, se agregaron 200 mL de agua helada y con constante agitación se agregaron 30 mL de H₂SO₄. Se tituló el SO₂ liberado con solución de yodo 0.025 M. n'' fueron los mL de yodo utilizados

A partir de lo obtenido se calculó mediante la siguiente ecuación.

$$\text{SO}_2 \text{ total (mg L}^{-1}\text{)} = 32(n + n' + n'')$$

Si se requiera calcular SO₂ Combinado. Este se obtiene mediante la diferencia del total menos el libre de acuerdo al método de la OIV (2018).

3.5.2.5. Acidez total titulable

El contenido de acidez del mosto y sidra se determinó mediante la titulación de la muestra con una solución de hidróxido de sodio 0.1 M. En un vaso de precipitados se colocaron 50 ml de Sidra (10 mL de mosto y 40 mL agua destilada y se agitó por 5 minutos con la ayuda de un agitador magnético para eliminar el dióxido de carbono presente en la sidra. Posteriormente, a cada solución se le midió el pH y se comenzó a titular con la solución de NaOH valorada. La titulación terminó cuando se alcanzó un pH de 8.2 (OIV, 2016).

La acidez se expresa en g L^{-1} de ácido málico utilizando la siguiente fórmula:

Ecuación para la acidez titulable:

$$AT = \frac{V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{NaOH}} \times F_{\text{ma}} \times 1000}{V_m}$$

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

Fma = Factor del ácido málico (0.067)

V_m = Volumen de la muestra

3.5.2.6. Acidez volátil

La acidez volátil se determinó al final de la fermentación por el método descrito por García-Tena: en un matraz bola de 50 mL se colocaron 11 mL de la muestra de sidra previamente se eliminó el dióxido de carbono presente mediante agitación mecánica y perlas de ebullición. Se recogieron los primeros 5.1 mL del destilado y enseguida los siguientes 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 dará el valor de la acidez volátil real según la fórmula:

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

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

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

3.5.2.7. Azúcares reductores totales

Se evaluó mediante el método de Fehling Causse Bonnans Primeramente se hizo una valoración del reactivo Fehling-Causse Bonnans (FCB). Para ello, en un matraz Erlenmeyer se colocaron 10 mL del reactivo FCB, 30 mL de agua

destilada y tres perlas de ebullición. Se calentó hasta ebullición y se comenzó a agregar desde la bureta una solución patrón de azúcar (1.25 g glucosa anhidra aforada a 250 mL con agua destilada) mediante un goteo controlada. Cuando la coloración azul del reactivo disminuyó de intensidad alcanzando un tono celeste verdoso, se agregaron 20 μL de azul de metileno y se continuó con el agregado de solución patrón lentamente. La primera gota que tornó a amarillo oro, indicó el punto final. Se realizó esta valoración por triplicado. Deben gastarse alrededor de 5 a 7 mL de la solución patrón para decolorar 10 mL de reactivo FCB.

A 50 mL de la sidra (eliminando el CO_2) se le adicionaron 8 mL de solución de acetato de plomo al 25 % y 0.5 g carbón activado, la cual se filtraron con papel Whatman no. 2. La finalidad de este paso fue obtener una sidra incolora para poder utilizarlo en la titulación.

Se llenó la bureta con la sidra incoloro y se titularon los 10 mL del reactivo FCB del mismo modo en que se procedió para la valoración.

Los cálculos se realizaron de acuerdo a la siguiente formula:

$$\begin{aligned} 100 \text{ mL azúcar} &\rightarrow 0.5 \text{ g dextrosa} \\ \text{mL gastados en la valoración} &\rightarrow X_1 (\text{Factor Fehling}) \\ \text{mL gastados en titular la sidra} &\rightarrow X_1 (\text{Factor Fehling}) \\ \text{mL gastados en la valoración} &\rightarrow X_2 * 10 = \text{g azúcar L}^{-1} \end{aligned}$$

3.5.2.8. Análisis de azúcares mediante HPLC

El contenido de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) y ácidos orgánicos (ácido málico y ácido acético) presentes en el mosto hasta la obtención de la sidra espumosa, se determinó mediante el análisis por HPLC de Lorenzini *et al.* (2019) con ligeras modificaciones, utilizando un equipo de HPLC SHIMADZU con dos detectores IR para la determinación de azucares, glicerol, etanol y UV para ácidos orgánicos. Las muestras que se analizaron para la variedad 'Golden Delicious' fueron, mosto sin inocular, a las 24 horas, al tercer, séptimo y noveno día de la primera fermentación (sidra base), luego de la adicción del licor de *tiraje* y embotellado, se tomaron muestras a los 8, 23 y 30 días (término de la segunda

fermentación), mientras que la variedad 'Red Delicious' de igual manera se tomaron desde el mosto, a las 24 horas, tercer, quinto y octavo día de la primera fermentación, posterior a ello, las muestras que se analizaron de la segunda fermentación fueron siguiendo el mismo muestreo de 'Golden Delicious', con la finalidad de tener un mejor seguimiento de los compuestos químicos. Antes del análisis, las muestras se filtraron a través de un filtro de membrana de acetato de celulosa de 0.45 μm (Pall corporation GN-6) y se desgasificaron mediante ultrasonido. La determinación de ácidos orgánicos y azúcares se llevó a cabo usando un sistema de cromatografía líquida a alta presión (Cromatógrafo de líquidos, Shimadzu, LC-2030C, Prominence i, Japón), equipado con una columna Aminex HPC-87H, un detector UV a 210 nm para ácidos orgánicos, un detector IR para azúcares, glicerol y etanol, un automuestreador ajustado en 20 μL de volumen de inyección y temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Se utilizó una solución 5mM de ácido sulfúrico, grado HPLC, Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, EEUU); a un flujo de 0.5 mL min^{-1} . Las muestras fueron filtradas con una membrana de 0,45 μm . La identificación de los ácidos orgánicos se realizó por medio de los tiempos de retención. La cuantificación se realizó mediante la curva estándar para cada ácido orgánico y azúcar. La separación del azúcar se realizó por elución isocrática utilizando como fase móvil de H_2SO_4 con un caudal de 0.5 ml min^{-1} . La fase móvil se filtró a través de un filtro de membrana de 0.45 μm y se desgasificó. La identificación de los compuestos se realizó sobre la base del tiempo de retención de los picos y sus espectros UV en comparación con las curvas de calibración de glucosa, fructosa y sacarosa.

3.5.2.9. Grado alcohólico

El porcentaje de alcohol etílico se determinó por el método de destilación directa. Una muestra de 50 mL de sidra, medida con un matraz aforado, se agitó para eliminar el dióxido de carbono y fue vertida en un matraz de destilación junto con 2.5 mL de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ con una concentración 2M, de la cual se destiló 3/4 partes (38 a 40 mL). La mezcla hidroalcohólica a 20 $^{\circ}\text{C}$ se aforó a 50 mL con agua destilada en el mismo matraz aforado y se evaluó la densidad con un picnómetro de 25 mL de acuerdo a la OIV (2017).

3.5.2.10. Determinación de nitrógeno total

Se pesan 100 mg de la muestra de sidra, las cuales se depositan en capsulas TIN LECO de 0.8 de diámetro y 20 mm de longitud. Posteriormente la determinación del porcentaje de nitrógeno total se realizó a través de una muestra de combustión en el analizador elemental LECO CHN628 no dispersivo, equipado con un detector infrarrojo. En este equipo, las muestras se queman en oxígeno con pureza (99.9999%) y flujo de 10 L por minuto (lpm) a una temperatura de 950 °C. Las muestras se disparan en una atmósfera de oxígeno con pureza (99.99 %) y flujo de 5 lpm a una temperatura de 1350 °C (Henrique *et al.*, 2019).

3.5.3. Evaluación sensorial

Se llevó a cabo una capacitación para evaluación sensorial dirigida a diez jueces, los cuales firmaron un formato de consentimiento (Anexo 7.1). Ésta se centró en la caracterización de sidras espumosas tomando como referencia Qin *et al.* (2018) con ligeras modificaciones (Anexo 7.2). La evaluación sensorial considera atributos relacionados con el aspecto visual, olfativo (aroma y olor) y gustativo, mediante una escala hedónica no estructurada (Yang *et al.*, 2018).

La evaluación sensorial fue llevada a cabo el laboratorio de análisis sensorial en el Centro académico de desarrollo e innovación de productos (CAIDEP) del parque Biotecnológico de la Universidad Autónoma de Querétaro. Dicha evaluación se fraccionó en dos secciones en el mismo día, donde en la sesión 1, se evaluaron las sidras espumosas elaboradas con la variedad 'Golden Delicious'; seguido de ello se dejó un descanso de aproximadamente 30 minutos para evaluar las sidras espumosas elaboradas con la variedad 'Red Delicious'.

Para ambos productos se tomó una botella de cada muestra y se les asignó un código número (Tabla 3.2). La botellas se abrieron en presencia de los panelistas y se vertieron aproximadamente 15 mL de la sidra en copas tipo coñac para que los panelistas pudieran apreciar la calidad visual, seguido del olor con la copa en reposo, aroma con la copa en agitación y finalmente, se evaluó gustativamente, evaluando un total de 28 atributos en las sidras espumosas (Anexo 7.3). La

evaluación de la sidra se realizó en un horario de 11:00 am de la mañana a 1:00 pm de la tarde.

Tabla 3.2. Formato de codificación de las muestras de sidra espumosa

Variedad	Levadura	Numeración aleatoria
'Golden Delicious'	K1-V11116	6224
	436.4	5683
	MM7	3831
	RY5	9265
'Red Delicious'	K1-V11116	3749
	436.4	6455
	MM7	5770
	RY5	5961

3.5.4. Determinación de los principales compuestos volátiles mediante cromatografía de gases

Las muestras de sidra espumosas utilizadas para el análisis de compuestos volátiles fueron elaboradas de acuerdo al apartado 3.4, con la excepción de fermentarse de manera independiente en tubos falcón de 50 mL de capacidad perfectamente sellados con cinta para evitar el escape de CO₂ con forme avanzaba la fermentación, posteriormente se almacenaron en un congelador a temperatura y luz controlada para evitar cualquier alteración del producto hasta su posterior utilización.

Previamente al análisis, las muestras a evaluar de sidra espumosa fueron sometidas a cuatro metodologías de extracción: a) extracción líquido-líquido en discontinuo con disolvente, b) extracción líquido-líquido en discontinuo con disolvente y sales, c) Microextracción por desmezcla, d) Extracción en fase sólida, esto con la finalidad de obtener la mejor separación de los componentes volátiles de acuerdo a lo reportado por Cedrón (2004).

Tras haber evaluado las diferentes metodologías, se seleccionó como la más eficiente la extracción liquido-líquido en discontinuo con disolvente (ELLd), la cual consistió en poner en un embudo de decantación 25 mL de sidra espumosa, la cual contiene los compuestos de interés, posteriormente se agregó 10 mL de diclorometano, con agitación manual de 5 min., la cual permitió separar la muestra en dos fases, una orgánica y otra acuosa (Figura 3.3), de ello se tomó

aproximadamente 1 mL de la fracción orgánica para ser inyectada en el cromatógrafo de gases.

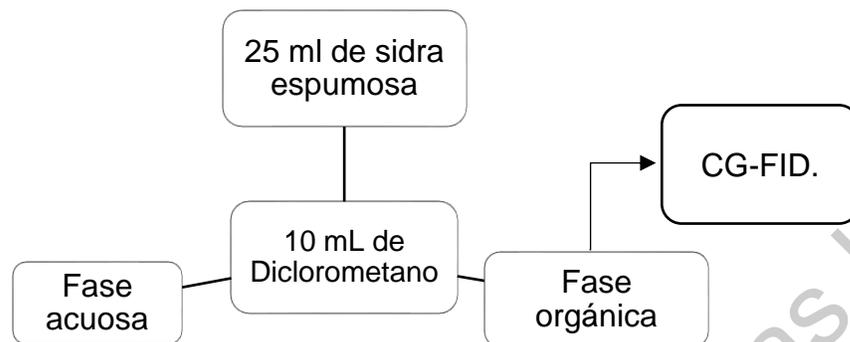


Figura 3.3. Esquema de trabajo en ELLd.

El análisis de los compuestos volátiles a evaluar fue de acuerdo a lo reportado por Suárez-Valles *et al.* (2005) y Cedrón (2004) con ligeras modificaciones. Los componentes volátiles fueron evaluados en ocho sidras espumosas (variedad 'Golden Delicious' y 'Red Delicious') mediante un cromatógrafo de gases de la Marca SHIMADZU 2010 plus. Las condiciones del equipo se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Condiciones del equipo de cromatografía

Variables	Condiciones
Temperatura del detector	220 °C
Columna	DBWAX-Agilent
Gas portador	Nitrógeno
Flujo de gas total	14 mL min ⁻¹
Dilución	10
Flujo de Columna	1 mL min ⁻¹

(Cedrón, 2004)

3.6. Diseño de los experimentos

Se empleó un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones, donde los tratamientos fueron las distintas cepas de levaduras y, las variables repuestas, fueron los atributos físicos, químicos, sensoriales y compuestos volátiles de la sidra. Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza de Fisher (ANDEVA) de una vía y se realizó una comparación de medias usando la prueba de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), mientras que para el análisis sensorial este se sometió a la prueba de Friedman ($p \leq 0.05$). Se utilizaron los programas estadístico Minitab 18 y R versión 3.4.1.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de las distintas levaduras en la primera fermentación

4.1.1. Características físicas y químicos del mosto

En la Tabla 4.1 se observa que la densidad, el contenido de sólidos solubles ($^{\circ}\text{Bx}$) y el pH obtenidos en el mosto de 'Red Delicious' (1.050 g cm^{-3} , 13.9 y 3.97, respectivamente), son superiores a los de 'Golden Delicious' (1.040 g cm^{-3} , 11.8 y 3.74, respectivamente). La elección varietal, la composición y la madurez de la fruta influyen en el contenido de azúcar en el mosto y por lo tanto influirán en el nivel final de etanol (Id *et al.*, 2017), por ejemplo, se ha observado que el nivel promedio de sólidos solubles en jugos de manzana de 86 cultivares es de $11.4 \text{ }^{\circ}\text{Bx}$, que va de 8.1 a $14.2 \text{ }^{\circ}\text{Bx}$, además, los jugos de fines de temporada (senescentes) se caracterizan por valores más altos de sólido soluble y contenido de azúcar, lo que está relacionado con un perfil más dulce, por lo tanto tendrá una influencia sobre el proceso fermentativo (Iaccarino *et al.* 2019). Tradicionalmente las sidras se han elaborado con variedades de manzanas específicas (sidreras), pero éstas tienden a ser limitadas en ciertos países o regiones, por lo que actualmente está creciendo el uso de manzana de mesa en la elaboración de sidras (Girschik *et al.*, 2017).

Tabla 4.1. Densidad, Acidez total titulable (ATT), pH y sólidos solubles ($^{\circ}\text{Bx}$) de los mostos de manzana para la elaboración de sidra tranquila

Variable	'Golden Delicious'	'Red Delicious'
Densidad (g cm^{-3})	$1.04 \pm 0.00^*$	$1.05 \pm 0.00^*$
Acidez total titulable (g L^{-1} de ácido málico)	$4.45 \pm 0.06^*$	$4.45 \pm 0.07^*$
pH	3.74	3.97
Sólidos solubles ($^{\circ}\text{Brix}$)	$11.8 \pm 0.30^*$ (96.9 g L^{-1} de azúcar)	$13.93 \pm 0.11^*$ (124 g L^{-1} de azúcar)

*Medias provenientes de tres repeticiones \pm desviación estándar.

4.1.2. Evolución de la densidad durante la fermentación para la elaboración de sidra tranquila en dos cultivares de manzana

En la Figura 4.1 se observa que, como es esperado, la densidad de los mostos disminuye a través del tiempo. La fermentación llevada a cabo por todas las levaduras inoculadas es más rápida en 'Golden Delicious' que en 'Red Delicious'. Dentro de cada variedad de manzana las levaduras tienen un comportamiento similar, asimismo, la fermentación producida por la microbiota nativa resultó más lenta que con las levaduras inoculadas, siendo esto más notorio en 'Golden Delicious'. Lo anterior se debe a que en las fermentaciones realizadas por levaduras seleccionadas se tienen concentraciones iniciales elevadas del inóculo, además de que éstas son más competitivas, lo que les permite dominar el medio fermentativo. En contraste, en las fermentaciones espontáneas participa una gran diversidad de microorganismos, incluyendo levaduras oxidativas y fermentativas, homo y heterofermentativas, bacterias ácido lácticas y bacterias acéticas, lo que puede conducir a una atípica fermentación y una calidad organoléptica compleja (Suárez-Valles *et al.*, 2005).

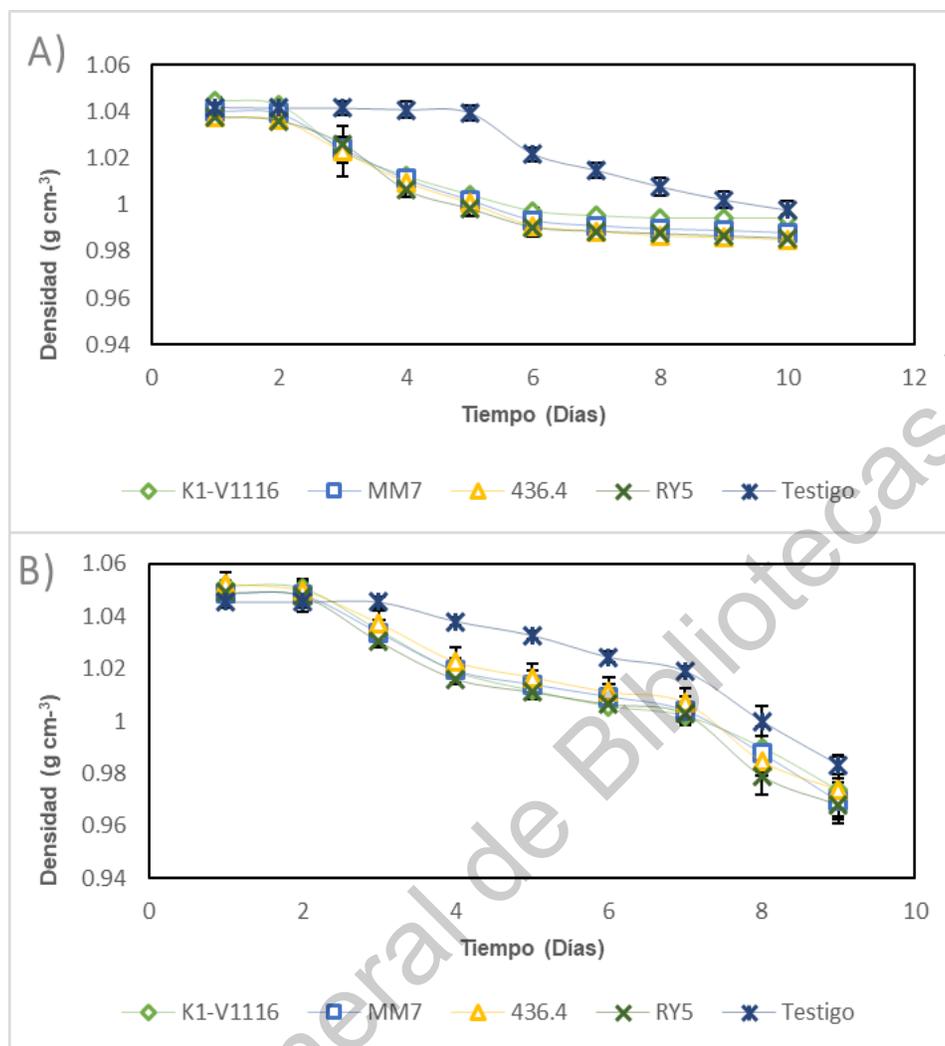


Figura 4.1. Evolución de la densidad de los mostos de dos cultivares de manzana en función de la cepa de levadura (A) 'Golden Delicious'; (B) 'Red Delicious'

En la Tabla 4.2 se observa que, tanto la cepa comercial de referencia K1-V1116, como las nativas seleccionadas, muestran presencia de gas carbónico en ambas variedades 48 horas después de iniciada la fermentación, en contraste con la microbiota nativa, lo que indica una buena competitividad de las cepas seleccionadas (Estela-Escalante *et al.*, 2011). Tanto su velocidad y eficiencia fermentativa se ven influenciadas por factores, como el contenido de azúcar, la temperatura, el tiempo de almacenamiento y el pH (Venkatachalam *et al.*, 2018). Por ende, muchas bodegas vinícolas han preferido el uso de cepas seleccionadas autóctonas, como una estrategia enológica para obtener beneficios como la

autenticidad y tipicidad propias de las fermentaciones realizadas por cepas nativas de *S. cerevisiae*. Siendo mejor adaptadas a las prácticas enológicas, las prácticas agrícolas y el medio ambiente de la región productora del vino, persistiendo fácilmente y predominando sobre otras cepas de levadura de la microbiota natural, contribuyendo a las propiedades sensoriales típicas locales (de Celis *et al.*, 2019).

Tabla 4.2. Energía fermentativa (EF) acumulada de los mostos de manzana de dos cultivares en función de la cepa de levadura

Levadura	'Golden Delicious'				'Red Delicious'			
	(g CO ₂ 48 h ⁻¹)	(g CO ₂ 96 h ⁻¹)	(g CO ₂ 144 h ⁻¹)	(g CO ₂ 192 h ⁻¹)	(g CO ₂ 48 h ⁻¹)	(g CO ₂ 96 h ⁻¹)	(g CO ₂ 144 h ⁻¹)	(g CO ₂ 192 h ⁻¹)
K1-V1116	10.83±2.3 ^a	20.17±0.3 ^a	24.67±0.3 ^a	39.67±0.3 ^a	8.50±0.5 ^a	20.67±0.7 ^a	25.50±0.5 ^a	39.67±6.3 ^a
MM7	7.33±0.3 ^{a*}	18.33±0.6 ^a	24.33±0.8 ^a	39.66±0.6 ^a	7.50±0.5 ^a	17.33±0.3 ^a	21.00±3.0 ^a	39.67±1.4 ^a
436.4	8.00±0.5 ^a	19.00±0.5 ^a	24.50±0.5 ^a	39.30±0.5 ^a	7.50±0.5 ^a	17.83±0.8 ^a	22.67±0.8 ^a	39.30±0.7 ^a
RY5	6.98±3.5 ^a	19.66±0.3 ^a	24.50±0.5 ^a	40.50±0.5 ^a	9.33±0.3 ^a	19.00±0.0 ^a	23.17±0.6 ^a	40.50±1.8 ^a
Testigo	0.17±0.3 ^b	1.17±0.3 ^b	13.50±1.5 ^b	19.83±1.5 ^b	0.00±0.0 ^b	6.33±0.0 ^b	13.17±0.6 ^b	31.00±1.8 ^b

*Medias provenientes de tres repeticiones ± desviación estándar. Valores con la misma letra dentro de columnas, son estadísticamente iguales (Tukey, P≤0.05).

4.1.4. Características físicas y químicas de la sidra tranquila

En la Tabla 4.3 se puede observar que las sidras de los dos cultivares elaboradas con las distintas cepas mostraron valores de azúcares residuales ≤ 10 g L⁻¹, lo que corresponde a sidras secas. Sin embargo, en 'Red Delicious' el contenido de azúcar de la sidra obtenida con la microbiota nativa es superior al del resto de los tratamientos después de 10 días de fermentación, lo cual podría deberse a un paro de la fermentación alcohólica (Id *et al.*, 2017) probablemente influenciado por la composición y concentración de nutrientes o la disponibilidad de nitrógeno (Kemp *et al.*, 2014), además este proceso de fermentación se caracteriza por los bajos rendimientos de etanol y una eficiencia de fermentación de alrededor

del 30 al 40 %, así como por concentraciones variables de azúcares residuales (Nuñez-Guerrero *et al.*, 2016). Durante la fermentación del jugo de manzana, la tasa y el contenido de etanol, azúcares, taninos, ésteres, metanol y ácidos volátiles son algunas de las características de calidad que pueden verse afectadas por la cepa específica de levadura (Kanwar & Keshani, 2016), es por ello que la elección de la cepa debe estar sujeta a través de varios factores que permitan hacer la selección adecuada en base a las necesidades del productor.

Tabla 4.3. Azúcares residuales (AR), grado alcohólico (GA) y acidez total titulable (ATT) de sidras tranquilas elaboradas con cuatro cepas de levadura en dos cultivares de manzana

Variedad	'Golden Delicious'			'Red Delicious'		
	AR* (g azúcar L ⁻¹)	GA (°GL)	ATT (g ácido málico L ⁻¹)	AR (g azúcar L ⁻¹)	GA (°GL)	ATT (g ácido málico L ⁻¹)
K1-V1116	1.36±0.1 ^a	7.6±0.9 ^a	4.45±0.1 ^a	1.41±0.1 ^d	5.80±2.9 ^a	3.50±0.3 ^a
MM7	1.39±0.0 ^a	7.6±0.0 ^a	4.49±0.2 ^a	2.34±0.3 ^c	7.43±1.8 ^a	3.66±0.1 ^a
436.4	1.21±0.1 ^a	6.5±1.3 ^a	4.05±0.1 ^a	2.50±0.2 ^c	8.51±0.8 ^a	3.50±0.1 ^a
RY5	1.13±0.1 ^a	7.0±0.6 ^a	4.25±0.3 ^a	3.22±0.4 ^b	8.66±1.6 ^a	3.66±0.2 ^a
Testigo	1.39±0.2 ^a	7.6±0.2 ^a	4.29±0.4 ^a	7.07±0.3 ^a	6.50±0.5 ^a	3.86±0.1 ^{a+}

*(AR) Azúcares residuales; (GA) grado alcohólico; (ATT) acidez total titulable y (AV) acidez volátil. Medias provenientes de tres repeticiones ± desviación estándar. Valores con la misma letra dentro de columnas, son estadísticamente iguales (Tukey, P≤0.05).

En cuanto al contenido de alcohol, no se presentaron diferencias entre cepas en ninguno de los cultivares (P≤0.05), obteniéndose para 'Red Delicious' valores que van de 5.8 °GL con K1-V1116 hasta 8.7 °GL con RY5 y para 'Golden Delicious' de 6.5 °GL con 436.4 hasta 7.6 °GL con K1-V1116, lo que muestra que las cepas nativas seleccionadas pueden considerarse aptas para llevar a cabo una

fermentación alcohólica completa. Tomando en cuenta los datos anteriores, se advierte que el rendimiento para K1-V1116 de 21.76 g AZ °Et⁻¹, el cual contrasta con lo que señala la ficha técnica de la cepa comercial (16 a 17 g de azúcar por cada 1 °GL producido) (Lallemand, 2019), mientras que para RY5 el rendimiento fue de 14.51 g AZ °Et⁻¹ siendo superior al del resto de la cepas para 'Red Delicious'. Mientras que para la 'Golden Delicious', la cepa 436.4 obtuvo un rendimiento de 14.91 g AZ °Et⁻¹ y K1-V1116 de 12.75 g AZ °Et⁻¹, obteniendo así un contenido mayor de alcohol, demostrando así una elevada conversión de azúcares.

Por lo que respecta a la ATT se detectó una concentración similar para todas las sidras, en donde 'Golden Delicious' obtuvo valores que van de 4.0 a 4.5 g ácido málico L⁻¹ y que corresponden sensiblemente al valor obtenido en el mosto inicial. En el caso de 'Red Delicious' la ATT va de 3.5 a 3.9 g ácido málico L⁻¹, siendo éstos menores a los obtenidos en el mosto inicial (Tabla 4.1), esto podría deberse a que después de la fermentación alcohólica suele ocurrir un proceso de maduración (fermentación maloláctica) en el que las bacterias ácido lácticas (LAB) convierten el ácido málico en ácido láctico y dióxido de carbono (Id *et al.*, 2017). La ATT obtenida en todos los casos se encuentra dentro de los límites que establece la NOM-199-SCFI-2017 (3.5 y 7.5 g L⁻¹ ácido málico) (SEGOB, 2017).

Por otra parte, en la Tabla 4.4 se advierte una mayor AV con la microbiota nativa en ambos cultivares (0.40 y 0.57 g ácido acético L⁻¹ para 'Golden Delicious' y 'Red Delicious', respectivamente), lo cual resulta lógico si consideramos que en el medio fermentativo no hubo una levadura predominante que limitara el desarrollo de microorganismos productores de ácido acético (Suárez-Valles *et al.*, 2005). Entre los tratamientos con levaduras inoculadas, la mayor AV fue obtenida con K1-V1116, tanto en 'Red Delicious' (0.21 g ácido acético L⁻¹) como en 'Golden Delicious' (0.12 g ácido acético L⁻¹) ($P \leq 0.05$), de acuerdo a lo que se establece en la NOM-199-SCFI-2017 (<1.2 g ácido acético L⁻¹), todas las sidras entraron dentro de lo establecido como bebida de calidad en cuanto acidez volátil. Debido que a niveles altos es considerado un factor de calidad negativa. Sin embargo, su presencia del ácido acético también es importante, gracias a que sirve como precursor de los

ésteres de acetato, que son responsables del carácter afrutado de muchos vinos (Luo *et al.*, 2013).

Tabla 4.4. Acidez volátil (AV) y SO₂ total de la sidra tranquila de los mostos de manzana de dos cultivares en función de la cepa de levadura

Variedad	'Golden Delicious'		'Red Delicious'	
	AV* (g ácido acético L ⁻¹)	SO ₂ total (mg L ⁻¹)	AV (g ácido acético L ⁻¹)	SO ₂ total (mg L ⁻¹)
K1-V1116	0.12±0.0 ^b	66.13±4.9 ^b	0.21±0.0 ^b	102.40±14.7 ^a
MM7	0.07±0.0 ^c	87.47±3.7 ^a	0.07±0.0 ^c	74.67±2.4 ^b
436.4	0.07±0.0 ^c	83.20±14.0 ^a	0.07±0.0 ^c	54.40±6.4 ^b
RY5	0.08±0.0 ^c	67.20±3.2 ^b	0.08±0.0 ^c	59.73±3.4 ^b
Testigo	0.48±0.0 ^a	57.60±5.5 ^b	0.57±0.0 ^a	55.46±6.7 ^b

*(AV): acidez volátil; (SO₂): anhídrido sulfuroso.

Medias provenientes de tres repeticiones ± desviación estándar. Valores con la misma letra dentro de columnas, son estadísticamente iguales (Tukey, P≤0.05).

En cuanto al SO₂ total, se observan los valores de entre 87.47 (MM7) y 66.13 (K1-V1116) mg L⁻¹ de anhídrido sulfuroso total para 'Golden Delicious', mientras que para la 'Red Delicious' los valores van desde 102.40 (K1-V1116) y 54.40 (436.4) mg L⁻¹ de anhídrido sulfuroso total, este resultado se sabe que procede tanto de la forma combinada como su forma activa que juntos conformaran al SO₂ total, dependiendo directamente del pH (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). De acuerdo a lo que establece la NOM-199-SCFI-2017 de 300 mg L⁻¹ de anhídrido sulfuroso total, todas las sidras estuvieron dentro de lo establecido por la norma (SEGOB, 2017). Adicionalmente, las levaduras también influirán en el contenido ya que suelen tener mecanismos para soportar la presencia de SO₂ los cuales implican reducción de azufre o sobreproducción de acetaldehído (Balakrishnan *et al.*, 2012).

El anhídrido sulfuroso (SO₂) es usa en la industria vinícola debido a sus características antisépticas, inhibiendo el desarrollo de bacterias y levaduras apiculadas, además de ser antioxidante. La acción del sulfitado se verá influenciada por el pH, por su naturaleza y concentración, capaz de interactuar con el sulfuroso,

formando lo que se le denominado el sufuroso combinado; este aumento combinado generalmente oscila entre 10 y 50 mg L⁻¹ en los mostos (Blouin *et al.*, 2003; Herrero *et al.*, 2010) .

Con base en los resultados anteriores se decidió utilizar la cepa 346.4 para la elaboración de la sidra base en la evaluación de levaduras en la segunda fermentación.

4.2. Evaluación de las distintas levaduras en la segunda fermentación

4.2.1. Características físicas y químicas de los mostos utilizados

En la Tabla 4.5 se observa que la densidad, sólido solubles (°Bx) y el pH fueron mayores para 'Red Delicious' (1.064 g cm⁻³, 14.1 y 4.85, respectivamente) que para 'Golden Delicious' (1.058 g cm⁻³, 12.5 y 4.72, respectivamente). Sin embargo, los valores de ATT fueron menores a los obtenidos en el experimento anterior para las dos variedades (Tabla 4.1), éstas diferencias pueden estar influenciadas por un error en la medición del equipo para la obtención del pH aunado a la falta de homogenización del NaOH con el mosto y al error del analista al no haberse percatado. Las diferencias obtenidas en los mostos de los dos experimentos podrían deberse a que se trata de lotes diferentes obtenidos a distintos tiempos: en el caso de este último, los valores corresponden al de manzanas con un mayor grado de madurez (más azúcares, menos acidez), un proceso de desarrollo irreversible que involucra atributos bioquímicos y fisiológicos. Ya que jugos producidos a partir de cultivares tardíos, aportando un alto contenido de azúcares, mientras que las manzanas de temporada temprana son jugos con baja concentración de azúcares (Venkatachalam *et al.*, 2018).

Tabla 4.5. Densidad, Acidez total titulable (ATT), pH y sólido solubles (°Bx) de los mostos de manzana para la elaboración de sidra espumosa

Variab les	‘Golden Delicious’	‘Red Delicious’
Densidad (g cm ⁻³)	1.058	1.064
Acidez total titulable (g L ⁻¹ de ácido málico)	2.98±0.1*	2.03±0.1*
pH	4.72	4.85
Sólido solubles (°Brix)	12.5±0.06*	14.1±0.10*
	(109.0 g L ⁻¹ de azúcar)	(126.2 g L ⁻¹ de azúcar)

*Medias provenientes de tres repeticiones ± desviación estándar.

4.2.2. Evaluación de la sidra de base

4.2.2.1. Evolución de la densidad durante la fermentación en dos cultivares de manzana

En la Figura 4.2 se observa que la fermentación llevada a cabo por la cepa 436.4, medida por la densidad de los mostos, disminuye como esperado a través del tiempo, habiendo comportamientos muy similares para ambas variedades. El comportamiento de esta levadura durante la fermentación es comparable al que se obtuvo en el experimento anterior (Figura 4.1), con un tiempo de diez días de fermentación aproximadamente, un grado alcohólico fluctuante entre 6.5 a 8.5 °GL (‘Golden Delicious’ 7.5 y ‘Red Delicious’ 7.8 °GL), azúcares residuales correspondientes a fermentaciones completas y baja acidez volátil. Se sabe que *S. cerevisiae* domina la fermentación alcohólica. Debido a su sobresaliente comportamiento fermentativo y la estabilidad continua de la fermentación, es por ello, que se ha elegido tradicionalmente para realizar cultivos iniciadores para sidras y vinos (Su *et al.*, 2019).

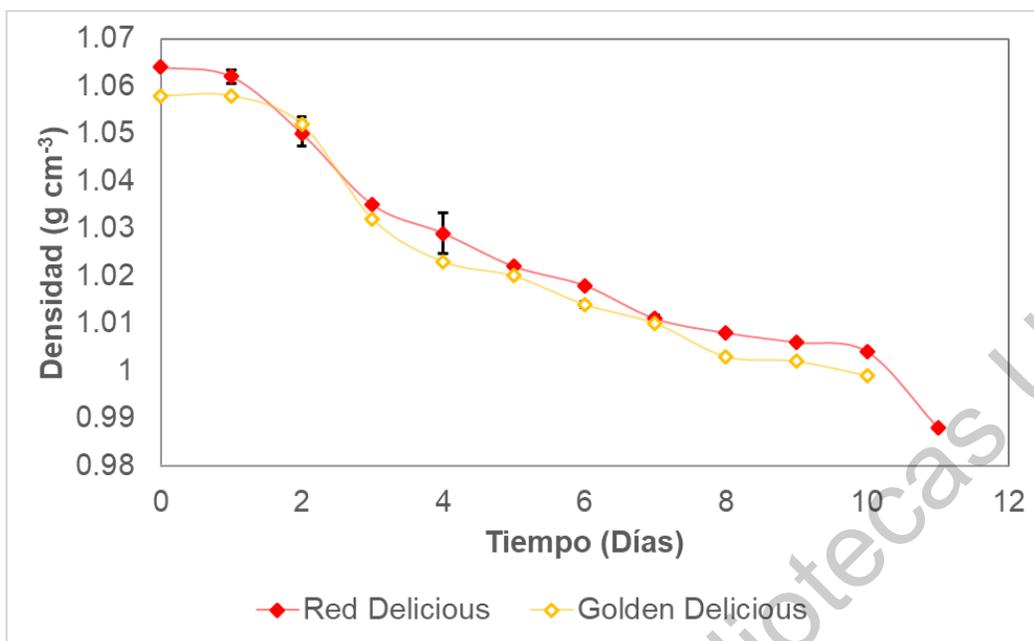


Figura 4.2. Evolución de la densidad de mostos de manzana de dos cultivares con la cepa 436.4 (roja) ‘Red Delicious’; (amarilla) ‘Golden Delicious’

4.2.2.2. Características físicas y químicas de las sidras bases

En el Tabla 4.6 se puede observar que las sidras tranquilas de los dos cultivares elaboradas con la cepa 436.4 obtuvieron valores de azúcares residuales $\leq 10 \text{ g L}^{-1}$, que corresponden a sidras secas y a fermentaciones alcohólicas completas. En cuanto al contenido de alcohol, ‘Red Delicious’ presentó un valor de $7.86 \text{ }^\circ\text{GL}$ con un rendimiento de $16.06 \text{ gAz } ^\circ\text{Et}^{-1}$, lo que corresponde sensiblemente al grado alcohólico que se puede obtener con la cepa comercial K1-V1116, mientras que con ‘Golden Delicious’ ($7.50 \text{ }^\circ\text{GL}$), el rendimiento de conversión fue de $14.53 \text{ gAz } ^\circ\text{Et}^{-1}$, siendo ligeramente mayor a lo esperado de alcohol $6.81 \text{ }^\circ\text{GL}$ si se compara con el rendimiento de la cepa comercial (16 a 17 g de azúcar para producir $1 \text{ }^\circ\text{GL}$). Estas diferencias en la producción de alcohol, no es sólo la dependencia única del nivel de azúcar presente en el jugo y sí no también que pueden existir otras variables, como por ejemplo la vitalidad celular de la levadura, que juegan un papel determinante en la optimización de los procesos de fermentación (Guevara *et al.*, 2012). Sí bien el contenido de alcohol en la sidra depende del nivel de azúcar del jugo de fruta, este puede variar del 1 al 12 % en alcohol (Johansen *et al.*, 2019).

De acuerdo a la bibliografía, para alcanzar 1 % de alcohol en el vino se necesita 17 g L⁻¹ de azúcar en condiciones normales de producción, pero si la temperatura es menor esta puede ser de 16 g L⁻¹ de azúcar para producir 1 % de alcohol (Kemp *et al.*, 2015).

Tabla 4.6. Contenido de azúcares, grado alcohólico, acidez total titulable (ATT), acidez volátil (AV) y anhídrido sulfuroso total de sidras de base elaboradas con la cepa 436.4 en dos cultivares de manzana

Variable	'Golden Delicious'	'Red Delicious'
Azúcares residuales (g azúcar L ⁻¹)	0.65±0.00	1.38±0.03
Densidad (g cm ⁻³)	0.99±0.00	0.99±0.00
Etanol °GL	7.50±0.32	7.86±0.83
Acidez total titulable (g L ⁻¹ de ácido málico)	6.67±0.62	5.86±0.14
pH	3.87±0.07	3.85±0.00
Acidez Volátil (g ácido acético L ⁻¹)	0.15±0.00	0.11±0.00
Anhídrido sulfuroso total (mg SO ₂ L ⁻¹)	81.66±6.78	49.60±2.26

Medias provenientes de tres repeticiones ± desviación estándar.

En cuanto a la ATT, 'Golden Delicious' obtuvo un valor de 6.67 g ácido málico L⁻¹ y en el caso de 'Red Delicious' la ATT fue de 5.86 g ácido málico L⁻¹, siendo en ambos casos los valores obtenidos superiores a los del mosto inicial (Tabla 4.1), sin embargo cabe aclarar que los valores generados en el mosto inicial no son los esperados al ser bajos, como ya se mencionó esto pudo haberse causado a una mala medición por el equipo y la falta de homogenización del NaOH al momento de la medición. Generalmente, la ATT se relaciona con la capacidad de amortiguación

que mantiene el pH durante la fermentación, modificando así ácido o álcali en la sidra y cuando esta ATT es baja en comparación con el mosto, es posible debido a su consumo para mantener el pH (Venkatachalam *et al.*, 2018). La ATT obtenida en ambos casos se encuentra dentro de los límites que establece la NOM-199-SCFI-2017 (SEGOB, 2017).

Con lo que respecta a SO₂ total, ampliamente usado en diferentes etapas de la vinificación y el almacenamiento por sus propiedades antisépticas y para prevenir la oxidación de los fenólicos, que afecta negativamente las propiedades sensoriales y el valor nutricional del producto (Nardini & Garaguso, 2018), el valor obtenido para 'Golden Delicious' fue de 81.66 mg L⁻¹, mientras que en 'Red Delicious' fue de 49.60 mg L⁻¹, cabe resaltar que la concentración que se obtienen en esta última variedad puede estar influenciada por la composición del mosto donde el SO₂ tiene que intervenir de manera importante contra la oxidación de los componentes presentes e inactivación de enzimas (Oliveira *et al.*, 2011) y la presencia de una posible mayor actividad microbiana; sin embargo, ambos valores se encuentra por debajo de los límites que marca NOM-199-SCFI-2017 de 300 mg L⁻¹ de anhídrido sulfuroso total (SEGOB, 2017). Es de importancia que este compuesto no sobrepase los límites legales establecidos, debido al riesgo para la salud humana que este pueda provocar. Para el caso de los vinos tintos y blanco no puede exceder 150 y 200 mg L⁻¹, respectivamente, siendo suficientes para inhibir la microbiota nativa (Guerrero & Cantos-Villar, 2015).

Finalmente, la AV para 'Golden Delicious' fue de 0.15 g ácido acético L⁻¹ y para 'Red Delicious' de 0.11 g ácido acético L⁻¹, respectivamente. Si comparamos los resultados con el lote anterior usado para la producción de sidra tranquila (0.07 g ácido acético L⁻¹) (Tabla 4.4), podemos constatar que éste fue ligeramente superior. Hay que recordar que *Saccharomyces* puede producir ácido acético, lo que explica la presencia de este compuesto en las sidras bases, pero también, valores superiores de ácido acético a menudo indican la presencia de otras especies, como bacterias acéticas (Dzialo *et al.*, 2017). La NOM-199-SCFI-2017 establece un límite legal de 1.2 g ácido acético L⁻¹.

4.2.3. Evaluación de la calidad química y física de la sidra espumosa

4.2.3.1. Evolución de la presión de la botella

La toma de espuma se llevó a cabo en aproximadamente un mes. La velocidad de este proceso depende generalmente de la cepa de levadura y de la temperatura ambiente donde se almacenan las botellas para dicha etapa (Buxaderas & López-Tamames, 2012). En la Figura 4.3 se observa que la presión en la botella obtenida por las distintas cepas de levadura se incrementa conforme transcurre el tiempo, pero ésta es mayor en 'Red Delicious' (valores de 3.1 atm para MM7, hasta 4.0 atm para RY5) que en 'Golden Delicious' (de 2.6 atm en 436.4 hasta 3.1 atm en K1-V1116) después de 30 días. En cada una de las variedades las distintas cepas de levaduras muestran comportamientos similares. Cabe recordar que en la segunda fermentación se añade licor de *tirage*, el cual consiste de una concentración conocida de azúcar y un inóculo de levadura (*Saccharomyces*), con la finalidad alcanzar una presión de gas carbónico en botella de entre 5 y 6 atm. León (2019) probó que 30 g L⁻¹ de azúcar y una concentración de 10⁸ UFC mL⁻¹ de cada cepa durante seis semanas, podía generar para MM7 (3.72 atm) más de 3 atm de presión, seguida de K1-V1116 (3.63 atm) y RY5 (3.61 atm), como las más altas, en el caso de este experimento se usó una concentración de azúcar de 25 g L⁻¹ y una concentración de cada cepa 10⁶ UFC mL⁻¹ ya en el mosto de manzana de cada variedad.

Para el caso de nuestro experimento la cepa 436.4 obtuvo la presión más baja, esto puede deberse a factores tales como la fuga de CO₂ de la botella en el proceso de la segunda fermentación, el segundo aspecto a considerar es que la adicción de azúcar y la medición de la presión interna de la botella fue realizada de forma manual, lo que puede provocar un error experimental por parte del analista, sin embargo, se ha observado que los compuestos fenólicos, tienden a suprimir el metabolismo de la levadura durante la segunda fermentación, lo que puede influenciar en las características de la bebidas espumosas, así como una baja temperatura provocando una mayor solubilidad del gas (Kemp *et al.*, 2014). En la industria vinícola generalmente se utilizan 22 a 24 g L⁻¹ de azúcar en el licor de tiraje, aunque en bodegas comerciales puede ser de 22 a 23 g L⁻¹ para evitar un

exceso de presión y generar una transferencia de CO₂ desde el interior de la botella hacia el exterior de 0.12 a 0.68 mL por día. Esto es importante, debida a que el CO₂ es responsable de la carbonatación natural de las bebidas fermentadas y la producción adecuada de gas, siendo posiblemente el criterio de aceptación más importante para seleccionar la levadura en una segunda fermentación (Dzialo *et al.*, 2017).

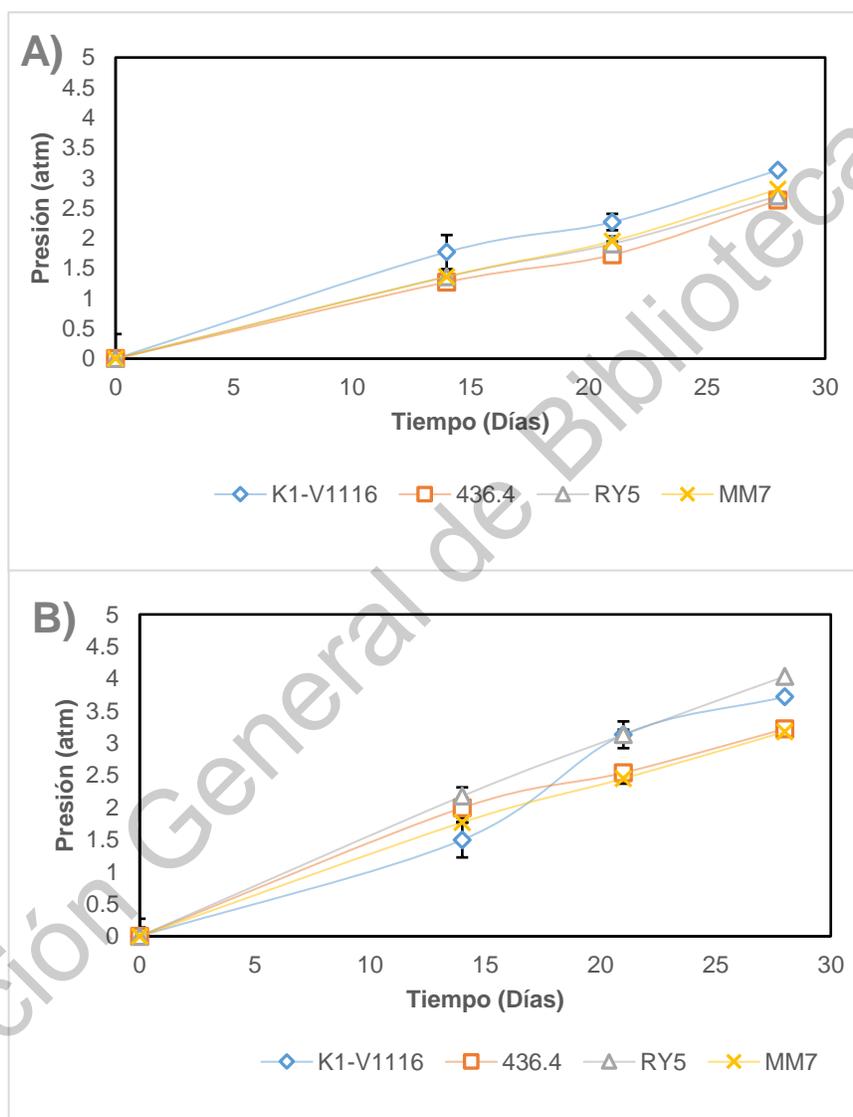


Figura 4.3. Evolución de la presión en la botella de sidras espumosas de manzana de dos cultivares en función de la cepa de levadura (A) 'Golden Delicious'; (B) 'Red Delicious'

4.2.3.2. Características físicas y químicas de la sidra espumosa

En la Tabla 4.7 se observa que la concentración de azúcares residuales se encontró en todos los tratamientos dentro de lo establecido por la NOM-199-SCFI-2017 para sidra gasificada (10 g L^{-1} de azúcar), clasificándose en la categoría de sidras secas ($<10 \text{ g L}^{-1}$). En el caso de 'Golden Delicious' la menor concentración se obtuvo en la sidra inoculada con la cepa de referencia K1-V1116 (2.68 g L^{-1}) contrastando con la sidra elaborada con la cepa 436.4 (7.41 g L^{-1}) donde ciertamente hubo una menor degradación de los azúcares agregados para la segunda fermentación. Un comportamiento similar fue observado por Soto-Herrera *et al.* (2008) al usar 20 g L^{-1} de azúcar, teniendo hasta 6.68 g L^{-1} de azúcares residuales con la levadura K1-V1116, por efecto probable de la baja capacidad de fermentación de la levadura. Mientras que en 'Red Delicious', nuevamente destacó la sidra elaborada con la cepa K1-V1116 con 2.92 g L^{-1} de azúcares residuales, contrastando con la de la cepa MM7 (5.97 g L^{-1}). Sin embargo el uso de cepas aisladas de *S. cerevisiae* es una estrategia interesante para mantener la calidad y la reproducibilidad de las bebidas fermentadas, asegurando las propiedades sensoriales y el mantenimiento típico de los productos fermentados producidos en la región (Suárez-Valles *et al.*, 2008).

Tabla 4.7. Contenido de azúcares (AR), grado alcohólico (GA) y acidez total titulable (ATT) de sidras espumosas elaboradas con distintas cepas en dos cultivares de manzana

Levadura	'Golden Delicious'			'Red Delicious'		
	AR (g azúcar L ⁻¹)	GA (°GL)	ATT (g ácido málico L ⁻¹)	AR (g azúcar L ⁻¹)	GA (°GL)	ATT (g ácido málico L ⁻¹)
K1-V1116	2.68±0.2 ^{b*}	9.83±1.1 ^a	5.34±0.1 ^b	2.92±0.4 ^b	10.59±1.0 ^a	4.38±0.3 ^a
MM7	7.21±0.7 ^a	9.42±1.3 ^a	5.99±0.0 ^a	5.97±0.6 ^a	10.93±2.2 ^a	4.91±0.3 ^a
436.4	7.41±1.1 ^a	9.85±2.8 ^a	5.70±0.2 ^b	5.10±0.4 ^a	10.50±1.8 ^a	4.53±0.3 ^a
RY5	6.68±0.6 ^a	10.50±1.4 ^a	5.92±0.1 ^{ab}	3.03±0.1 ^b	11.13±0.9 ^a	5.00±0.5 ^a

Medias provenientes de tres repeticiones ± desviación estándar.

*Valores con la misma letra dentro de columnas, son estadísticamente iguales (Tukey, P≤0.05)

En lo que respecta al grado alcohólico, se presenta un incremento en los tratamientos de al menos 2 °GL aproximadamente con respecto a la sidra de base. Suárez-Valles *et al.* (2008) reportan que sidras base contenían 6.3 % (vv⁻¹), tras ser sometidas a una segunda fermentación (14 días) alcanzaron de 7.4 a 7.5 % (vv⁻¹). Al haber agregado tan sólo 25 g L⁻¹ de azúcar en el licor de *tirage*, se esperaba un aumento no mayor a 1.5 °GL (considerando que por cada 16 a 17 g de azúcar genera 1 °GL). Esto pudo deberse a un homegenizado desproporcionado de azúcar al ser de manera manual que influyó probablemente en la concentración de azúcar en la botella. Considerando que se agregaron 25 g L⁻¹ de azúcar, los grados alcohólicos no coinciden con el grado alcohólico potencial y lo reportado por León-Teutli (2019) en que dichas cepas alcanzaron como máximo los 8.89 °GL. De acuerdo a lo que establece la norma para sidras espumosas (NOM-199-SCFI-2017) estas deberán tener valores entre 3 y 6 % de alcohol, por lo que nuestro estudio sobrepasa los límites máximos, por efecto de la adición de azúcares a la sidra tranquila, lo cual es positivo si lo que se busca es un grado alcohólico alto en este tipo de bebidas.

De manera general, tanto en 'Golden Delicious' como en 'Red Delicious', RY5 mostró la mayor producción de alcohol (10.50 y 11.13 °GL, respectivamente) con un rendimiento de 12.76 gAz °Et⁻¹ y 13.57 gAz °Et⁻¹, probablemente a que esta cepa es capaz de hidrolizar mejor la sacarosa (Figura 4.4), siendo estadísticamente igual entre los tratamientos.

Con respecto a la ATT, en 'Golden Delicious' se obtuvieron 5.99 g L⁻¹ ácido málico en MM7 y de 5.34 g L⁻¹ ácido málico en K1-V1116; mientras que en 'Red Delicious' el máximo valor fue de 5.00 g L⁻¹ ácido málico en RY5, sin diferencias con las otras levaduras. En general, los valores de ATT obtenidos en la sidra espumosa son inferiores a los de la sidra base, lo cual podría explicarse por la conversión del ácido málico en ácido láctico (fermentación maloláctica) realizada espontáneamente por bacterias lácticas, lo que disminuye la acidez/pungencia y además contribuye positivamente a la estabilidad de la sidra (Picinelli *et al.*, 2000). Recordemos que la primera fermentación se llevó a cabo para la sidra base con la cepa 436.4 mientras que en la segunda se utilizaron diferentes cepas (436.4, RY5, MM7 y K1-V1116).

En cuanto a la acidez volátil (Tabla 4.8), se observa que las sidras espumosas tuvieron un ligero aumento en relación a las sidras tranquilas producidas por todas las cepas; cabe señalar que la formación de ácido acético puede ocurrir en todas las etapas de producción de la sidra como resultado de la metabolización de diferentes sustratos (Picinelli *et al.*, 2000). En el caso de 'Golden Delicious' K1-V1116 obtuvo los mayores valores (0.31 g ácido acético L⁻¹), contrastando con 436.4 (0.13 g ácido acético L⁻¹), partiendo de una sidra base con una acidez volátil de 0.15 g ácido acético L⁻¹. Los valores obtenidos pueden considerarse normales, ya que se sabe que las levaduras fermentativas son capaces de producir trazas de ácido acético (Dzialo *et al.*, 2017). Valores mayores estarían indicando la presencia de microorganismos productores de dicho compuesto, tales como bacterias acéticas o levaduras del género *Candida* (Id *et al.*, 2017). Cabe recordar que este compuesto es considerado como un factor indeseable en la calidad del producto. Por ejemplo, en el vino, 0.2 a 0.4 g ácido acético L⁻¹ es aceptable, pero por encima de 1.2 a 1.3 g ácido acético L⁻¹, se considera una picadura acética (Dzialo *et al.*, 2017). En cuanto a las sidras elaboradas con 'Red Delicious' K1-V1116 nuevamente presentó

el mayor valor (0.12 g ácido acético L⁻¹), MM7 (0.11 g ácido acético L⁻¹), RY5 (0.11 g ácido acético L⁻¹) y 436.4 (0.11 g ácido acético L⁻¹), sin diferencias con los otros tratamientos.

Tabla 4.8. Acidez volátil (AV) y SO₂ total de la sidra espumosa de manzana de dos cultivares en función de la cepa de levadura

Variedad	'Golden Delicious'		'Red Delicious'	
	AV (g ácido acético L ⁻¹)	SO ₂ total (mg L ⁻¹)	AV (g ácido acético L ⁻¹)	SO ₂ total (mg L ⁻¹)
K1-V1116	0.31±0.0 ^a	124.80±3.2 ^a	0.12±0.0 ^a	84.27±1.9 ^b
MM7	0.27±0.1 ^{ab}	129.10±18.8 ^a	0.11±0.0 ^b	106.67±14.8 ^a
436.4	0.13±0.1 ^b	112.00±9.6 ^a	0.11±0.0 ^b	104.53±10.3 ^a
RY5	0.15±0.0 ^b	117.30±22.7 ^a	0.11±0.0 ^b	102.40±6.4 ^a

Medias provenientes de tres repeticiones ± desviación estándar. Valores con la misma letra dentro de columnas, son estadísticamente iguales (Tukey, P≤0.05).

Por otro lado, los valores de anhídrido sulfuroso total se encontraron entre 129.10 (MM7) y 112.00 (436.4) mg L⁻¹ para la variedad 'Golden Delicious', mientras que para 'Red Delicious' éstos van desde 106.67 (MM7) a 84.27 mg L⁻¹ (K1-V1116), de acuerdo a estos valores ambas sidras se encuentran en los niveles señalados por la NOM-199-SCFI-2017 de 300 mg L⁻¹ de anhídrido sulfuroso total (SEGOB, 2017). Sin embargo estos fueron mayor al obtenido por la sidra tranquila (Tabla 4.6), esto es debido a que previo a la segunda fermentación se añadió un segundo sulfitado con una concentración de 3 g HL⁻¹ de metabisulfito de potasio, como prevención para control de microorganismos, mientras se efectuaba la clarificación de la sidra tranquila.

4.3. Determinación de ácido málico, ácido acético, azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) y glicerol en la sidra por HPLC a partir del mosto hasta el término de la segunda fermentación.

4.3.1. 'Golden Delicious'

En la Figura 4.4 se muestran los análisis realizados mediante HPLC durante la fermentación para la obtención de la sidra espumosa. Referente al ácido málico, en la figura 4.4. A se observa un descenso súbito durante los primeros 40 días, lo cual muy probablemente se debe a la realización espontánea de una fermentación maloláctica parcial llevada a cabo por bacterias acidolácticas presentes de manera natural en la sidra (Id *et al.*, 2017), así como las misma levaduras del género *saccharomyces*. Las cepas presentan niveles comparables hasta el final de la fermentación 436.4 (4.0 g L⁻¹), K1-V1116 (4.8 g L⁻¹), MM7 (4.7 g L⁻¹) y RY5 (4.1 g L⁻¹), los cuales son inferiores a los del mosto inicial (7.9 g L⁻¹ de ácido málico en el mosto). Siendo el ácido málico el principal ácido orgánico presente en la manzana, su concentración es muy variable (0.3 a 1 %) y dependerá fundamentalmente de la variedad, el estado de madurez y las condiciones ambientales durante el crecimiento y almacenamiento del fruto (Herrero *et al.*, 2010), de acuerdo a lo que ya se ha reportado para manzana de mesa éste se puede encontrar en concentraciones promedio de 8.8 g L⁻¹ en jugos, cultivadas en 12 países y diferentes regiones de Europa, y 7.4 g L⁻¹ en jugos obtenido de cultivares de manzana polacos/franceses (Iaccarino *et al.*, 2019).

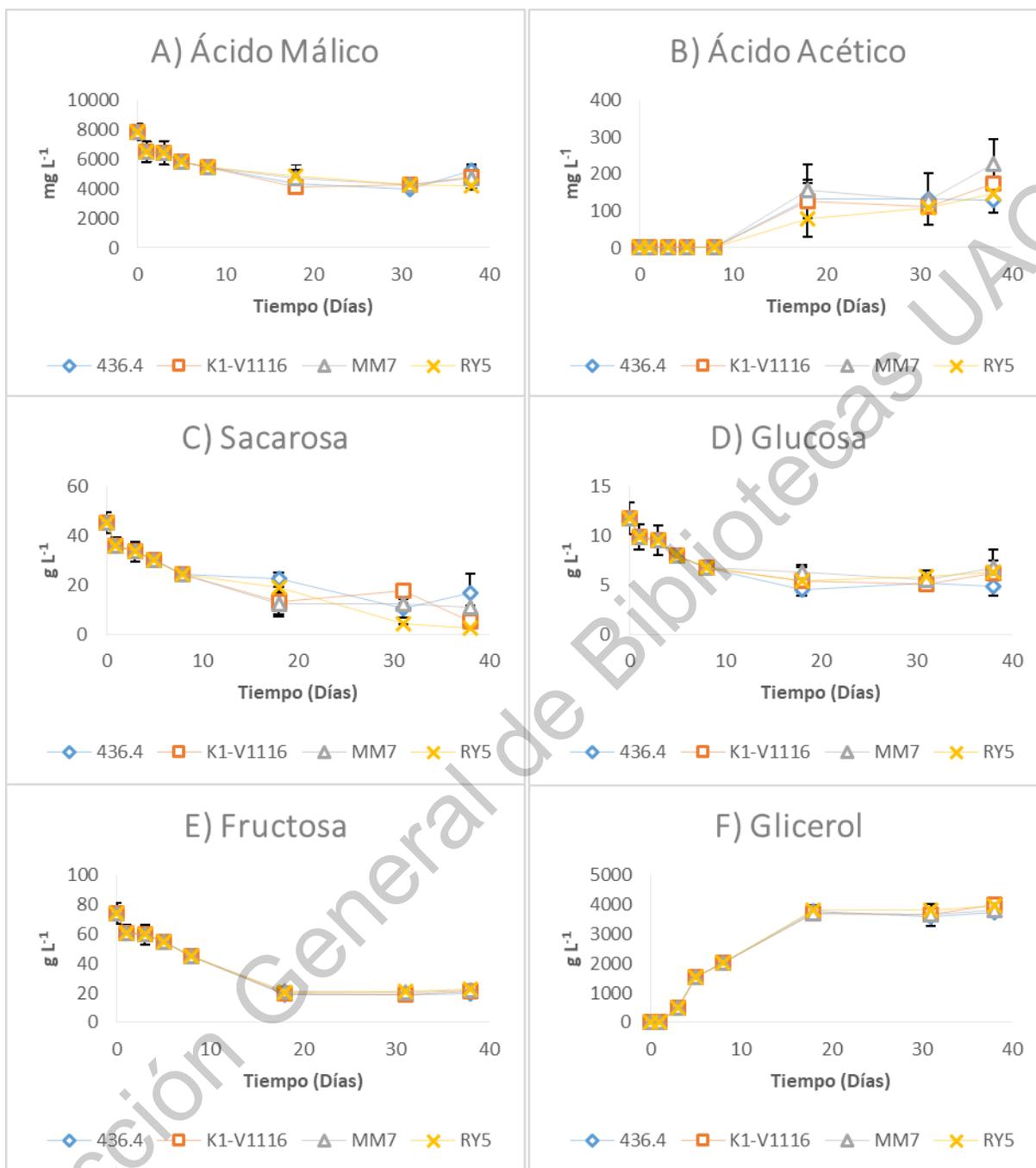


Figura 4.4. Evolución de los diferentes compuestos durante la segunda fermentación de sidras de base elaboradas con la variedad 'Golden Delicious' en función de la levadura

En la Figura 4.4. B correspondiente al ácido acético, se puede observar que a medida que evoluciona la fermentación, la cepa MM7 (0.23 g L^{-1}) presenta una mayor concentración de este compuesto y en menor proporción RY5 (0.15 g L^{-1}), siendo los valores muy similares a los obtenidos por los métodos descritos por la OIV (2018a) con MM7 y RY5 (0.26 y $0.15 \text{ g ácido acético L}^{-1}$, respetivamente) (Tabla 4.8), el ácido acético es responsable del sabor a vinagre en las muestras de sidra, y se sintetiza mediante la oxidación del acetaldehído por fermentación alcohólica o maloláctica (Venkatachalam *et al.*, 2018).

En la Figura 4.4. C la sacarosa presentó mayor variabilidad en su evolución, en función de la cepa de levadura, donde RY5 (2.71 g L^{-1}) observa una tendencia más marcada a hidrolizar este azúcar respecto a 436.4 (16.80 g L^{-1}), a medida que avanzaba la fermentación, se puede apreciar a los nueve días de la primera fermentación (sidra tranquila) una concentración de 24 g L^{-1} , posterior a esta etapa recordemos que se hace la adicción del licor de *tirage* (25 g L^{-1} de azúcar y la levadura) para la inducción de una segunda fermentación en botella, de acuerdo a ello se tendría hasta 69 g L^{-1} tan sólo de sacarosa, si se contempla lo que ya estaba presente en la sidra tranquila más lo añadido, lo que supondría hasta un incremento de 4 °GL si se toma como referencia que por cada 16 a 17 g L^{-1} de azúcares se puede producir 1 °GL (Johansen *et al.*, 2019). La disminución en las concentraciones de sacarosa durante la fermentación se debe a la hidrólisis de este disacárido por la enzima invertasa expresada por la levadura en especial por *S. cerevisiae*, y que da como resultado los azúcares simples glucosa y fructosa (Yang *et al.*, 2015). Berni *et al.* (2019) determinó que la variedad 'Golden Delicious', puede presentar 20.44 g L^{-1} de glucosa, 69.14 g L^{-1} de fructosa y 17.34 g L^{-1} de sacarosa, mientras que nuestro valores se encontraron para glucosa 11.80 g L^{-1} , fructosa 74.05 g L^{-1} y en mayor proporción a lo reportado para sacarosa 45.38 g L^{-1} .

En las Figuras 4.4. D y 4.4. E, correspondientes a glucosa y fructosa respectivamente se puede ver la tendencia de estos azúcares a disminuir en todas las cepas conforme avanza la fermentación de los mostos, como consecuencia del consumo por las levaduras, se sabe que las levaduras *Saccharomyces* son capaces

de degradar tanto la glucosa como la fructosa, aunque la glucosa se degrada más en las primeras etapas de la fermentación (Goold *et al.*, 2017).

Finalmente en la Figura 4.4. F, correspondiente a glicerol, se ve claramente que a medida que los azúcares se transforman en alcohol, también se denota la presencia de dicho compuesto como resultado de la producción de este metabolito por las levaduras (Cordente *et al.*, 2012), no habiendo diferencias entre éstas.

4.3.2. 'Red Delicious'

En la Figura 4.5 se observa la evolución desde los mostos hasta el término de la fermentación para la variedad 'Red Delicious', en la Figura 4.5. A, correspondiente a ácido málico, se observa una clara disminución de este compuesto, presentándose valores similares en todas las cepas hacia el final de la fermentación: 436.4 (3.1 g L⁻¹), K1-V1116 (3.3 g L⁻¹), MM7 (3.6 g L⁻¹) y RY5 (3.5 g L⁻¹), siendo concentraciones menores a las obtenida por la metodología descrita por la OIV (4.53, 4.38, 4.91 y 5 g L⁻¹, respectivamente) (Tabla 4.7), estas variables pueden estar influenciadas por ser diferente lote de manzanas. Es importante recalcar que estas fermentaciones se realizaron de manera independiente en tubos falcón de 50 mL, partiendo de un mosto con una concentración inicial de 7.8 g L⁻¹ de ácido málico. Como ya se sabe, éste es el principal ácido en el jugo de manzana y la sidra, una característica es su fuerte sabor, una alta concentración que imparte un sabor áspero, este compuesto puede ser parcial o totalmente degradado por las levaduras durante la fermentación. También puede ser sintetizado en las células de las levaduras a través de la fijación de CO₂ con piruvato para formar oxaloacetato (Zuo *et al.*, 2019).

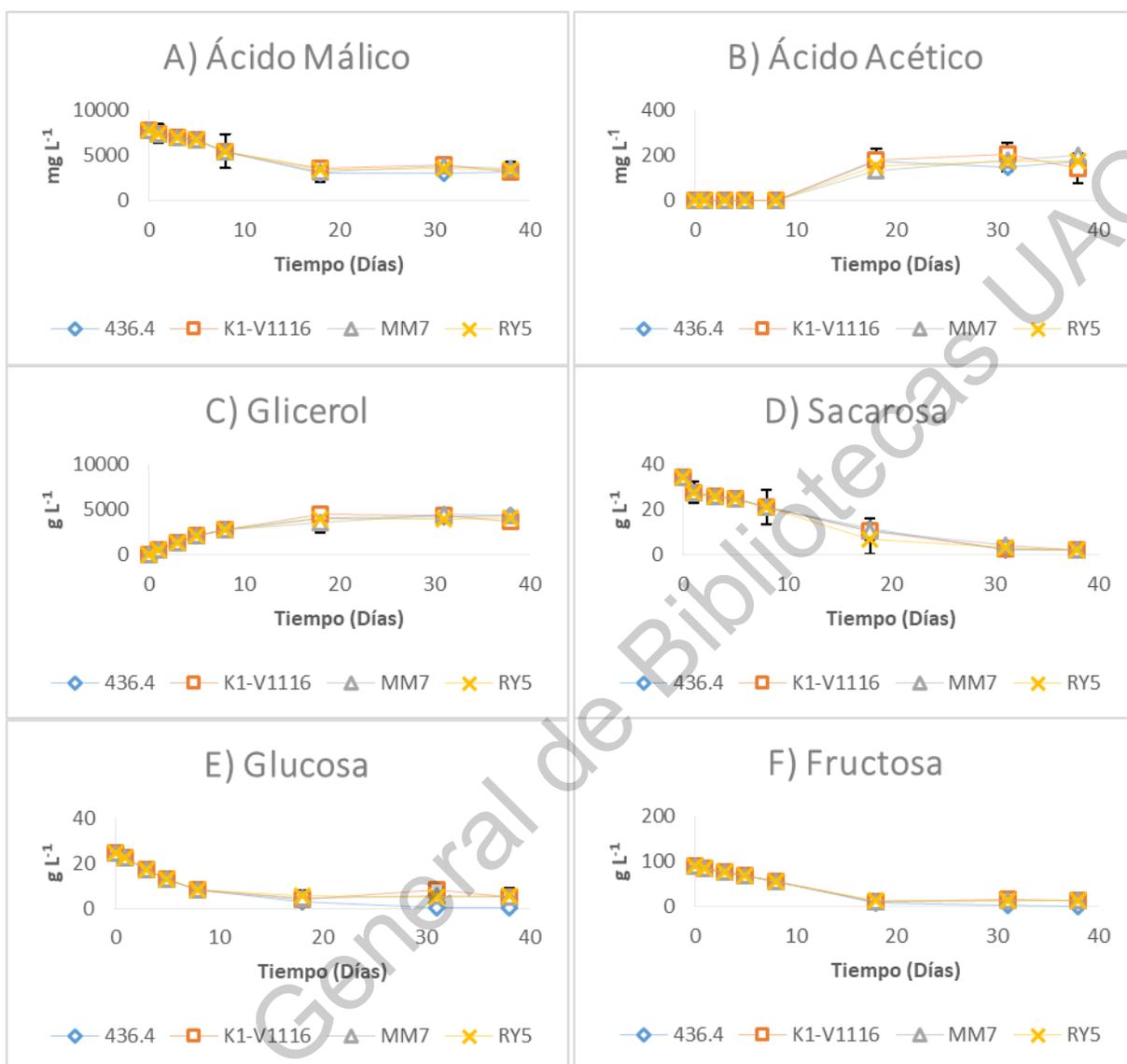


Figura 4.5. Evolución de los diferentes compuestos durante la segunda fermentación de sidras de base elaboradas con la variedad ‘Red Delicious’

En la Figura 4.5. B, correspondiente a ácido acético, se observa que las cepas presentaron un comportamiento muy variable, con una tendencia más pronunciada para MM7 (0.19 g L⁻¹), seguida de RY5 (0.17 g L⁻¹), 436.4 (0.17 g L⁻¹) y en menor concentración la cepa comercial K1-V1116 (0.14 g L⁻¹). La producción de ácido acético puede dar como resultado la formación de compuestos volátiles desagradables como el acetato de etilo que presenta un aroma a esmalte de uñas (Moreno-Arribas y Polo, 2005), por ello es importante que se encuentre dentro de

los límites establecido por la NOM-199-SCFI-2017. Además de los aromas indeseables, los altos niveles de ácido acético son tóxicos para la levadura y pueden provocar fermentaciones alcohólicas incompletas.

En la Figura 4.5. C, correspondiente a glicerol, todas las cepas evidenciaron un comportamiento similar en la producción de este metabolito alrededor de 4 g L^{-1} de glicerol similar también para 'Golden Delicious' aunque ligeramente inferior con una concentración de 3.8 g L^{-1} , derivado de la fermentación alcohólica, siendo el principal aliciente de la glucosa (Goold *et al.*, 2017).

En la Figura 4.5. D, correspondiente a sacarosa se advierte un descenso con todas las levaduras evaluadas (436.4, MM7, K1-V1116 y RY5) hasta llegar a 2 g L^{-1} de concentración de dicho azúcar, esto se contrasta de manera clara con la variedad 'Golden Delicious', donde se pudo observar en la Figura 4.4 C hay mayor variabilidad entre las cepas que va desde $16.8 (436.4)$ a 2.71 g L^{-1} (RY5) de azúcar, el cual tiene un efecto directo en la producción de alcohol, influenciado ya sea por la variedad, su composición nutrimental y estado de madurez de la manzana (Rita *et al.* 2011).

Mientras tanto en la figura 4.5. E, correspondiente a glucosa la cepa 436.4 obtuvo los menores valores al final de la fermentación (0.43 g L^{-1}), contrastando con las otras tres cepas (MM7, RY5 y K1-V1116) que se ubicaron alrededor de 5 g L^{-1} , mientras que para la variedad 'Golden Delicious' en la figura 4.4. E se ve una tendencia a disminuir muy similar en todas las cepas alrededor de 5 a 6 g L^{-1} , siendo la glucosa la primera en degradarse por las levaduras (Goold *et al.*, 2017).

Finalmente en la Figura 4.5. F, correspondiente a fructosa, la cepa 436.4 fue nuevamente la que mayor consumo de este azúcar presentó (1.32 g L^{-1}). Contrastando con 'Golden Delicious' en la figura 4.4. C, se observó que las cepas tuvieron un comportamiento similar entre 19 a 22 g L^{-1} (436.4 y RY5, respectivamente) pero con mayor concentración al final de la segunda fermentación.

Se ha reportado que en los mostos iniciales las concentraciones tanto de glucosa como de sacarosa son bastante variables, fluctuando de 5.4 a 20.7 (promedio 12.0) g L^{-1} y de 8.5 a 63.2 (promedio 33.5) g L^{-1} , respectivamente (Iaccarino *et al.*, 2019). Mientras que en manzanas de variedad sidrera se ha

encontrado jugos que contenían de 100 a 150 g L⁻¹ de azúcares totales fermentables (fructosa, glucosa y sacarosa) (Sukhvir & Kocher, 2019), nuestra variedad mostró un total de azúcares de 147 g L⁻¹, muy similar en concentración de azúcares de los jugos de variedades sidreras españolas, lo que significativamente impactara en la producción de etanol y metabolitos por efecto de la fermentación alcohólica llevada a cabo por las diversas levaduras.

4.4 Determinación de Nitrógeno total durante la segunda fermentación

En la Figura 4.6 se presenta el contenido de nitrógeno total para las variedades 'Golden Delicious' y 'Red Delicious', con las cepas 436.4 (0.09 % y 0.07 %), RY5 (0.09 % y 0.06 %), K1-V1116 (0.08 % y 0.07 %) y MM7 (0.08 % y 0.07 %), respectivamente. En ambas variedades se presentó una tendencia a disminuir muy similar entre tratamientos. Partiendo de mostos para la variedad 'Red Delicious' con una concentración total de 0.08 %, mientras que 'Golden Delicious' se obtuvo hasta 0.12 %, El jugo de manzana generalmente contiene poco nitrógeno (<0.35 %) (Sukhvir & Kocher, 2019). Por ejemplo, un mosto de manzana de una densidad de 1.059 g cm⁻³ deberá contener un mínimo de 80 mg L⁻¹ de nitrógeno asimilable (YAN) (Mangas-Alonso, 1999), la concentración y composición de nitrógeno pueden afectar la cinética de fermentación de la sidra y la formación de compuestos aromáticos volátiles por la levadura (Boudreau *et al.*, 2018), así como la producción de compuestos azufrados y carbamato de etilo (producto tóxico), estrechamente vinculado a la composición nitrogenada del mosto. Ya que a través de la vía de Ehrlich las levaduras pueden recolectar y utilizar el nitrógeno esencial según sea necesario (Dzialo *et al.*, 2017). Esto es evidente al observar la Figura 4.6 donde se ve menos presencia de nitrógeno conforme evoluciona la fermentación para la obtención de las sidras espumosas.

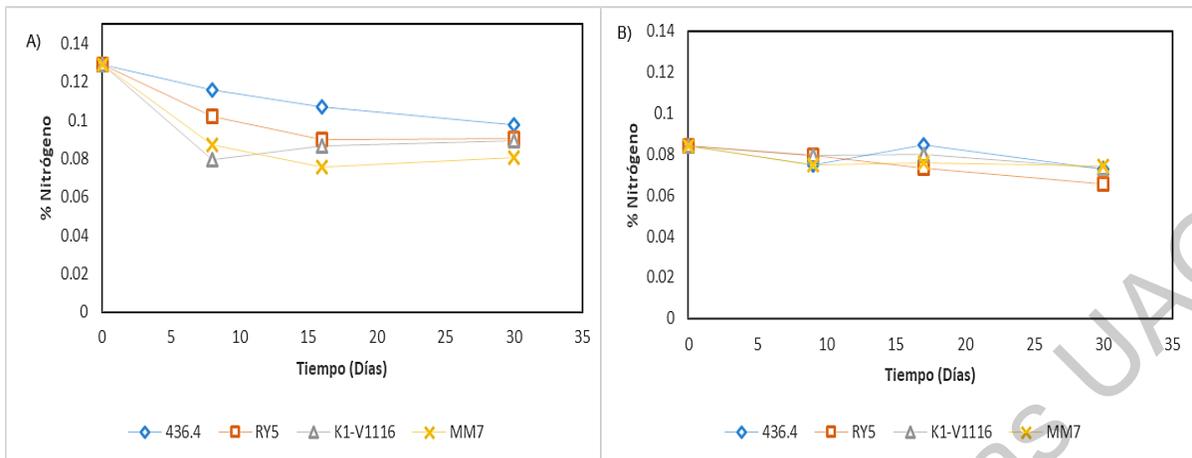


Figura 4.6 Porcentaje de Nitrógeno total conforme evoluciona la fermentación de los mostos de manzana A) 'Golden Delicious'; B) 'Red Delicious'

4.5 Análisis Sensorial de las sidras espumosas

4.5.1. 'Golden Delicious'

En la Tabla 4.9 se muestra la suma de rangos de las 28 variables analizadas en las sidras espumosas realizadas con 'Golden Delicious', donde los tres aspectos principales evaluados fueron: visual, olfativo y gustativo.

En el aspecto visual no se presentan diferencias en ninguna de las cuatro variables analizadas ("espalme", "pegue", "aguante" y "sedimentos") ($P \leq 0.05$), estas características son de relevancia para el análisis sensorial de las sidras. De acuerdo a la literatura, el "espalme" es la desaparición rápida y completa de la espuma al servido en la copa, el "pegue" es la película que se forma alrededor de la copa después del servido, aguante es la presencia de las burbujas formada desde el fondo del líquido hacia la superficie y los sedimentos se reconoce como la presencia de partículas resuspendidas en la sidra que provocan turbidez y generalmente están depositadas en el fondo (Herrero *et al.*, 2010). León-Teutli *et al.* (2019) reportó que las cepas K1-V1116 y MM7 (SR= 35.5 y 33.5, respectivamente) destacaron a nivel visual, lo que contrasta con nuestros resultados. Suárez-Valles *et al.* (2008) al evaluar levaduras seleccionadas de la región contra una cepa comercial de *S. cerevisiae* como cultivos para la segunda fermentación, encontraron que la cepa

comercial obtuvo la menor puntuación a nivel visual. Recordemos que la espuma, la efervescencia y el collar son muy solicitados por el consumidor durante la degustación de una bebida espumosa, por lo que nuestras cepas seleccionadas (436.4, RY5 y MM7) al menos obtienen valores comparables al de la cepa comercial K1-V1116, por lo que no se descarta el que pudieran ser usadas como cultivos iniciadores para mejorar la calidad espumosa de las sidras. Por lo que respecta a las propiedades espumosas de los vinos, se han establecido correlaciones positivas entre las proteínas y la espumidad y/o estabilidad de la espuma, influenciado por diversas variables (variedad, condiciones de elaboración, cepa, etc.) (Cilindre *et al.*, 2010). León-Teutli *et al.* (2019) encontraron que la levadura MM7 destacó por la calidad visual de sus sidras, a pesar de no haber diferencia ($P \leq 0.05$) entre nuestros tratamientos. MM7 fue la de mayor puntuación (“espalme” SR=30.0,” pegue” SR=32.5 y “aguante” SR=30.0).

Tabla 4.9. Suma de rangos (SR) en la prueba de Friedman para la evaluación sensorial de sidras espumosas elaboradas con cuatro cepas de levaduras en 'Golden Delicious'

Variables evaluadas	K1-V1116	436.4	RY5	MM7	P
Visual					
Espalme	20.0	23.0	27.0	30.0	>0.3234
Pegue	22.5	20.5	24.5	32.5	>0.1586
Aguante	22.5	23.5	24.0	30.0	>0.5174
Sedimentos	24.0	23.5	26.5	26.0	>0.9415
Olor (reposo)					
Intensidad	26.0	22.5	28.5	23.0	>0.6965
Vinagre/acético	33.0	24.0	21.0	22.0	>0.138
Frutal	30.5	25.0	23.5	21.0	>0.3964
Floral	27.0	21.5	28.0	23.5	>0.6288
Dulce	30.0	24.0	20.5	25.5	>0.4205
Lácteo	31.5	22.0	24.0	22.5	>0.1916
Especies	22.0	24.0	31.0	23.0	>0.2499
Sulfhídrico	23.0	27.0	21.5	28.5	>0.4867
Fresco	31.0	25.0	19.0	25.0	>0.2165
Aroma (agitación)					
Vinagre/acético	27.0	28.0	18.5	26.5	>0.2702
Frutal	25.5	21.0	22.0	31.5	>0.2432
Floral	21.5	25.5	21.5	31.5	>0.2463
Dulce	29.5	22.0	22.0	26.5	>0.4836
Lácteo	24.5	28.0	25.5	22.0	>0.7546
Especies	27.5	23.0	28.0	21.5	>0.4656
Sulfhídrico	26.5	29.5	20.5	23.5	>0.3706
Fresco	32.5	27.5	14.5	25.5	<0.0103
Calidad Gustativa					
Dulce	22	19	25.5	33.5	>0.0617
Ácido	28.5	23.5	26.5	21.5	>0.6203
Amargo	30	25	29.5	15.5	<0.0418
Astringente	23	30.5	27	29.5	>0.2108
Espumoso	26	25	24.5	24.5	>0.9928
Persistencia posgusto	29	18	30	23	>0.1054
Calidad posgusto	20	22.2	27.5	30	>0.2853

Medias provenientes de 10 repeticiones (jueces), para cuatro tratamientos (cepas de levaduras) tomando un valor $P \leq 0.05$.

En el aspecto del olor (en reposo), tampoco se encontraron diferencias significativas ($P \geq 0.05$) entre las distintas levaduras. En términos generales los aromas como “frutales”, “florales”, “neutrales”, “rancias” o “lácteo”, “Sulfhídricos”, etc., potencialmente influirán en el perfil de sabor y lo más importante en los consumidores (Cordente *et al.*, 2012). Es por ello, que la elección del inóculo de levadura dependerá de su capacidad relativa para producir ésteres (notas afrutadas y florales), alcoholes superiores (sabores de fondo), compuestos fenólicos (notas aromáticas interesantes o desagradables) y ácidos grasos volátiles (Cordente *et al.*, 2012; Id *et al.*, 2017)

Por lo que respecta al aroma (en agitación), de las ocho variables evaluadas únicamente se tienen diferencias ($P \leq 0.05$) en “fresco” (aroma a hierbas aromáticas), sobresaliendo K1-V1116 (SR=32.5) contrastando con RY5 (SR=14.5). Los resultados anteriores coinciden sensiblemente con León-Teutli *et al.* (2019), donde RY5 obtiene un valor muy pobre (SR = 10.0) en el aspecto olfativo.

En cuanto a la calidad gustativa, sólo se observaron diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) para la variable “amargo” que denota una sensación desagradable percibida principalmente en la parte posterior y los lados de la lengua, que generalmente se muestra con ciertos alcaloides vegetales como la cafeína y la quinina (Lea & Arnold, 1978), donde K1-V1116 (SR=30) fue la de mayor puntuación, contrastando con MM7 (SR=15.5), esta última resultó ser agradable al paladar al ser la menos áspera, siendo los principales responsables los taninos (Herrero *et al.*, 2010), es por ello que los polifenoles juegan un papel importante en la afectación de la calidad de la sidra, ya que están relacionados con el color, el amargor y astringencia, cuyo equilibrio define la sensación general de la bebida en la boca (Lea & Piggott, 2003). De forma general, nuevamente este resultado es similar a los de León-Teutli *et al.* (2019), en la que destaca a MM7 como la mejor cepa nativa en el análisis sensorial de la sidras espumosas elaborados con la variedad ‘Golden Delicious’.

Los resultados obtenidos muestran que las cepas seleccionadas pueden producir sidras espumosas de calidad y aceptabilidad equiparables con las producidas con cepas comerciales, sin embargo es importante seguir evaluado cepa como la RY5 (*S. paradoxus*), ya que aún no es muy destacable en fermentaciones, una especie rara cuyo éxito depende de las especies microbianas mucho más abundantes que la rodean, siendo así de origen mayormente ambiental (Kowallik *et al.*, 2015).

4.5.2. 'Red Delicious'

Para la variedad 'Red Delicious' en el aspecto visual sólo se obtienen diferencias en "espalme" (cualidad que se presenta en el servido) ($P \leq 0.05$), destacando MM7 (SR=34), quien contrasta con 436.4 (SR=18), esta propiedad, como ya se mencionó anteriormente, está asociado a las proteínas y polifenoles totales, que pueden ejercer un impacto positivo en la espumabilidad de las sidras (Lobo *et al.*, 2005).

Con respecto al olor (copa en reposo), solamente se encuentran diferencias a nivel "floral" y "fresco", destacando en ambos casos RY5 (SR=32 y SR=30.5, respectivamente). El primer aroma se asocia a compuestos volátiles como el 2-feniletanol o el acetato de 2-feniletanol (Le Quéré *et al.*, 2006). Muchos estudios reportan que los compuestos de éster son los principales contribuyentes del olor "dulce", "floral" y "afrutado" en la sidra, y éstos se forman principalmente a través de la esterificación de alcoholes con ácidos grasos a lo largo de las etapas de fermentación y post-fermentación (Venkatachalam *et al.*, 2018). Por su parte el "fresco" (aromas de hierbas aromáticas) también difiere en función de la levadura, sólo que en este caso destacó RY5, caso totalmente opuesto a lo ocurrido en 'Golden Delicious', donde resultó la menos favorecida. De acuerdo a la bibliografía, existen varios factores que influyen en la síntesis de estos compuestos aromáticos, entre los cuales se encuentran la madurez, clima, condiciones de almacenamiento y variedad, esta última puede influir en el contenido y su concentración de aromas (Salas-Salazar & Olivas-Orozco, 2009). Del mismo modo, en el Aroma (copa en agitación), no se detectaron diferencias significativas en ninguna de las variables evaluadas.

Tabla 4.10. Suma de rangos (SR) en la prueba de Friedman para la evaluación sensorial de la calidad de sidras espumosas elaboradas con cuatro cepas de levaduras en 'Red Delicious'

Variables evaluadas	K1-V1116	436.4	RY5	MM7	P
Visual					
Espalme	19.0	18.0	28.5	34.0	<0.0099
Pegue	21.5	24.0	26.5	28.0	>0.6787
Aguante	20.5	30.0	21.0	28.5	>0.2123
Sedimentos	30.0	28.0	21.5	20.5	>0.2407
Olor (reposo)					
Intensidad	23.0	23.0	27.0	27.0	>0.8109
Vinagre/acético	25.0	26.5	28.5	20.0	>0.4666
Frutal	28.5	21.0	31.5	19.0	>0.0915
Floral	31.5	18.0	32.0	18.5	<0.0108
Dulce	28.0	29.0	27.0	16.0	>0.0808
Lácteo	23.5	22.5	28.0	26.0	>0.7417
Especies	32.5	22.0	19.5	26.0	>0.0866
Sulfhídrico	28.0	23.5	30.5	18.0	>0.0942
Fresco	28.0	23.5	30.5	18.0	<0.0067
Aroma (agitación)					
Vinagre/acético	20.5	23.5	31.5	24.5	>0.2548
Frutal	27.5	26.0	25.0	21.5	>0.7534
Floral	28.0	31.0	23.0	18.0	>0.1086
Dulce	30.0	25.0	27.0	18.0	>0.1968
Lácteo	23.5	25.5	25.5	25.5	>0.9757
Especies	23.5	27.5	22.5	26.5	>0.7462
Sulfhídrico	28.0	19.5	30.0	22.5	>0.2080
Fresco	28.0	29.0	21.5	21.5	>0.3916
Calidad Gustativa					
Dulce	17.5	29.5	32.5	20.5	<0.0248
Ácido	32.5	17.0	25.0	25.5	>0.0628
Amargo	29.0	19.5	25.0	26.5	>0.4011
Astringente	33.5	22.5	25.0	19.0	>0.0693
Espumoso	27.0	22.5	25.0	25.5	>0.8785
Persistencia posgusto	30.0	24.0	20.5	25.5	>0.4158
Calidad posgusto	27.5	23.0	26.5	23.0	>0.8013

Medias provenientes de 10 repeticiones (jueces), para cuatro tratamientos (cepas de levaduras) tomando un valor $P \leq 0.05$.

Finalmente en la calidad gustativa, RY5 (SR=32.5) resulto ser estadísticamente diferente ($P \leq 0.05$) a la cepa comercial K1-V1116 (SR=17.5) en la variable evaluada como “dulce”. Ésta suele deberse a moléculas orgánicas, generalmente, de algún grupo funcional tipo alcohol, aldehído o amino, siendo, por lo general, más dulces cuantos más grupos alcohol posean, particularmente el glicerol; por eso, los azúcares y los polialcoholes son los máximos representantes de las sustancias dulces, siendo la referencia habitual la sacarosa (Herrero *et al.*, 2010). En este caso las diferencias obtenidas en “dulce” podrían ser atribuidas a la síntesis de algún alcohol, quizás el glicerol por la levadura, se ha observado que imparte dulzura en un umbral de aproximadamente 5.2 g L^{-1} en el vino blanco, pero se necesitarían más de 28 g L^{-1} para hacerse notar en términos de viscosidad y sensación en la boca (Goold *et al.*, 2017), ya que la concentración de azúcares en las sidras obtenidas, particularmente con esta cepa, no sobrepasan los límites detectables ($< 5 \text{ g L}^{-1}$) (Herrero *et al.*, 2010), sin embargo si hablamos de azúcares en particular la fructosa fluctuó al final de la fermentación en 14.92 g L^{-1} , lo que supondría un impacto en la bebida. Por ejemplo, en concentraciones que generalmente oscilan entre 5 y 12 g L^{-1} en el vino de mesa, el glicerol tiene un efecto aparente en la dulzura, para la cepa RY5 este se ubicó en 3.51 g L^{-1} de glicerol, lo que supondría un menor impacto de acuerdo a lo demostrado en los vino. Recordemos también que esta especie (*S. paradoxus*) no es muy conocida para llevar a cabo fermentaciones, sin embargo en la variedad ‘Red Delicious’ mostró tener mejores resultados en variables que denotan de manera positiva la aceptación de la sidra espumosa.

De acuerdo a la evaluación sensorial efectuada, se puede observar que la aceptación de las sidras dependerá claramente de las sensaciones que estas variables o características producen y, en general, aquello que no genera sensaciones positivas no se acepta. Por ende la respuesta, es de extrema importancia para la calidad del producto.

4.6. Determinación de los compuestos Aromáticos

4.6.1. 'Golden Delicious'

En la Figura 4.7 correspondiente a los cromatogramas de las sidras elaboradas con las distintas cepas de levaduras (436.4, K1-V1116, MM7 y RY5, A, B, C y D respectivamente) no se encontraron diferencias cualitativas entre los tratamientos, ya que en todos los casos se pueden ver los principales compuestos volátiles posteriores a la fermentación alcohólica en las sidras espumosas artesanales.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

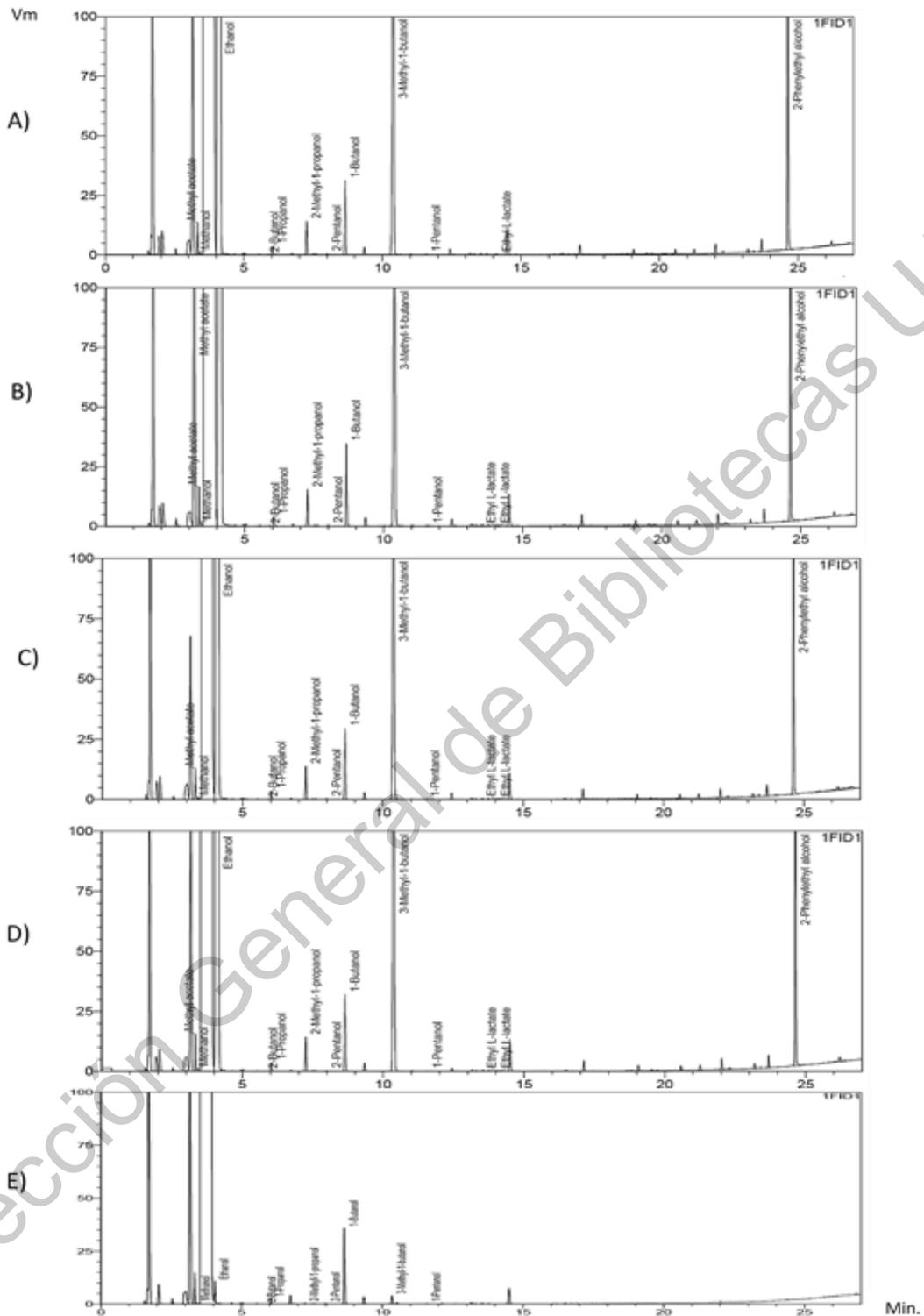


Figura 4.7. Cromatogramas de los compuestos volátiles en la sidra espumosa elaborados con cuatro cepas seleccionadas, así como en mosto.

A) 436.4; B) K1-V1116; C) MM7; D) RY5 y E) mosto sin inocular, para la variedad 'Golden Delicious', con los siguientes compuestos; pico 8=acetato de metilo; pico 9=metanol; pico 12=etanol; pico 17=2-butanol; pico 19=1-propanol; pico 21= 2-metil-1-propanol; pico 24=2-pentanol; pico 25=1-butanol; pico 27=3-metil-1-propanol; pico 29=1-pentanol; pico 36-36=lactato de etilo y pico 56=2-feniletil etanol.

Sin embargo, si comparamos los cromatogramas con el correspondiente al del mosto (Figura 4.7. E), se puede ver que los nuevos compuestos generados como producto de las fermentaciones son acetato de metilo, lactato de etilo, acetato de etilo y 2-feniletil etanol (Figura 4.7. A, B, C y D). Los principales alcoholes que se encuentran en las bebidas alcohólicas generalmente son, 1-propanol (aroma alcohólico), 1-butanol, isobutanol, 2-fenil etanol y alcohol isoamílico (Dzialo *et al.*, 2017). Sin embargo, al igual que en las sidras espumosas, los compuestos predominantes en el mosto de la manzana, son principalmente los alcoholes y ésteres (Salas-Salazar & Olivas-Orozco, 2009); pero muy pocos de estos compuestos pueden causar un impacto en la calidad tanto de la fruta como de la sidra. Se ha reportado que los compuestos volátiles predominantes que tienen un impacto organoléptico en 'Golden Delicious' son compuestos como el butanol y 1-hexanol asociados con la sensación "Dulce" pero también puede contribuir con connotaciones herbáceas negativas, el origen de este compuesto está relacionado con la actividad de la lipoxigenasa y/o aireación del mosto (Tufariello *et al.*, 2011), otros compuestos como etil butirato o 2-metil butirato aportan aromas "Frutales". De manera particular, se han reportados compuestos tales como 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 1-butanol, 4-metil-2-pentanol, 2-metil-1-butanol y 1-hexanol, conformando el grupo de los alcoholes. Y esterés tales como el acetato de etilo, propionato de etilo, 1-butil propionato, entre otros, muchos de ellos en cantidades trazas. En el caso de nuestro mosto, se encontraron compuestos tales como el metanol, 1-butanol, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol, 1-propanol, 1-pentanol y 2-pentanol, como se observa en la Figura 4.7. E, en proporciones muy pequeñas, estos pueden constituir un 28% de la fracción volátil, si se contrasta con los diferentes tratamientos de las sidras espumosas (López *et al.*, 1997).

De acuerdo a ello, en los cromatogramas se pueden observar los siguientes compuestos volátiles de relevancia encontrados en las sidras espumosas; acetato de etilo, metanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol (isobutanol), 1-butanol, alcoholes amílicos (2-metil-1-butanol o 3-metil-1-butanol), 2-butanol, 2-pentanol (amilalcohol), lactato de etilo, acetato de metilo, y 2-feniletanol, siendo algunos de ellos derivados de origen varietal y otros propios de la fermentación alcohólica (Figura 4.7. A, B, C y D). Estos compuestos ya han sido identificados en sidras elaboradas con manzana de variedades sidreras, así como en sidras de las regiones europeas (Alberti *et al.*, 2016; Lobo, Antón-díaz *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2018). Los alcoholes superiores son los que se encuentran generalmente en mayores concentraciones (20 % de la fracción aromática) (Antón, 2015), productos de la intervención de enzimas, sustratos y diversas rutas metabólicas; dentro de los principales sustratos, se ha visto que son los aminoácidos quienes intervienen en la producción de alcoholes, por ejemplo, el 2-metil-1-butanol o 3-metil-1-butanol es derivado de la transformación de la leucina (Salas-Salazar & Olivas-Orozco, 2009). Esto es gracias a que los aminoácidos se asimilan fácilmente por las levaduras *Saccharomyces sp.*, donde son transportados a la célula de levadura a través de varios sistemas, que ocurren durante las fases log o exponencial del crecimiento de la levadura (Alberti *et al.*, 2016).

Las concentraciones obtenidas de los principales compuestos volátiles se resumen en la Tabla 4.11 entre los compuestos encontrados de mayor concentración, destaca el metanol (150 mg L⁻¹ para K1-V1116 y en menor con 23.59 mg L⁻¹ para MM7), mientras que en el mosto se encontró en una concentración de 71.10 mg L⁻¹, su contenido en la sidra dependerá del cultivar y estado de madurez del fruto; este compuesto es el producto de la acción que ejerce la enzima pectinmetilesterasa (PME) de la levadura sobre los grupos metoxilos (Rodríguez-Madrera *et al.*, 2007).

El segundo compuesto de mayor abundancia fue 3-metil-1-butanol (152.33 mg L⁻¹ con K1-V1116, 143.42 mg L⁻¹ con RY5 y en menor concentración 130.12 mg L⁻¹ con MM7), seguido del 1-butanol (30 mg L⁻¹ K1-V1116), en particular este compuesto no parece moverse de concentración del mosto (32 mg L⁻¹) a la sidra,

así como el 2-butanol (0.129 mg L⁻¹ con RY5 contrastando con 0.099 mg L⁻¹ con MM7), 3-metil-1-propanol (13.46 mg L⁻¹ con K1-V1116) y el compuesto más destacable el 2-feniletanol (70.57 con K1-V1116 y en menor concentración 59.65 mg L⁻¹ con MM7), los cuales aportan complejidad al aroma (al igual que el metanol), mientras que el 1-butanol está relacionado con aromas a plátano, ya detectado en sidras austriacas, siendo un aroma primario de las manzanas y el 2-feniletanol se asocia con notas a “rosas”, este compuesto es de relevancia en la bebidas alcohólicas, característico de las fermentaciones a través de la ruta de Ehrlich (Picinelli *et al.*, 2000), otros compuestos propios de la fermentación también fueron el 2-hexanol, 1-heptanol o el 2-octanol (siendo las más altas concentraciones para RY5 con 0.099, 0.058 mg L⁻¹ y 0.380 mg L⁻¹ con K1-V1116, respectivamente).

Tabla 4.11. Compuestos volátiles de la sidra espumosa para la variedad ‘Golden Delicious’

Compuesto	436.4	K1-V1116	MM7	RY5	Mosto	Unidades
Metanol	121.36	150.40	23.59	124.91	71.10	mg L ⁻¹
1-Butanol	27.77	30.94	26.63	28.74	32.09	mg L ⁻¹
2-Butanol	0.123	0.118	0.099	0.129	0.104	mg L ⁻¹
1-Propanol	8.810	9.750	8.430	9.140	6.770	mg L ⁻¹
2-Metil-1-propanol	12.18	13.46	12.05	12.40	0.550	mg L ⁻¹
3-Metil-1-butanol	134.70	152.33	130.12	143.42	7.21	mg L ⁻¹
Acetato de etilo	9.71	28.54	20.79	7.29	*ND	mg L ⁻¹
Acetato de metilo	2.50	13.67	2.83	2.90	ND	mg L ⁻¹
2-Feniletanol	60.89	70.57	59.65	66.73	ND	mg L ⁻¹
1-Hexanol	7.403	8.289	6.762	7.403	ND	mg L ⁻¹
2-Hexanol	0.085	0.095	0.082	0.099	ND	mg L ⁻¹
1-Heptanol	0.055	0.057	0.046	0.058	ND	mg L ⁻¹
2-Heptanol	0.197	0.258	0.137	0.259	0.101	mg L ⁻¹
2-Octanol	0.229	0.380	0.153	0.328	ND	mg L ⁻¹
3,3-Dimetil-2-butanol	285.06	313.93	275.41	291.83	ND	µg L ⁻¹
1-Pentanol	180.11	200.56	364.69	181.66	163.68	µg L ⁻¹
2-Pentanol	227.54	243.21	211.23	224.86	149.42	µg L ⁻¹
Lactato de etilo	373.28	423.57	371.66	423.42	ND	µg L ⁻¹

Estos resultados son obtenidos de una sola replica. *ND= no detectado

En cuanto al acetato de etilo, la mayor concentración se produce con la cepa de referencia K1-V1116 (28.54 mg L⁻¹) y en menor concentración para RY5 (7.28 mg L⁻¹), éste se ha reportado como uno de los ésteres de acetato más importantes que afecta el aroma de los vinos jóvenes de manzana, una fragancia agradable del tipo “frutal” (Peng *et al.*, 2015). Su contribución al perfil sensorial depende de su contenido y de la composición global de las sidras, asociado con aromas frutales y frescos, aunque en concentraciones elevadas aporta olores no deseables (pegamento o disolvente) (Braga *et al.*, 2013; Lobo *et al.*, 2016). Seguido del Acetato de metilo con K1-V1116 con mayor concentración (13.67 mg L⁻¹) en contraste con las cepas seleccionadas 436.4, RY5 y MM7 (alrededor de 2 mg L⁻¹). Por otra parte, el lactato de etilo se encontró en K1-V1116 en concentraciones de 423.57 µg L⁻¹, sin embargo las cepas 436.4, MM7 y RY5 también presentaron concentraciones similares a la cepa de referencia 373.28, 371.66 y 423.42 µg L⁻¹, respectivamente), también es un éster que suelen aportar aromas afrutados, generalmente estos esterres se producen en muy bajas concentraciones (Dzialo *et al.*, 2017).

Sin embargo, generalmente los alcoholes superiores (2-metil-1butanol, alcohol isoamilico y 2-fenil etanol) pueden impartir un efecto muy deseado en el sabor del producto, a pesar de un umbral sensorial más alto, que puede diferir en varios órdenes de magnitud con sus ésteres de acetato correspondientes (Dzialo *et al.*, 2017). Si se asocia con los resultados obtenido en la evaluación sensorial, únicamente destacó la cepa comercial K1-V1116 en la variable “fresco” dentro del aroma (copa en agitación) esta característica podría atribuirse también a compuestos como el 2-heptanol y 1-heptanol (0.258 y 0.057 mg L⁻¹, respectivamente para dicha cepa) aunque por otra parte estos valores resultaron similares a los obtenidos con las otras cepas, como con RY5 que se obtuvieron valores de 0.259 y 0.058 mg L⁻¹, respectivamente; sin embargo, ésta fue significativamente opuesta a la sidra elaborada con la cepa de referencia en los análisis sensoriales, destacando como la menos “fresco”, esta diferencia también se ve influenciado por la habilidad que tienen los jueces en percibir el aroma. Y lo

más importante, dado que esta cepa no ha sido muy estudiada en los procesos fermentativos, es evidente que se debe seguir sujeta a investigación debido a su similitud con *S. cerevisiae* y al potencial fermentativo que ha demostrado tener.

4.6.2. 'Red Delicious'

En la Figura 4.8 se pueden observar los cromatogramas de la variedad 'Red Delicious'. Al igual que en 'Golden Delicious' (Figura 4.7) cualitativamente no se aprecia diferencias de compuestos en función de las levaduras (436.4, K1-V1116, MM7 y RY5). De manera general en las Figura 4.8. A, B, C y D, se puede ver principalmente la presencia de algunos de los alcoholes propios de las bebidas alcohólicas como producto de la fermentación, tales como el 2-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-hexanol, 1-heptanol y 2-feniletanol, este último uno de los principales alcoholes aromáticos derivado de la vía metabólica de la L-fenilalanina (Sun *et al.*, 2013). Mientras que de origen varietal (Figura 4.7. E), son metanol, 1-butanol, 1-propanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 3-metil-1-propanol y 3-metil-1-butanol, encontrándose posteriormente en las sidras espumosas.

Es importante destacar, que al igual que en la variedad 'Golden Delicious', es claro que los productos como el acetato de metilo, lactato de etilo, acetato de etilo y 2-feniletanol están relacionados con la fermentación alcohólica, sin embargo, los principales compuestos alifáticos tales como el metanol, 1-propanol, 1-pentanol, 2-pentanol, 1-butanol, 2-metil-1-propanol y 3-metil-1-butanol, se encuentran presentes en el mosto de manzana (Figura 4.8. E), aunque en concentraciones inferiores; ya que éstos también pueden aumentar sus concentraciones considerablemente después de la fermentación alcohólica derivado del metabolismo de la levadura. De manera cualitativa, entre tratamientos se presentaron todos los compuestos mayoritarios comúnmente encontrados en las sidras espumosas de cada uno de los tratamientos 436.4, MM7, RY5 y K1-V1116 (Figura 4.8. A, B, C y D, respectivamente). Por otra parte, fue evidente que la variedad influye en la composición de los componentes volátiles, compuestos tales como el 2-butanol no se encontró para esta variedad en el mosto, así como la intensidad de los picos, ya que estos se muestran en menor proporción con respecto

a la variedad 'Golden Delicious' (Figura 4.7), pero si mayor presencia al final de la fermentación (sidra espumosa) con los diferentes tratamientos (436.4, MM7, RY5 y K1-V1116), aunque siendo menor la presencia en RY5 (Figura 4.8. D).

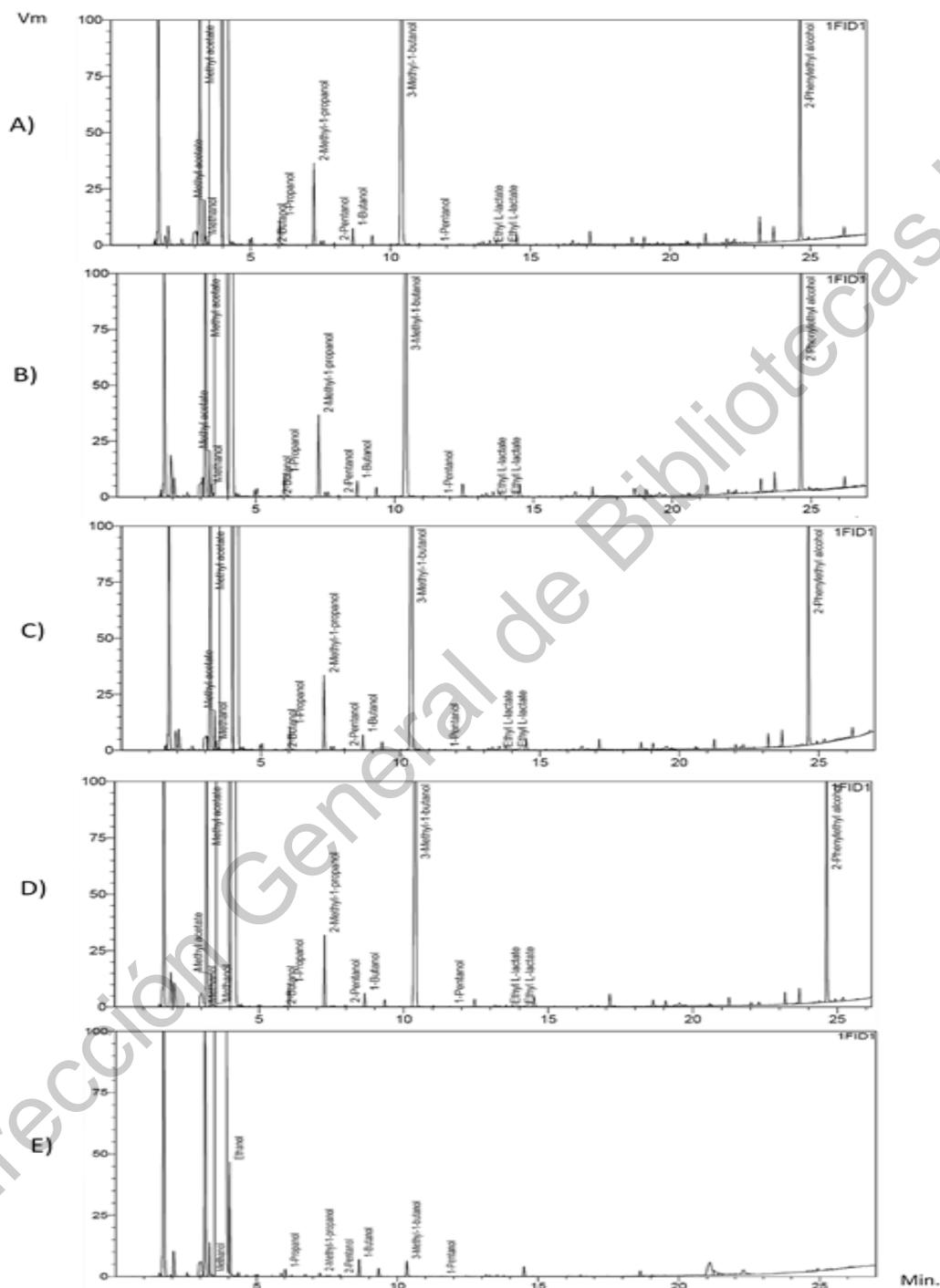


Figura 4.8. Cromatogramas de los compuestos volátiles en la sidra espumosa elaborados con cuatro cepas seleccionadas, así como en mosto.

A) 436.4; B) K1-V1116; C) MM7; D) RY5 y E) mosto sin inocular, para la variedad 'Red Delicious', con los siguientes compuestos; pico 8=acetato de metilo; pico 9=metanol; pico 12=etanol; pico 17=2-butanol; pico 19=1-propanol; pico 21=2-metil-1-propanol; pico 24= 2-pentanol; pico 25=1-butanol; pico 27=3-metil-1-propanol; pico 29=1-pentanol; pico 36-36=lactato de etilo y pico 56=2-feniletil etanol.

En la Tabla 4.12 se pueden ver las diversas concentraciones de los principales compuestos volátiles mayormente presentes en la sidra espumosa. Tales como los alcoholes isoamílicos (2-metil-1-butanol o 3-metil-1-butanol), metanol, 1-butanol, 1-propanol, 1-hexanol, 1-pentanol, 2-pentanol o el 2-feniletil etanol.

Tabla 4.12 Compuestos volátiles de la sidra espumosa para la variedad 'Red Delicious'

Compuesto	436.4	K1-V1116	MM7	RY5	Mosto	Unidades
Metanol	300.01	432.52	281.67	40.44	13.36	mg L ⁻¹
1-Butanol	6.840	6.610	6.280	5.760	6.600	mg L ⁻¹
2-Butanol	0.192	0.225	0.189	0.073	ND	mg L ⁻¹
1-Propanol	27.70	22.87	24.49	22.46	6.99	mg L ⁻¹
2-Metil-1-propanol	31.38	31.09	29.32	27.02	1.36	mg L ⁻¹
3-Metil-1-butanol	298.16	307.57	290.08	257.74	8.43	mg L ⁻¹
Acetato de etilo	15.03	130.57	26.24	7.89	1.78	mg L ⁻¹
Acetato de metilo	16.93	17.35	14.44	10.65	*ND	mg L ⁻¹
2-Feniletil alcohol	89.71	91.41	90.94	81.04	ND	mg L ⁻¹
1-Hexanol	3.020	3.562	3.244	2.921	ND	mg L ⁻¹
2-Hexanol	0.378	0.418	0.347	0.090	ND	mg L ⁻¹
1-Heptanol	0.333	0.371	0.314	0.261	ND	mg L ⁻¹
2-Heptanol	1.183	1.310	1.171	0.274	0.189	mg L ⁻¹
1-Octanol	ND	ND	0.285	ND	ND	mg L ⁻¹
2-Octanol	0.833	1.298	1.274	0.331	0.067	mg L ⁻¹
3,3-Dimetil-2-butanol	558.61	451.33	476.05	417.55	ND	µg L ⁻¹
1-Pentanol	228.41	261.43	234.15	127.58	124.35	µg L ⁻¹
2-Pentanol	446.46	357.34	377.87	329.29	349.99	µg L ⁻¹
Lactato de etilo	345.28	361.43	322.21	302.47	ND	µg L ⁻¹

Estos resultados son obtenidos de una sola replica. *ND= no detectado.

Con respecto a los alcoholes, se puede apreciar que la máxima concentración obtenida corresponde al metanol, particularmente con 432.52 mg L^{-1} , seguido de 3-metil-1-butanol (alcohol isoamílico) con 307.57 mg L^{-1} con la cepa de referencia K1-V1116, respectivamente. Y 2-metil-1-propanol con alrededor de 30 mg L^{-1} (436.4 , K1-V1116 y MM7, respectivamente). Estos últimos se forman por la desaminación y descarboxilación de aminoácidos y posee un aroma a malta o tostado en la sidra, (Xiao *et al.*, 2015). En contraste, el alcohol con menor concentración fue el 2-butanol con 0.225 mg L^{-1} con K1-V1116, mientras que el 1-butanol no aparenta tener cambios durante la fermentación manteniéndose alrededor de 6 mg L^{-1} , tanto en el mosto como en la sidra. Sin embargo concentraciones de alcoholes alifáticos por debajo de 300 mg L^{-1} agregan un nivel deseable de complejidad en la bebida tales como el vino. Las concentraciones totales de alcohol en el vino, pueden variar de 140 a 420 mg L^{-1} influenciado por el proceso tecnológico y la cepa de levadura (Tao *et al.*, 2008). Cuantitativamente los principales alcoholes superiores, establecidos en bebidas, principalmente en el vino, son isobutanol (9.2 mg L^{-1}), feniletil etanol (6.1 mg L^{-1}) y alcohol isoamílico (1.41 mg L^{-1}) (Belda *et al.*, 2017). Mientras que alcoholes con concentraciones superiores a 400 mg L^{-1} pueden tener un efecto perjudicial, mientras que a niveles óptimos imparten caracteres frutales agradables en bebidas como el vino (Xiao *et al.*, 2015). Por otra parte, los acetatos de metilo y etilo obtuvieron los mayores valores con la cepa K1-V1116 (17.35 mg L^{-1} y 130 mg L^{-1} , respectivamente). Mientras que en la variedad 'Golden Delicious' tanto el acetato de metilo y acetato de etilo fueron menores (13.67 mg L^{-1} y 28.54 mg L^{-1} , respectivamente), se sabe que esta cepa de referencia (K1-V1116), es una de las mayores productoras de aromas florales, por compuestos tales como los ésteres (acetato de isoamilo, acetato de hexilo, acetato de feniletilo) (Lallemand, 2019). Los cuales se sintetizan principalmente durante la fermentación mediante precursores enzimáticos de la fruta y por etanolisis del AcylCoA, que se forma durante la síntesis o degradación de ácidos grasos (Tufariello *et al.*, 2012). Sus concentraciones están influenciadas por la cepa de levadura, la fermentación, temperatura y contenido de azúcar. Tanto los ésteres como los acetatos tienen una importancia clave en el aroma aportando distintas

notas sensoriales: dulce afrutado o dulce balsámico (Tufariello *et al.*, 2012; Campbell-Sills *et al.*, 2016). Sin embargo, si están presentes en cantidades demasiado altas, pueden enmascarar los aromas varietales, por ejemplo se ha encontrado que pueden disminuir la complejidad del vino (los vinos que contienen más de 90 mg L⁻¹ de acetato de etilo o 200 mg L⁻¹ de ésteres totales se consideran defectuosos) (Belda *et al.*, 2017).

Finalmente, la cepa RY5 fue la que menor concentración de los compuestos volátiles obtuvo, tales como el metanol, 2-butanol, acetato de etilo y acetato de metilo obtuvo (40.44, 0.073, 7.89 y 10.65 mg L⁻¹, respectivamente). Si comparamos estos resultados con los obtenidos en el análisis sensorial en olor y aroma, presentó mejores calificaciones en variables como dulce, floral y fresco, esto puede ser gracias a que las bajas concentraciones de los alcoholes y ésteres hacen contribución positiva en la matriz básica de los sabores y aromas de la bebida (Belda *et al.*, 2017). También esas características pueden estar estrechamente relacionados con la presencia de compuestos como el 1-heptanol y 2-heptanol (0.274 y 0.261 mg L⁻¹, respectivamente) que al igual que los anteriores presentaron menor concentración en RY5 que en otros tratamientos. Por otra parte, el compuesto 1-octanol únicamente se encontró en la cepa MM7 y no detectado en los demás tratamientos (436.4, MM7 y K1-V1116) en esta variedad, compuesto normalmente encontrada en vinos, cervezas y bebidas espirituosas.

V. CONCLUSIONES

Selección de cepas para la primera fermentación

- La velocidad de fermentación de las cepas seleccionadas fue muy similar a la de la cepa comercial (K1-V1116) y superior a la obtenida por la microbiota nativa. Las cepas seleccionadas muestran una velocidad de fermentación comparable con la de la cepa comercial.
- Las características físicas y químicas de las sidras tranquilas elaboradas con las cepas seleccionadas fueron similares a las de la cepa de referencia y superior a la obtenida por la microbiota nativa, aunque obtuvieron menor AV, mostrando buena eficiencia fermentativa y alto grado alcohólico, superior a la NOM-199-SCFI-2017.

Selección de cepas en la segunda fermentación

- La variedad 'Red Delicious' incrementa más la presión que Golden, tras 30 días de fermentación en botella.
- El incremento en la presión es diferencial en función del tipo de levadura, siendo K1-V1116 quien genera mayor presión en 'Golden Delicious' y RY5 en 'Red Delicious'.
- Todas las sidras espumosas obtuvieron fermentaciones completas, clasificándose como sidras secas dentro de lo establecido por la NOM-199-SCFI-2017 ($\leq 10 \text{ g L}^{-1}$ de azúcar), siendo la sidra obtenida por la cepa comercial K1-V1116 la de menor contenido de azúcares residuales en ambas variedades.
- Se presenta un incremento en el grado alcohólico durante la toma de espuma de aproximadamente $2 \text{ }^\circ\text{GL}$ con respecto a la sidra de base.
- Los valores de ATT y AV fueron iguales para la variedad 'Red Delicious' entre levaduras mientras que para 'Golden Delicious' la mayor AV se obtuvo con la cepa comercial K1-V1116. Estos valores contrastan con los obtenidos por HPLC donde la cepa MM7 produjo la mayor AV, tanto en 'Golden Delicious' como en 'Red Deliciuos'.

- Las distintas cepas de levaduras mostraron comportamientos similares en la evolución de fructosa, glucosa, glicerol, ácido málico y sacarosa desde el mosto hasta la obtención de la sidra tranquila.

Análisis Sensorial

- En 'Golden Delicious' no se presentaron diferencias significativas en el aspecto visual entre cepas de levaduras, mientras que en aroma (en agitación), sobresalió K1-V1116 en "fresco". En el aspecto gustativo, la sidra espumosa elaborada con MM7 resultó ser la menos "amarga".
- En la variedad 'Red Delicious' destacó MM7 en "espalme", mientras que en olor (en reposo, a nivel "floral" y "fresco"), en calidad gustativa ("dulce"), destaca RY5.

Compuestos volátiles

- El análisis de compuestos volátiles permitió identificar compuestos tales como; acetato de metilo, metanol, 2-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-pentanol, 1-butanol, 3-metil-1-propanol, 1-pentanol, lactato de etilo y 2-feniletanol, en ambas variedades.
- Mientras que los compuestos que se encontraron como productos exclusivos de la fermentación para 'Golden Delicious' fueron; Acetato de etilo, acetato de metilo, 2-feniletanol, 2-hexanol y 1-heptanol. Destacando en su mayoría la cepa comercial K1-V1116, sin embargo, también las cepas seleccionadas generaron concentraciones importantes, aunque ligeramente menores a la cepa comercial.
- 'Red Delicious' generó los mismos compuestos que 'Golden Delicious' al finalizar la fermentación con excepción del 1-octanol, sin embargo en este caso la cepa RY5 destacó como la que menor concentración de los componentes volátiles obtuvo entre los diferentes tratamientos (K1-V1116, MM7 y 436.4).
- De manera general, se puede observar que 'Red Delicious' destacó por obtener mayor presencia de los compuestos volátiles respecto a 'Golden Delicious', lo que impacta en las características aromáticas de las sidras espumosas, así como su calidad sensorial.

Recomendaciones para futuros trabajos de investigación

- Respecto a los resultados obtenidos en el desarrollo del trabajo, las cepas seleccionadas (K1-V1116, RY5, MM7 y 436.4) se sugieren en las fermentaciones tanto de sidra tranquila como sidra espumosa, gracias a su potencial enológico. Sin embargo, es importante seguir evaluando de manera más puntual la cepa RY5 que permitan visualizar de mejor manera como está constituido su metabolismo en los procesos fermentativos.
- También es recomendable llevar a cabo análisis más detallados de los metabolitos involucrados (aminoácidos o minerales) que derivan en la producción de compuestos volátiles. Así como establecer mejores procedimientos de detección de estos metabolitos.
- Es altamente recomendable continuar con la utilización de estas cepas seleccionadas, pero ahora se sugiere el análisis de cultivos mixtos, que puedan potenciar la calidad del producto.
- Por otra parte, es importante trabajar con el desarrollo de una metodología que permita producir a mayor escala las cepas seleccionadas para fermentaciones más grandes, así como el estudio de la asociación con pequeños productores para la producción de sidras espumosas con las cepas obtenidas en la región de Querétaro.
- Una vez conocido más a detalle las características de las cepas, es importante empezar a trabajar con otros microorganismos que indirectamente intervienen en las fermentaciones, tales como las levaduras *n-Saccharomyces* y bacterias acidolácticas (BAL), que aún se desconoce la interacción de trabajar en conjunto con las cepas de la región.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- AAFC. (2013). Crop Profile for Apple in Canada, 2013. *Agriculture and Agri-Food Canada*. 1–9, pp: 32-56.
- AICV. (2017). *European Cider Trends 2017*. Recuperado el 10 de Mayo, a partir de: <http://aicv.org/file.handler?f=CiderTrends2014.pdf>
- AICV. (2019). *European Cider Trends 2018*. Recuperado el 31 agosto, 2019, a partir de: <https://aicv.org/en/publications>
- Alberti, A., Machado dos Santos, T. P., Ferreira Zielinski, A. A., Eleutério dos Santos, C. M., Braga, C. M., Demiate, I. M., & Nogueira, A. (2016). Impact on chemical profile in apple juice and cider made from unripe, ripe and senescent dessert varieties. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 436–443.
- Antón, M. J. (2015). *Influencia del origen y la tecnología de elaboración sobre el perfil aromático y olfatométrico de la sidra*. Universidad de Oviedo. Oviedo, España. 43-45, pp: 185-190.
- Arias-Abrodo, P., Díaz-Llorente, D., Junco-Corujedo, S., Dapena de la Fuente, E., Gutiérrez-Álvarez, M. D., & Blanco-Gomis, D. (2010). Characterisation of Asturian cider apples on the basis of their aromatic profile by high-speed gas chromatography and solid-phase microextraction. *Food Chemistry*, 121(4), 1312–1318.
- Arthey, D., & Ashurst, P. R. (1996). *Fruit Processing* (1ª Ed.) UK: Springer US. Recuperado el 31 de marzo, a partir de: https://books.google.com.mx/books?id=zuPiBwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Fruit+Processing&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjUu_GOtJ_bAhUOKKwKHUKiD20Q6AEIPDAD#v=onepage&q=Fruit Processing&f=false
- Ashebir, D., Deckers, T., Nyssen, J., Bihon, W., Tsegay, A., Tekie, H., Deckers, J. (2010). Growing apple (*Malus Domestica*) under tropical mountain climate conditions in northern Ethiopia. *Experimental Agriculture*, 46(1), 53–65.
- Balakrishnan, R., Park, J., Karra, K., Hitz, BC, Binkley, G., Hong, EL, et al. (2012) YeastMine: Un almacén de datos integrado para los datos de *Saccharomyces*

- cerevisiae* como un juego de herramientas multipropósito. Base de datos 2012: bar062
- Beech, F. W. (1972). Cider Making and Cider Research: a Review. *Journal of the Institute of Brewing*, 78(6), 477–491.
- Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A., & Moreno-Arribas, M. V. (2017). Microbial contribution to Wine aroma and its intended use for Wine quality improvement. *Molecules*, 22(2), 1–29.
- Berni, R., Cantini, C., Guarnieri, M., Nepi, M., Hausman, J.-F., Guerriero, G., Cai, G. (2019). Nutraceutical Characteristics of Ancient *Malus x domestica* Borkh. Fruits Recovered across Siena in Tuscany. *Medicines*, 6(1), 27.
- Bishop, L.R. 1975. Haze and foam forming substances in beer. *J. Institute Brewing*, 81 (6), 444- 449.
- Blanco-Gomis, D., & Mangas-Alonso, J. J. (2010). La manzana y la sidra: bioprocesos, *tecnologías de elaboración y control*. Asturias, España: Asturgraf. 224 p.
- Blouin, J. & Peynaud, É. (2003). *Enología práctica: conocimiento y elaboración del vino* (4th Ed.) España, pp: 119–121, a partir de: <https://books.google.com.mx/books?id=C-lkDmQUkxEC&pg=PA119&dq=anhidrido+sulfuroso+en+enologia&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjz04C0hMfkAhUCvKwKHbWQD0oQ6AEIPjAE#v=onepage&q=anhidrido sulfuroso en enologia&f=false>
- Boudreau, T. F., Peck, G. M., O’Keefe, S. F., & Stewart, A. C. (2018). Free amino nitrogen concentration correlates to total yeast assimilable nitrogen concentration in apple juice. *Food Science and Nutrition*, 6(1), 119–123.
- Braga, C. M., Zielinski, A. A. F., da Silva, K. M., de Souza, F. K. F., Pietrowski, G. d. A. M., Couto, M., Nogueira, A. (2013). Classification of juices and fermented beverages made from unripe, ripe and senescent apples based on the aromatic profile using chemometrics. *Food Chemistry*, 141(2), 967-974.
- Brice, C., Cubillos, F. A., Dequin, S., Camarasa, C., & Martínez, C. (2018). Adaptability of the *Saccharomyces cerevisiae* yeasts to wine fermentation

- conditions relies on their strong ability to consume nitrogen. *PLoS ONE*, 13(2), 1–20.
- Buxaderas, S., & López-Tamames, E. (2012). Sparkling Wines: Features and Trends from Tradition. *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 66), a partir de: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394597-6.00001-X>
- Cabranes, C., Mangas, J. J., & Blanco, D. (1996). Controlled production of cider by induction of alcoholic fermentation and malolactic conversion. *Journal of the Institute of Brewing*, 102(2), 103–109.
- Cárdenas-Hernández, J., & Fischer, G. (2013). Clasificación botánica y morfología de manzano, peral, duraznero y ciruelo. *Los frutales caducifolios en Colombia* (1ª Ed.). Colombia, Bogotá: Sociedad Colombiana de Ciencias Hortícolas, Bogotá. In D. Miranda, J. Cárdenas-Hernández, & G. Fischer (Eds.), pp: 21–29.
- Campbell-Sills H., Capozzi V., Romano A., Cappellin L., Spano G., Breniaux M., Lucas P., Biasioli F. Avances en el análisis del vino por PTR-ToF-MS: optimización del método y discriminación de vinos fermentados con diferentes iniciadores malolácticos. *En t. J. Mass. Spectrom.* 2016; 397–398: 42–51.
- CEE. (1990). Analyses des mousts et des vins. *Journal Officiel Des Communautés Européenne*, 2676(90), 52–57.
- Cedrón, T. (2004). *Estudio analítico de compuestos volátiles en vino. Caracterización quimiométrica de distintas denominaciones de origen.* Universidad de La Rioja, España.
- CFIA. (2014). The Biology of *Malus domestica* Borkh. (Apple). Recuperado el 10 de abril del 2018, a partir de: <http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/malus-domestica/eng/1404417088821/1404417158789?chap=3>
- Cilindre, C., Liger-Belair, G., Villaume, S., Jeandet, P., & Marchal, R. (2010). Foaming properties of various Champagne wines depending on several parameters: Grape variety, aging, protein and CO₂ content. *Analytica Chimica Acta*, 660(1–2), 164–170.

- Coque-Fuertes, M., Díaz-Hernández, B., & García-Rubio, J. C. (2012). *El cultivo del manzano. Variedades de sidra y mesa* (pp. 11–18). España: Mundi-Pren.
- A partir de: <https://books.google.com.mx/books?id=RW482tdgtVwC&pg=PA11&dq=fisiologia+del+manzano&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjLhfL9k-HaAhWpz4MKHaJiA6cQ6AEIKzAB#v=onepage&q=fisiologia+del+manzano&f=false>
- Cordente, A. G., Curtin, C. D., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2012). Flavour-active wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(3), 601–618.
- Cornille, A., Gladieux, P., Smulders, M. J. M., Roldán-Ruiz, I., Laurens, F., Le Cam, B., Giraud, T. (2012). New insight into the history of domesticated apple: Secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. *PLoS Genetics*, 8(5), 1–13.
- D.O.P Sidra de Asturias. (2017). Sidra de Asturias. Recuperado 18 de Marzo del 2018. A partir de: <http://www.sidradeasturias.es/>
- D.O.P Sidra de Asturias. (2018). Los consumidores apuestan por Asturias. Recuperado el 2 de septiembre del 2019, a partir de: <https://www.sidradeasturias.es/detalle.php?var=994>
- de Celis, M., Ruiz, J., Martín-Santamaría, M., Alonso, A., Marquina, D., Navascués, E., Santos, A. (2019). Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts associated to spontaneous and inoculated fermenting grapes from Spanish vineyards. *Letters in Applied Microbiology*, 68(6), 580–588.
- Dixon, J., & Hewett, E. W. (2000). Factors affecting apple aroma/flavour volatile concentration: A review. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28(3), 155–173.
- Dueñas, M., Irastorza, A., Munduate, A., Santos, J. I., Berregi, I., & Del Campo, G. (2002). Influence of enzymatic clarification with a pectin methylesterase on cider fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 108(2), 243–247.
- Dzialo, M. C., Park, R., Steensels, J., Lievens, B., & Verstrepen, K. J. (2017). Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(1), S95–S128.

- Eleutério dos Santos, C. M., Alberti, A., Moura Pietrowski, G. de A., Ferreira Zielinski, A. A., Wosiacki, G., Nogueira, A., & Matos Jorge, R. M. (2016). Supplementation of amino acids in apple must for the standardization of volatile compounds in ciders. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(2), 334–341.
- Faria-Oliveira, F., Puga, S., & Ferreir, C. (2013). Yeast: World's Finest Chef. In *Food Industry*, pp: 529–539, a partir de: <https://doi.org/10.5772/53156>
- Fernández-Montes, M. R., Parra-Quezada, R. A., Pérez-González, S., Vera-Morales, J. M., & Zacatenco-González, M. G. (2010). *Variedades de manzana recomendadas para las serranías de Hidalgo y Querétaro*. México.
- Ferrer, J. (2016). *Elaboración de vinos, otras bebidas alcohólicas, aguas, cafés e Infusiones* (1ª Ed). Madrid, España. Ediciones Paraninfo, S.A., a partir de: [https://books.google.com.mx/books?id=-7bgDQAAQBAJ&pg=PA88&dq=Pasos+para+la+elaboración+de+un+vino+e+espumoso,+mediante+el+método+“champenoise”&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiUnc-qgOTaAhUW8YMKHTUXBx0Q6AEIjzAA#v=onepage&q=Pasos para](https://books.google.com.mx/books?id=-7bgDQAAQBAJ&pg=PA88&dq=Pasos+para+la+elaboración+de+un+vino+e+espumoso,+mediante+el+método+“champenoise”&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiUnc-qgOTaAhUW8YMKHTUXBx0Q6AEIjzAA#v=onepage&q=Pasos+para)
- FIRCO. (2017). La manzana provee al ser humano de gran cantidad de vitaminas y otros nutrientes con efectos beneficiosos para la salud. Recuperado el 28 de abril del 2018, a partir de: <https://www.gob.mx/firco/articulos/manzana-fruto-ideal-para-consumir-a-cualquier-hora-del-dia?idiom=es>
- Flanzy, C. (2003). *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos* (2ª Ed.) Mundi-Prensa. Madrid, España, pp: 783-784.
- Flores-Lui, L. F., Calzada Rovirosa, J. E., Narváez Narváez, J. A., Aguilar Castillo, R., Romero Celis, M., & López Sánchez, M. (2017). *Agenda Técnica Agrícola Querétaro. Inifaq* (Vol. 5). Querétaro.
- Fuhrmann, E., & Grosch, W. (2002). Character impact odorants of the apple cultivars Elstar and Cox Orange. *Nahrung Food*, 46(3), 187–193.
- Girschik, L., Jones, J. E., Kerlake, F. L., Robertson, M., Dambergs, R. G., & Swarts, N. D. (2017). Apple variety and maturity profiling of base ciders using UV spectroscopy. *Food Chemistry*, 228, 323–329.

- Goold, H. D., Kroukamp, H., Williams, T. C., Paulsen, I. T., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2017). Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines. *Microbial Biotechnology*, 10(2), 264–278.
- Guerrero, R. F., & Cantos-Villar, E. (2015). Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Trends in Food Science and Technology*, 42(1), 27–43.
- Guevara, C. A., Arenas, H. A., Mejía, A., & Peláez, C. A. (2012). Obtención de etanol y biogás a partir de banano de rechazo. *Informacion Tecnologica*, 23(2), 19–30.
- Gutiérrez, M., Tudela, E., García, E., & López, L. (2016). El manzano de sidra: producción y transformación. Centro de Investigacion y Formacion Agrarias CIFA. Cantabria, España: 28-29 pp.
- Hancock, J.F., Luby, J. J., Brown, S. K., & Lobos, G. A. (2008). Apples. In: J. F. Hancock (Eds.), *Temperate Fruit Crop Breeding: Germplasm to Genomics*. Springer Science Business Media B.V., New York, NY, pp: 1-37.
- 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.
- Heikefelt, C. (2011). Chemical and sensory analyses of juice, cider and vinegar produced from different apple cultivars. *Department of Plant Breeding and Biotechnology*. Pp: 1-62. A partir de: http://innovativadrycker.slu.se/Centrum_for_innovativa_drycker/Dokumentation/heikefelt_c_110415.pdf
- Henrique, F., Grasel, S., Vescia, R., Ramos, S., & Flôres, M. (2019). Simultaneous determination of sulfur, nitrogen and ash for vegetable tannins using ATR-FTIR spectroscopy and multivariate regression. *Microchemical Journal*, 149 (2019), 103994.
- Herrero, M., Gonzalo, Á., & García, L. A. (2010). Tecnología de la producción de sidra. Equipamiento industrial. D. Blanco Gomis & J. J. Mangas Alonso (Eds.), *La manzana y la sidra: bioprocesos, tecnologías de elaboración y control*, (Pp: 2,14, 39, 51-52, 106-109, 160-161, 198). Asturias, España: Asturgraf. ISBN: 978-84-693-6631-8

- Hidalgo, T. (2011). *Tratado de enología*. Tomo 1 (2ª Ed.) Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España, pp 117-200.
- Hidalgo, T. (2002). *Tratado de Enología*. Tomo 2 (1ª Ed). Mundi-Prensa. Madrid, España: 258 p.
- Iaccarino, N., Varming, C., Agerlin Petersen, M., Viereck, N., Schütz, B., Toldam-Andersen, T. B., Balling Engelsen, S. (2019). Ancient Danish Apple Cultivars - A Comprehensive Metabolite and Sensory Profiling of Apple Juices. *Metabolites*, 9(7), 139.
- Lallemand, 2019. *Lallemandbrewing*. Recuperado el 25 de Octubre del 2019, a partir de: <https://www.lallemandbrewing.com/en/global/product-details/lalvin-icv-k1-v11116/>.
- Id, F. J. C., Guellec, R. Le, Schlüsselhuber, M., Dalmasso, M., Laplace, J., & Cretenet, M. (2017). Microorganisms in Fermented Apple Beverages: Current Knowledge and Future Directions. *Microorganisms*, 5(39), 1–22.
- Iaccarino, N., Varming, C., Agerlin Petersen, M., Viereck, N., Schütz, B., Toldam-Andersen, T. B., Balling Engelsen, S. (2019). Ancient Danish Apple Cultivars - A Comprehensive Metabolite and Sensory Profiling of Apple Juices. *Metabolites*, 9(7), 139.
- Jackson, J. E. (2003). *Biology of Apples and Pears*. 1ª Ed. New York: *cambridge university press*, pp: 487-488.
- Jansen, M. L. A., Bracher, J. M., Papapetridis, I., Verhoeven, M. D., de Bruijn, H., de Waal, P. P., Pronk, J. T. (2017). *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation. *FEMS Yeast Research*, 17(5), 1–20.
- Johansen, P. G., Owusu-Kwarteng, J., Parkouda, C., Padonou, S. W., & Jespersen, L. (2019). Occurrence and Importance of Yeasts in Indigenous Fermented Food and Beverages Produced in Sub-Saharan Africa. *Frontiers in Microbiology*, 10 (08).
- Juniper, B. E., Watkins, R., & Harris, S. A. (1998). The origin of the apple. *Acta Horticulturae*, 484, 27–33.

- Kanwar, S. S., & Keshani. (2016). Fermentation of apple juice with a selected yeast strain isolated from the fermented foods of himalayan regions and its organoleptic properties. *Frontiers in Microbiology*, 7(06), 1–6.
- Kemp, B., Alexandre, H., Robillard, B., & Marchal, R. (2015). Effect of production phase on bottle-fermented sparkling wine quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(1), 19–38.
- Kowallik, V., Miller, E., & Greig, D. (2015). The interaction of *Saccharomyces paradoxus* with its natural competitors on oak bark. *Molecular Ecology*, 24(7), 1596–1610.
- Le Quéré, J. M., Husson, F., Renard, C. M. G. C., & Primault, J. (2006). French cider characterization by sensory, technological and chemical evaluations. *LWT - Food Science and Technology*, 39(9), 1033–1044.
- Lea, A. G. H., & Arnold, G. M. (1978). The phenolics of ciders: Bitterness and astringency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29(5), 478–483.
- Lea, A. G. H., & Piggott, J. R. (2003). *Fermented Beverage Production* (2da Ed.). Springer US. New York. A partir de: [https://books.google.com.mx/books?id=0aWR3fuA7QIC&pg=PA86&lpg=PA86&dq=Lea,+1990+Bitterness+and+astringency:+the+procyanidins+of+fermented+apple+ciders.+En+\"Bitterness+in+Food+and+Beverage&source=bl&ots=qDUplfyi4x&sig=pCTVg4IKVUUYq9isKITn3N-uZ_4&hl](https://books.google.com.mx/books?id=0aWR3fuA7QIC&pg=PA86&lpg=PA86&dq=Lea,+1990+Bitterness+and+astringency:+the+procyanidins+of+fermented+apple+ciders.+En+\)
- León-Teutli, A. K., Hernández-Iturriaga, M., Aldrete-Tapia, J. A., Miranda-Castilleja, D. E., & Martínez-Peniche, R. (2019). Selección de levaduras nativas para la elaboración de sidras espumosas a partir de variedades de manzana establecidas en Querétaro, México. *Manuscrito entregado para publicación*, 1–24.
- León, A. K. (2019). *Selección de levaduras nativas a partir de variedades de manzana para la elaboración de sidras espumosas. Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Lilly, M., Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 744–753.

- Lobo, A. P., Tascón, N. F., Madrera, R. R., & Valles, B. S. (2005). Sensory and foaming properties of sparkling cider. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 10051–10056.
- Lorenzini, M., Simonato, B., Slaghenau, D., Ugliano, M., & Zapparoli, G. (2019). Assessment of yeasts for apple juice fermentation and production of cider volatile compounds. *LWT - Food Science and Technology*, 99(05), 224–230.
- Luo, Z., Walkey, C. J., Madilao, L. L., Measday, V., & Van Vuuren, H. J. J. (2013). Functional improvement of *Saccharomyces cerevisiae* to reduce volatile acidity in wine. *FEMS Yeast Research*, 13(5), 485–494.
- Mangas-Alonso, J. J. (1999). El nitrógeno en la sidra. Sidra y otros derivados. *Tecnología Agroalimentaria*, pp: 38–39. A partir de://www.serida.org/pdfs/2069.pdf
- Mangas, J. J., González, M. P., Rodríguez, R., & Blanco, D. (1996). Solid-Phase extraction and determination of trace aroma and flavour components in cider by GC-MS. *Chromatographia*, 42(1–2), 101–105.
- Marsit, S., & Dequin, S. (2015). Diversity and adaptive evolution of *Saccharomyces* wine yeast: a review. *FEMS Yeast Research*, 15(7), 1–12.
- Martínez, E. (2005). *Elaboración de Sidra. Elaboración artesanal de sidra natural*. Asturias, España. Pp: 1-30.
- 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. *SciELO*, 467(1), 71–78.
- Mendoza, S. N., Cañón, P. M., Contreras, Á., Ribbeck, M., & Agosín, E. (2017). Genome-scale reconstruction of the metabolic network in *Oenococcus oeni* to assess wine malolactic fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 8(03), 1–16.
- Miranda, D. E. (2013). *Selección de Levaduras Enológicas del Género Saccharomyces Nativas de Viñedos Establecidos en Querétaro*. Universidad Autónoma de Querétaro.

- Morán, J. (2014). *Evaluación de aptitudes agroindustriales de genotipos de manzana establecidos en la sierra de Querétaro*. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Muñoz, V., Beccaria, B., & Abreo, E. (2014). Simultaneous and successive inoculations of yeasts and lactic acid bacteria on the fermentation of an unsulfited Tannat grape must. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 59–66.
- Nardini, M., & Garaguso, I. (2018). Effect of sulfites on antioxidant activity, total polyphenols, and flavonoid measurements in white wine. *Foods*, 7(3).
- Norma Oficial Mexicana NOM 199-SCFI-2017, Bebidas alcohólicas-Denominación, 590 especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba.
- Núñez-Guerrero ME, Páez-Lerma JB, Rutiaga-Quiñones OM, González-Herrera SM, Soto-Cruz NO (2016). Rendimiento de mezclas de levaduras nativas *Saccharomyces* y no *Saccharomyces* durante la fermentación alcohólica del jugo de Agave duranguensis. *Microbiol alimentario*. 54, 91-97.
- OIV. (2016). Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts (vol. 2). Paris, Francia. A partir de: <http://www.oiv.int/public/medias/2628/compendium-bs-2014-en-file-complet-pdf.pdf>
- OIV. (2018a). Compendium of international Methods of Wine and must Analysis (No. 2). International Organisation of vine and wine, 2011. Volume I : 979-10-91799-65-2. Paris, Francia. A partir de: <https://doi.org/ISBN>
- Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V., & Silva, A. M. S. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44, 1115-1126.
- Pando, R. (2011). Selección de levaduras para la elaboración de sidras naturales espumosas por el método tradicional o “Champenoise” (y II). *Tecnología Agroalimentaria* (Vol. 10). A partir de: <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=4864>

- 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.
- Peng, B., Li, F., Cui, L., & Guo, Y. (2015). Effects of fermentation temperature on key aroma compounds and sensory properties of Apple Wine. *Journal of Food Science*, 80(12), S2937- S2943.
- Picinelli, A., Suárez, B., Moreno, J., Rodríguez, R., Caso-García, L. M., & Mangas, J. J. (2000). Chemical characterization of Asturian cider. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3997–4002.
- Piggott, J. R., Simpson, S. J., & Williams, S. A. R. (1998). Sensory analysis. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 33, 7–18.
- Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16(8), 675–729.
- Qin, Z., Petersen, M. A., & Bredie, W. L. P. (2018). Flavor profiling of apple ciders from the UK and Scandinavian region. *Food Research International*, 105 (12), 713–723.
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., & Lonvaud, A. (2006) (2nd Ed.). Handbook of enology: *The microbiology of wine and vinifications*, Vol. 1 Chichester: Wiley.
- Rodríguez-Madrera, R., Hevia, A. G., García, N. P., & Valles, B. S. (2008). Evolution of aroma compounds in sparkling ciders. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 2064–2069.
- Saerens SM, Delvaux FR, Verstrepen KJ & Thevelein JM. (2010). Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Biotechnol*, 3:165-177.
- SAGARPA. (2016). *Sidra tan natural como saludable*. Recuperado el 28 de abril del 2018, a partir de: <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/sidra-tan-natural-como-saludable>
- SAGARPA. (2017a). *Manzana: México produjo 716,930 toneladas en 2016*. Recuperado el 31 de marzo del 2018, a partir de:

- <https://www.gob.mx/siap/articulos/manzana-mexico-produjo-716-930-toneladas-en-2016?idiom=es>
- SAGARPA. (2017b). *Planeación Agrícola Nacional* (Vol. I). Recuperado el 31 de marzo del 2018, a partir de: <https://www.gob.mx/busqueda?utf8=√&site=siap&q=manzana>
- SAGARPA. (2017c). *Producción de manzana en México*. Recuperado el 31 de marzo del 2018, a partir de: <https://www.gob.mx/busqueda?utf8=√&site=siap&q=manzana>
- SAGARPA. (2018). *Atlas Agroalimentario 2012-2018*. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera., 1, 222. A partir de: <https://doi.org/10.1111/resp.12002>
- Salas-Salazar, N., & Olivas-Orozco, G. (2009). El Aroma de la manzana. *Interciencia*, 36(4), 271–365.
- Sandoval, R., Martínez, R., Hernández, M., Fernández, E., Arvizu, S., & Soto, L. (2011). Control biológico y químico contra control biológico y químico contra *Fusarium stilboides* en Pimiento morrón en poscosecha. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 17(2), 161–172.
- SEGOB. (2017). DOF - Diario Oficial de la Federación. Recuperado el 4 de febrero del 2019, a partir de: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5502882&fecha=30/10/2017
- SIAP. (2017). Manzana, fruto ideal para consumir a cualquier hora del día. Recuperado el 22 de abril del 2018, a partir de: <https://www.gob.mx/firco/articulos/manzana-fruto-ideal-para-consumir-a-cualquier-hora-del-dia?idiom=es>
- SIAP. (2018). Avance de Siembras y Cosechas Resumen. Recuperado el 6 de mayo del 2018, a partir de: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do
- SIAP, & SAGARPA. (2017). *Atlas Agroalimentario 2017*. México. Recuperado el 22 de abril del 2018, a partir de:

http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2017/Atlas-Agroalimentario-2017

- Soto-Herrera, J., Castillo-Castañeda, E., & Martínez-Peniche, R. A. (2008). Effect of Sugar Level on Effervescence Quality in Sparkling Cider By Image Processing. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(1), 33–40.
- Stanivuković, S., Žujić, M., Žabić, M., Mičić, N., Bosančić, B., & Durić, G. (2017). Characterization of old apple cultivars from Bosnia and Herzegovina by means of pomological and biochemical analysis. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 45(1), 97–104.
- Su, Y., Origone, A. C., Rodríguez, M. E., Querol, A., Guillamón, J. M., & Lopes, C. A. (2019). Fermentative behaviour and competition capacity of cryotolerant *Saccharomyces* species in different nitrogen conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 291(09), 111–120.
- Suárez, B., Pando, R., González, A., & Querol, A. (2007). A molecular genetic study of natural strains of *Saccharomyces* isolated from Asturian cider fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 778–786.
- Suárez-Valles, B., Pando-Bedriñana, R., Fernández-Tascón, N., González-García, A., & Rodríguez Madrera, R. (2005). Analytical differentiation of cider inoculated with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) isolated from Asturian (Spain) apple juice. *LWT - Food Science and Technology*, 38(5), 455–461.
- Suárez-Valles, B., Pando-Bedriñana, R., Lastra-Queipo, A., & Mangas-Alonso, J. J. (2008). Screening of cider yeasts for sparkling cider production (*Champenoise* method). *Food Microbiology*, 25(5), 690–697.
- Sukhvir, S., & Kocher, G. S. (2019). Development of apple wine from Golden Delicious cultivar using a local yeast isolate. *Journal of Food Science and Technology*, 56(6), 2959–2969.
- Swiegers JH and Pretorius IS. 2005. Yeast modulation of wine flavor. *Adv Appl Microbiol*, 57:131–175
- Tobergte, D. R., & Curtis, S. (2013). Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruits. *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53).

- USDA. (2018). *Full Report (All Nutrients) 09003, Apples, raw, with skin (Includes foods for USDA's Food Distribution Program)*. USA. Recuperado el 26 de agosto 2019, a partir de: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/301025?fgcd=&manu=&lfacet=&format=Full&count=&max=25&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=09003&ds=&qt=&qp=&qq=&qn=&q=&ing=>
- USDA. (2019). *Fresh Apples, Grapes, and Pears: World Markets and Trade*. Recuperado el 27 de Agosto del 2019, a partir de: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/fruit.pdf>
- Tao, Y.; Li, H.; Wang, H.; Zhang, L. Volatile compounds of young cabernet sauvignon red wine from Changli county (China). *J. Food Compos. Anal.* 2008, 21, 689–694.
- Valappil, Z. A., Fan, X., Zhang, H. Q., & Rouseff, R. L. (2009). Impact of thermal and nonthermal processing technologies on unfermented apple cider aroma volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(3), 924–929.
- Valles, B. S., Bedriñana, R. P., Tascón, N. F., Simón, A. Q., & Madrera, R. R. (2007). Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiology*, 24(1), 25–31.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., Viola, R. (2010). The genome of the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh). *Nature Genetics*, 42(10), 833–839.
- Venkatachalam, K., Techakanon, C., & Thitithanakul, S. (2018). Impact of the Ripening Stage of Wax Apples on Chemical Profiles of Juice and Cider. *ACS Omega*, 3(6), 6710–6718.
- Vidrih, R., & Hribar, J. (1999). Synthesis of higher alcohols during cider processing. *Food Chemistry*, 67(3), 287–294.
- Wang, J., Capone, D. L., Wilkinson, K. L., & Jeffery, D. W. (2016). Chemical and sensory profiles of rosé wines from Australia. *Food Chemistry*, 196, 682–693.
- Watts, B. M., Ylimaki, G. L., Jeffery, L. E., & Elías, L. G. (1992). *Métodos sensoriales básicos para la evaluación de alimentos* (1ª Ed). Canada. A partir de: <https://idl-bnc-idrc.dspacedirect.org/handle/10625/12666?show=full>

- Xiao, Z., Zhou, X., Niu, Y., Yu, D., Zhu, J., & Zhu, G. (2015). Optimization and application of headspace-solid-phase micro-extraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry for the determination of volatile compounds in cherry wines. *Journal of Chromatography B*, 978, 122-130.
- Xu, Y., Zhao, G. A., & Wang, L. P. (2006). Controlled formation of volatile components in cider making using a combination of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora valbyensis* yeast species. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 192–196.
- Yang, F., Zhi-Cheng, L., Wang, X., Li-Li, L., Lan, Y., Wen-Zhu, T., Xianzhen, L. (2015). Invertase Suc2-mediated inulin catabolism is regulated at the transcript level in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1–10.
- Yang, Y., Xia, Y., Lin, X., Wang, G., Zhang, H., Xiong, Z., Ai, L. (2018). Improvement of flavor profiles in Chinese rice wine by creating fermenting yeast with superior ethanol tolerance and fermentation activity. *Food Research International*, 36.
- Zuo, W., Zhang, T., Xu, H., Wang, C., Lu, M., & Chen, X. (2019). Effect of fermentation time on nutritional components of red-fleshed apple cider. *Food and Bioprocesses Processing*, 114, 276–285.

VII. ANEXOS

Anexo 7.1. Formato de Consentimiento Informado para Participantes de la Evaluación Sensorial.

“En el presente formato intenta explicar las cuestiones relativas que se efectuaron a los datos de cada participación en el análisis sensorial de sidras espumosas y así como la explicación para poder realizar el estudio”.

Información del análisis sensorial:

Desde 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 una bebida fermentada producida por microorganismos seleccionados naturalmente del fruto, que no resultan dañinos al ser humano. La bebida cumple con los requerimientos de inocuidad, de acuerdo a los análisis microbiológicos de calidad sanitaria que se efectuaron en el laboratorio para la evaluación y control de riesgos microbianos (LECRIMA) y no contiene aditivos perjudiciales a la salud

La presente investigación fue dirigida por; Dr. Ramón Álar Martínez Peniche (alvar@uaq.mx/ Ext.5574) y la alumna Gabriela Moguel Antonio (gmoguel29@alumnos.uaq.mx/ Tel.442-578-7790) con dirección; calle Miguel Hidalgo s/n Mz. 3 Lt. 56, colonia Colinas de Menchaca 2ª, Querétaro, Qro.

El Objetivo de esta investigación fue determinar la calidad y aceptabilidad sensorial del producto por un panel de jueces.

Declaración de consentimiento:

Si usted accede a participar en esta capacitación de Evaluación sensorial, se le pedirá participar en un entrenamiento de evaluación Sensorial que será impartido para estos fines, así como responder o completar encuestas. Esto tomará aproximadamente cinco semanas (dos días por semana) con una hora de su tiempo.

Se recomienda a los panelistas que eviten el uso de materiales que tengan olores fuertes, tales como jabones, lociones y perfumes, antes de participar en los paneles; asimismo, deberán abstenerse de comer, beber o fumar por lo menos 30 minutos antes del inicio de una prueba sensorial

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 Espumosa elaborada de forma tradicional, dicho producto se obtendrá bajo los procedimientos de la NOM-251-SSA1-2009 y NOM-142-SSA1/SCFI-2014, que garanticen la seguridad e inocuidad del mismos, destinado para pruebas sensoriales.

Acepto participar voluntariamente en este proyecto de investigación, conducido por; Dr. Ramón Álar Martínez Peniche (alvar@uaq.mx/ Ext.5574) y la alumna Gabriela Moguel Antonio (gmoguel29@alumnos.uaq.mx/ Tel.442-578-7790). He sido informado (a) del el objetivo de esta investigación es determinar la calidad y aceptabilidad sensorial del producto por el consumidor.

Me han indicado también que tendré que realizar un entrenamiento para la evaluación sensorial de la sidra espumosa y responder encuestas, lo cual tomará aproximadamente una hora.

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.

Nombre y firma del participante

Nombre y firma del responsable

ANEXO 7.2. Programa de Evaluación Sensorial.

La evaluación de la calidad sensorial de la sidra es una tarea compleja, que involucra factores, como el olor, el sabor, o su aspecto visual, y subjetivos como, la tipicidad, aquello que define a la sidra sobre su origen o modo particular de elaboración o de consumo (Antón-Díaz, 2015).

Siguiendo las etapas para el entrenamiento de Evaluación Sensorial, se propuso los siguientes puntos;

a) Evaluación

El objetivo del entrenamiento fue mejorar la habilidad individual para reconocer e identificar los atributos sensoriales, así como familiarizarse con la metodología del análisis sensorial, realizando pruebas y el uso de un vocabulario adecuado, con la finalidad de determinar la calidad y aceptabilidad del producto.

b) Selección de los participantes

La prueba sensorial requirió de jueces criterios: olfativo, gustativo, visual y aceptabilidad en general de la sidra espumosa; de acuerdo a estos atributos, en lo visual se evaluó parámetros del comportamiento en vaso como empalme, pegue, aguante, la olfativa (Olor y aroma) y en la fase gustativa, la calidad general de la bebida acuerdo con Qin *et al.* (2018) y Yang *et al.* (2018), elaborada en el Laboratorio de Fermentaciones y Fisiología de Poscosecha ubicado en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro; por lo cual se impartió un curso de entrenamiento avalado por; Dr. Ramón Álar Martínez Peniche (alvar@uaq.mx/ Ext.5574) y la alumna Gabriela Moguel Antonio (gmoguel29@alumnos.uaq.mx/ Tel.442-578-7790) de la Universidad Autónoma de Querétaro, dirección; Centro Universitario, Cerro de las Campanas s/n C.P. 76010. Santiago de Querétaro, Qro. México.

c) Reclutamiento de los panelistas

Se seleccionó 10 jueces pertenecientes a la Maestría Ciencia y Tecnología de Alimentos, así como estudiantes de licenciatura de la facultad de química en la institución. Para facilitar el reclutamiento de los miembros del panel, todos los candidatos llenaron un cuestionario indicando cuáles son sus preferencias, además de mencionar todo tipo de restricciones y alergias alimentarias que podrían padecer; esta información ayudó a seleccionar a los jueces para el curso (Figura 7.1.). Adicionalmente, la selección de participantes sólo se requirió conocer edad, sexo, disponibilidad para participar.

Aunado a ello se garantizó la seguridad de los panelistas, 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 algunos parásitos provenientes del suelo, equipos agrícolas y de procesamiento o fuentes humanas, pueda ocurrir o estar presentarse en el mosto de manzana. Se ha encontrado, que ácidos orgánicos, principalmente ácido málico ($\cong 5 \text{ g L}^{-1}$) 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 aminos biogénicas. Por lo que se realizó una vigilancia durante todo el proceso de sidra, a su vez se evaluó la calidad de la materia prima y al final del proceso de obtención de sidra espumosa se determinó la calidad microbiológica que garantizó la inocuidad del producto.

Por ende es importante mencionar, que si durante la evaluación se detectaba algún síntoma que pudiera requerir tratamiento médico, se podría acudir inmediatamente a la ambulancia de la Facultad de Derecho con el Sr. Araujo. y/o Informar al área de Coordinación de Seguridad e Higiene de La Facultad de Química con el Dr. Gustavo Guerrero Rodríguez (guerrerorodg@hotmail.com).

CUESTIONARIO PARA LA EVALUCIÓN SENSORIAL DE SIDRA ESPUMOSA

La información que se solicita será confidencial.

Fecha: _____

Apellidos: _____ Nombre: _____

Género: Mujer Hombre

Edad: Menos de 30 años 31 a 40 años 40 años en adelante

Teléfono: _____

Email: _____

Dirección: _____

Profesión: _____

Si Usted decide participar en el curso, es importante que considere la siguiente información.

DATOS PREVIOS SOBRE ANÁLISIS SENSORIAL

1. Señales su disponibilidad y frecuencia semanal para participar en la evaluación sensorial.

Tiempo: _____ Frecuencia: _____

2. Ha participado en una evaluación de cata.

No Sí

¿Qué alimentos ha evaluado? _____

3. Explique el interés de participar en la Evaluación Sensorial: _____

DATOS DE SALUD

4. Usted sigue alguna dieta especial: _____

5. Toma regularmente algún tipo de medicamento:

No Si

Especifique: _____

6. ¿Ha tenido o tiene problemas de salud (alergia, intolerancia o aversión) de algún alimento?

No Si

Especifique: _____

7. ¿Es usted fumador?

No Si

8. ¿es propenso a tener gripe o catarro?

No Si

9. ¿Tiene alguna enfermedad crónica?

No Si

Especifique: _____

10. ¿Le gustan las bebidas alcohólicas como el vino y Sidra?

No Si

Observaciones: _____

Figura 7.1. Datos de información sobre la participación de jueces

d) Orientación de los panelista

Todos los jueces fueron invitados al área de evaluación sensorial, para que se pudiera explicar la importancia de las pruebas sensoriales, enseñarles las instalaciones físicas del laboratorio y responder a preguntas que pudieran surgir. Se recomendó a los panelistas que evitaran el uso de materiales que generaran olores fuertes, tales como jabones, lociones y perfumes, antes de participar; asimismo, abstenerse beber o fumar por lo menos 30 minutos antes del inicio de una prueba sensorial (Watts *et al.*, 1992)

e) Selección de panelistas

Los jueces fueron sometidos a pruebas, para determinar su agudeza sensorial normal. En la que se les pidió que identificaran sabores básicos y olores comunes presentes en la sidra espumosa, tomando como referencia Qin *et al.* (2018) (Tabla 7.1). Donde se evaluó la sensibilidad de los jueces, es decir su capacidad para discriminar diferentes grados de una característica sensorial específica mediante evaluaciones sensoriales.

Tabla 7.1. Sabores básicos de los alimentos

Atributos	Composiciones de referencia
Olor	
Floral	12 mL de jugo de flor de saúco/rosas
Manzana fresca	1 cm ² piezas de manzana fresca picada, 5 mL de jugo de manzana
Manzana cocida	2 cm ² trozos de manzana madura picada en agua hirviendo durante 5 minutos
Agrio	Jugo de 5 mL y cáscara pequeña de toronja fresca y limón
Frutal	1 cm ² pieza de plátano fresco
Fruta tropical	2 cm ² pieza de piña fresca picada y melón
Dulce	5 g de miel y 2 g de caramelo
Fruta seca	3 g de ciruela picada y 3 g de higo picado
Perfume	Muestra de una fragancia.
Especiado	Pizca de pimienta negra molida
Mohoso	Tomar como referencia el sótano o bodega
Ahumado	Té Rooibos o liptón 0.25 g
Terroso	5 g de tierra fresca y 5 g de champiñones frescos picados
Láctico	10 mL de leche ácida comercial
Borras	2 cm ² piezas de levadura comercial/sidra embotellada con lías
Químico	10 µL de acetato de etilo
Gusto	
Dulce	30 g de sacarosa en 1 L de agua
Ácido	15 mL de vinagre de manzana en 60 mL de agua
Amargo	0.15 g de sulfato de quinina en 1 L de agua
Astringente	0.8 g L ⁻¹ de ácido tánico en agua
Sensación en boca	
Astringente	Sulfato de aluminio, 0.2 % p v ⁻¹
Alcohólico	3 mL de etanol al 95 %

(Qin *et al.*, 2018)

Posteriormente, se efectuaron sesiones de una hora (aproximadamente cinco semanas), donde al final de cada entrenamiento, al final del entrenamiento para el sensorial se aplicaba una encuesta de evaluación de la calidad de la sidra espumosa, usando como base sidras comerciales, muy similares al producto que se pretendía evaluar.

f) Análisis de los datos:

Para evaluar los resultados, se utilizan análisis estadísticos (Friedman). Los datos de los jueces fueron analizados para identificar variaciones significativas entre las muestras. De acuerdo a la importancia del análisis sensorial para evaluar la calidad de la sidra espumosa, se usó una prueba hedónica no estructurada, usada ampliamente utilizado en numerosos estudios sensoriales con vinos, así facilitar la interpretación y presentación de los resultados (Piggott *et al.*, 1998).

ANEXO 7.3. Ficha de Prueba Sensorial Para Sidra Espumosa

Nombre: _____

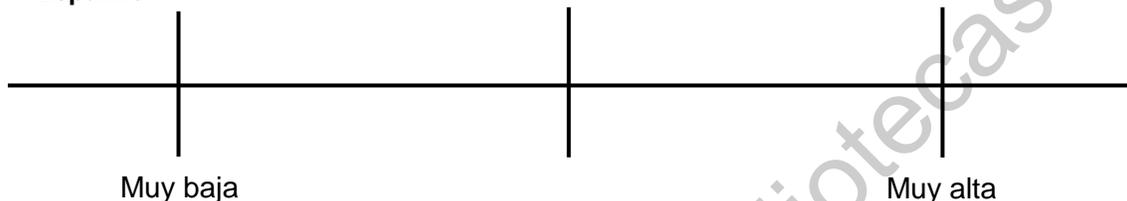
Fecha: _____

Muestra N°: _____

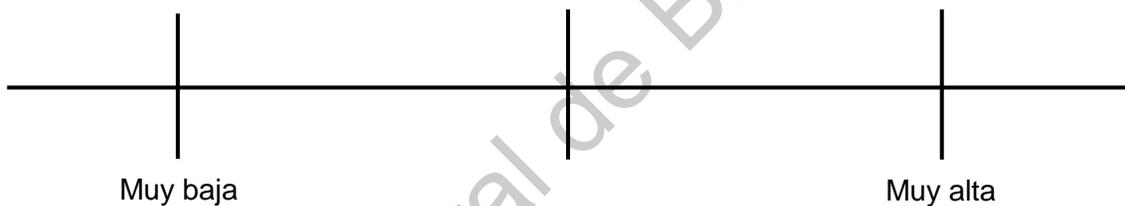
Instrucciones: Frente a usted hay una muestra de sidra, de la cual usted deberá evaluar su calidad visual, de acuerdo a cada uno de los atributos mencionados. Marcar con una (X) sobre la línea horizontal el nivel que considere de su mayor grado.

Calidad Visual

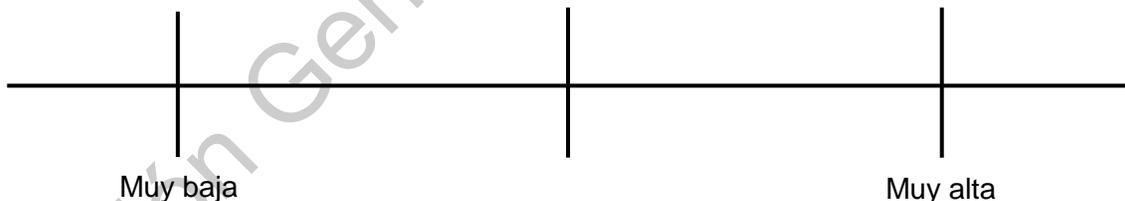
Espalme



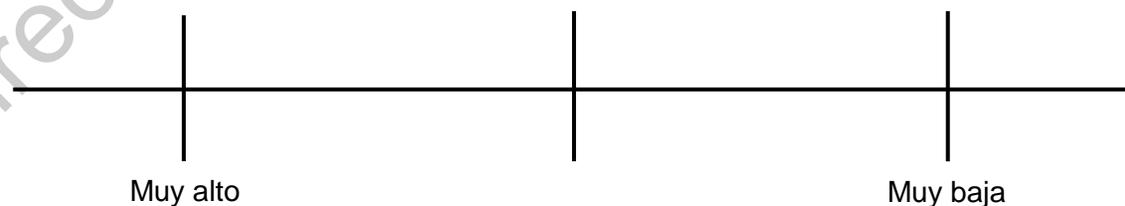
Pegue



Aguante



Sedimentos



FICHA DE PRUEBA SENSORIAL PARA SIDRA ESPUMOSA

Nombre: _____

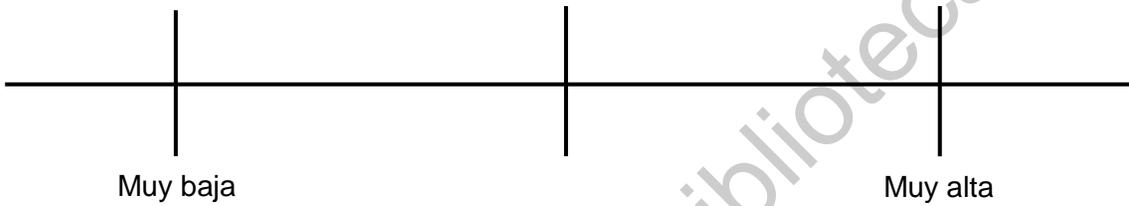
Fecha: _____

Muestra N°: _____

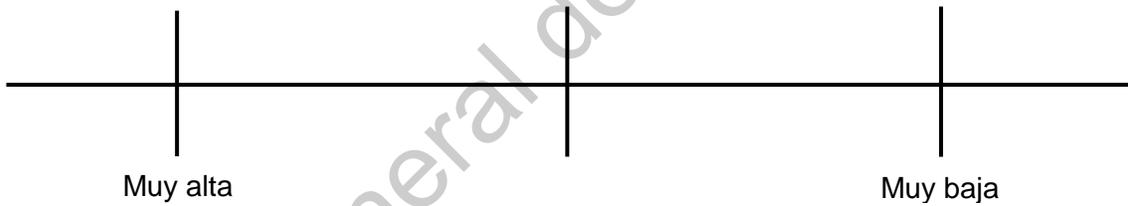
Instrucciones: Frente a usted hay una muestra de sidra, de la cual usted deberá evaluar su Olor, de acuerdo a cada uno de los atributos mencionados. Marcar con una (I) sobre la línea horizontal el nivel que considere de su mayor grado.

Olor
(Copa en reposo)

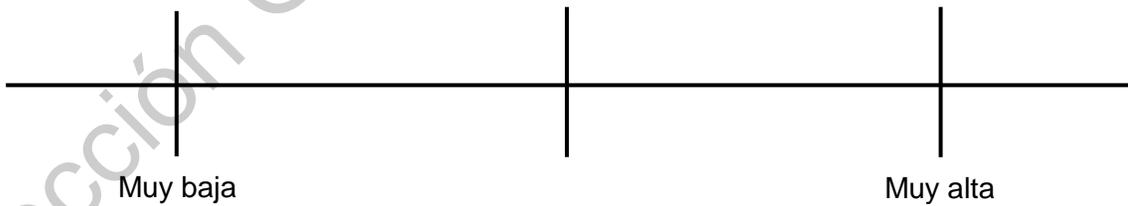
Intensidad



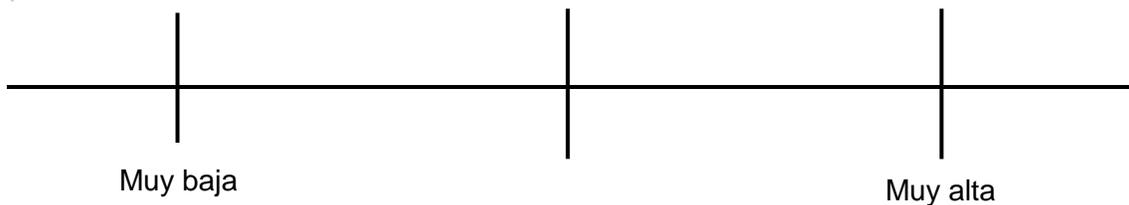
Vinagre/acético



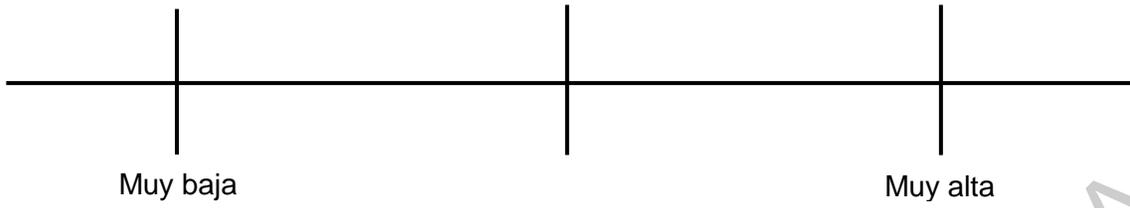
Frutal



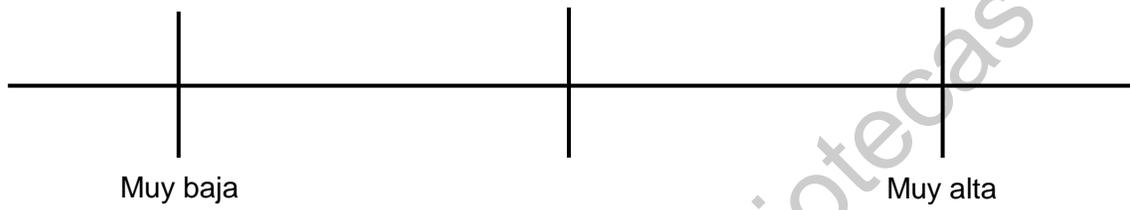
Floral



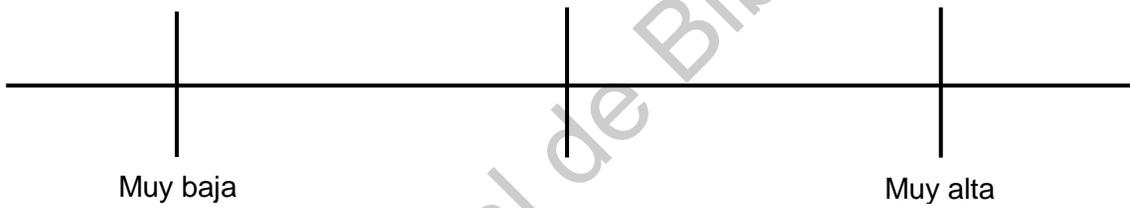
Dulce



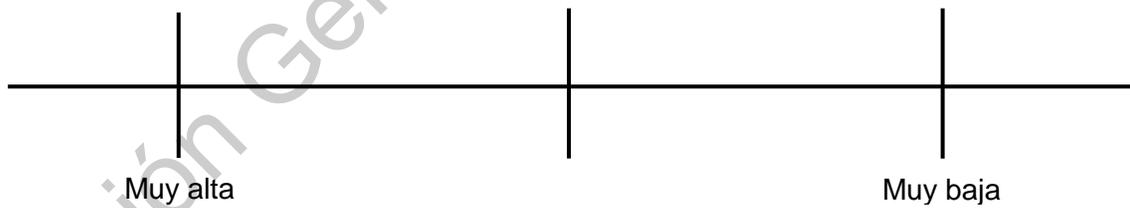
Lácteo



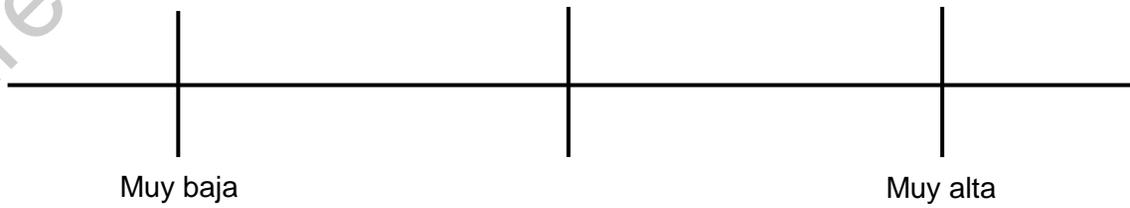
Especies



Sulfhídrico



Fresco



FICHA DE PRUEBA SENSORIAL PARA SIDRA ESPUMOSA

Nombre:

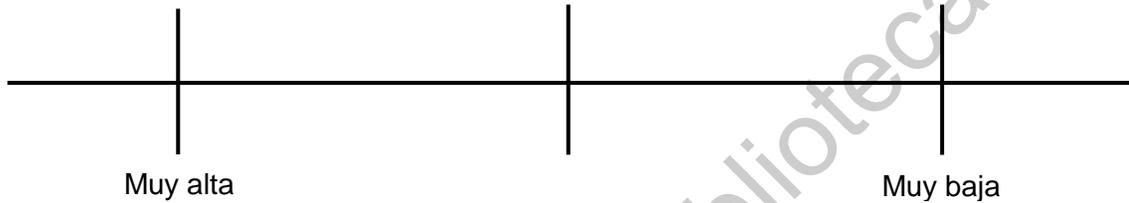
Fecha:

Muestra N°:

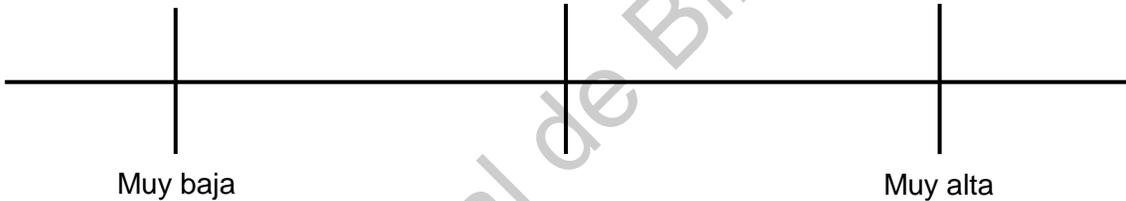
Instrucciones: Frente a usted hay una muestra de sidra, de la cual usted deberá evaluar su calidad de aroma, de acuerdo a cada uno de los atributos mencionados. Marcar con una (I) sobre la línea horizontal el nivel que considere de su mayor grado.

Aroma
Calidad de aroma

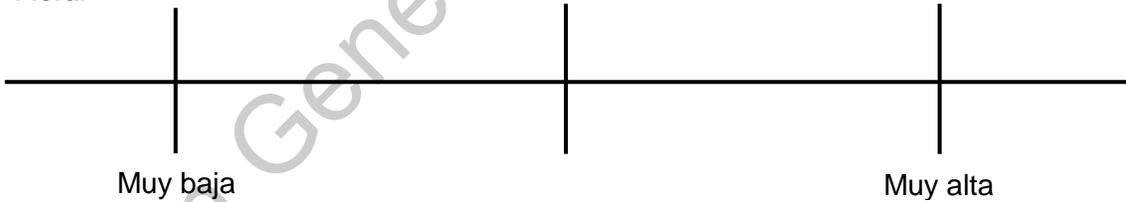
Vinagre/acético



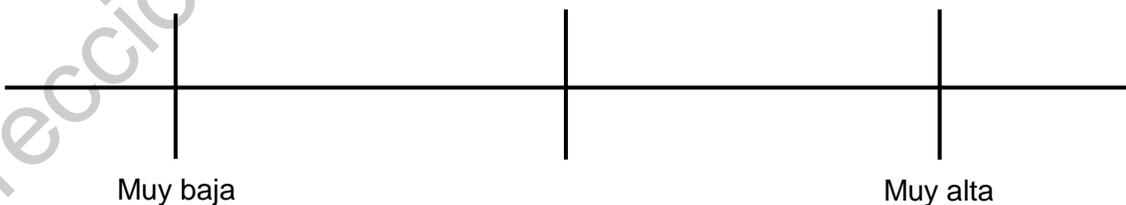
Frutal



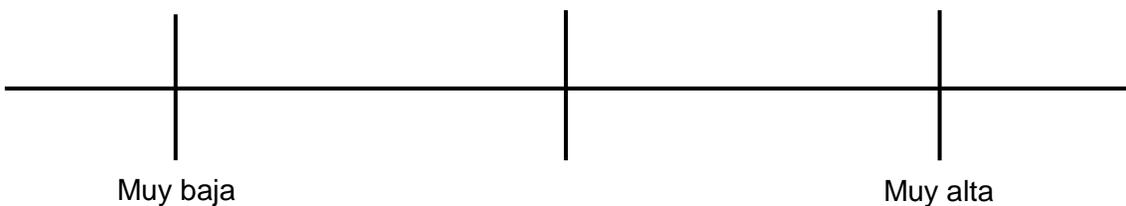
Floral



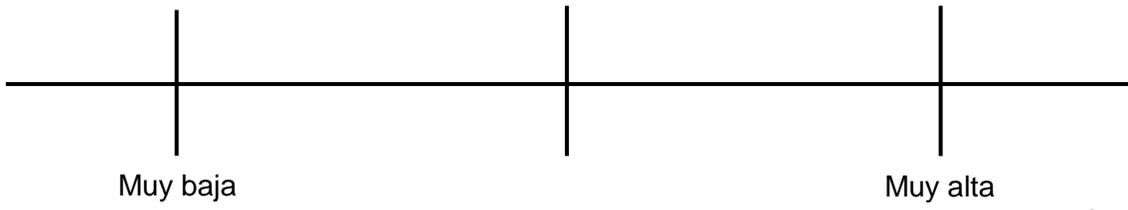
Dulce



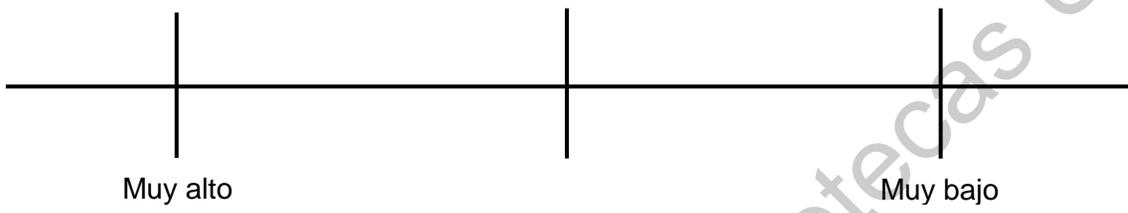
Lácteo



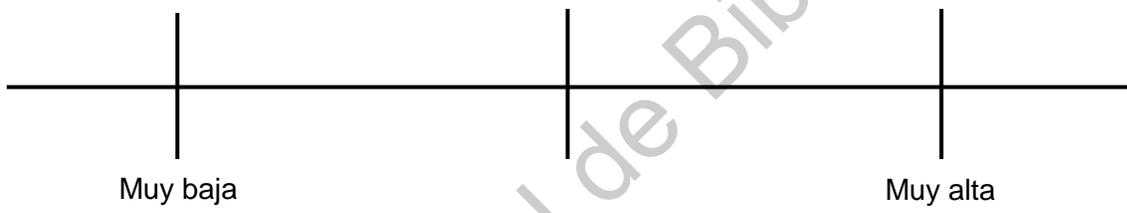
Especies



Sulfhídrico



Fresco



Dirección General de Bibliotecas UAQ

FICHA DE PRUEBA SENSORIAL PARA SIDRA ESPUMOSA

Nombre:

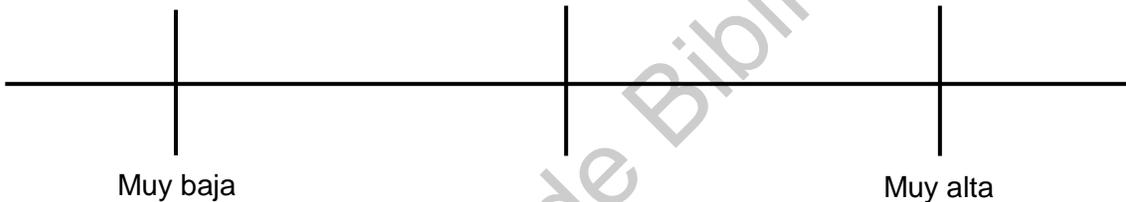
Fecha:

Muestra N°:

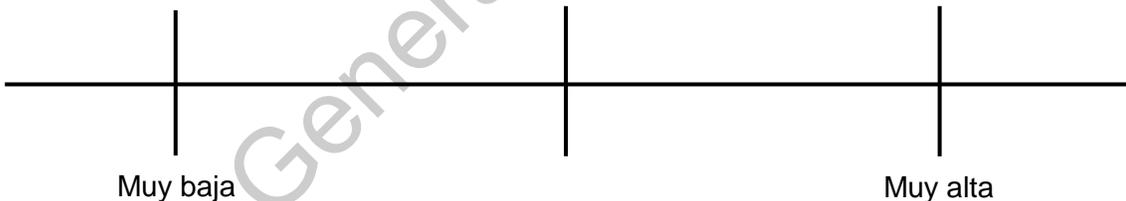
Instrucciones: Frente a usted hay una muestra de sidra, de la cual usted deberá evaluar su calidad de sabor, de acuerdo a cada uno de los atributos mencionados. Marcar con una (I) sobre la línea horizontal el nivel que considere de su mayor grado. Se recuerda al evaluador que debe enjuagarse la boca con agua después de evaluar la muestra y dejar transcurrir entre 10-15 segundos antes de probar la siguiente muestra.

Sensación y sabor en la boca
Calidad de sabor

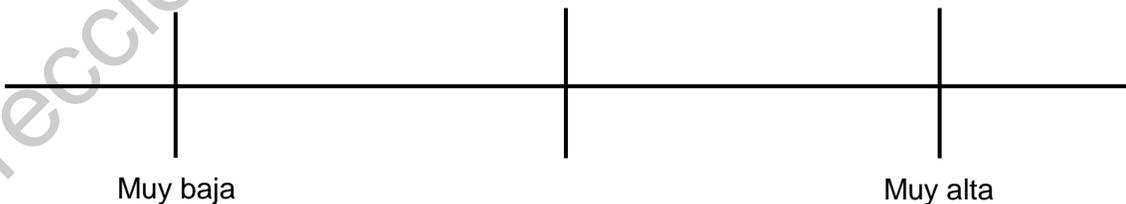
Dulce



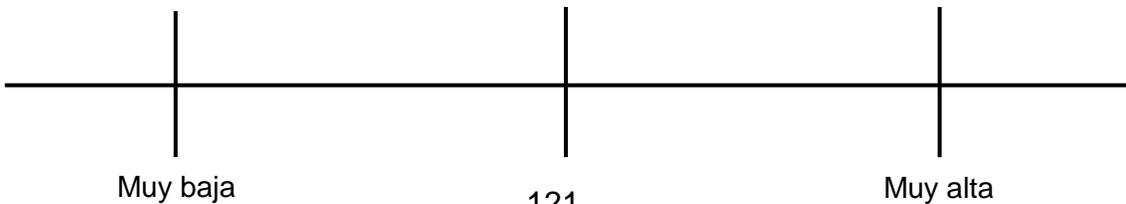
Ácido



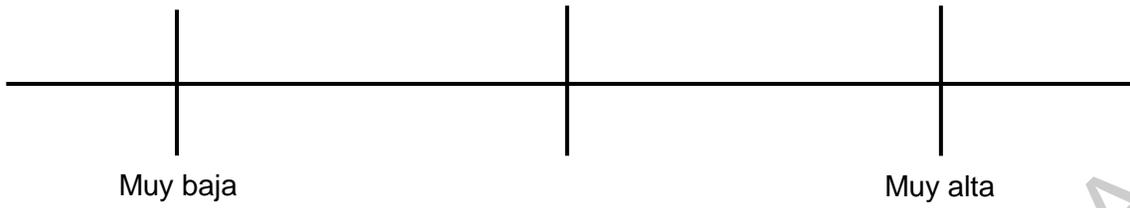
Amargo



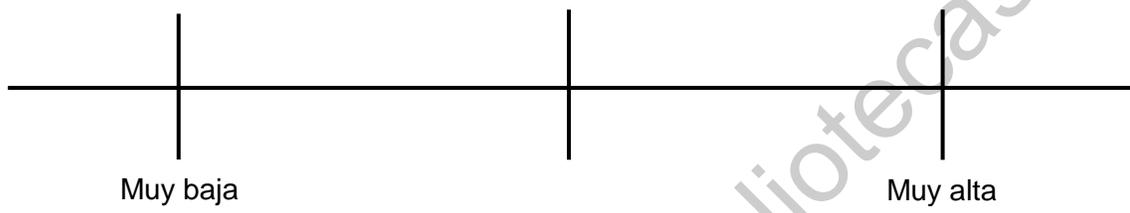
Astringente



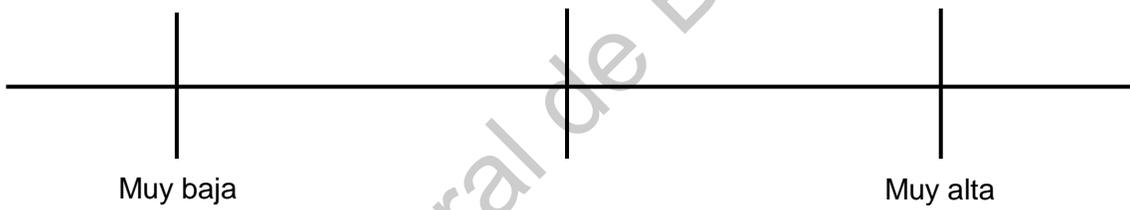
Espumoso



Persistencia posgusto



Calidad posgusto



Dirección General de Bibliotecas UAQ