



PRINCIPADO DE ASTURIAS

CONSEJERIA DE MEDIO RURAL  
Y PESCA

***INFLUENCIA DE LA FLORA  
MICROBIOLÓGICA EN LOS  
COMPONENTES DE LA SIDRA NATURAL  
ASTURIANA***

**SERIE  
TÉCNICA  
Nº. 6 / 93**

Instituto de Experimentación y  
Promoción Agraria.



**INFLUENCIA DE LA FLORA  
MICROBIOLÓGICA EN LOS  
COMPONENTES DE LA SIDRA NATURAL  
ASTURIANA**

*Comunicación presentada al IX Congreso Nacional de Química  
Agrícola y Alimentaria -3, Sevilla (España), 26 al 29 de Septiembre  
de 1993.*

**AUTORES:**

CARMEN CABRANES BENDUERO  
JUAN JOSÉ MANGAS ALONSO  
DOMINGO BLANCO GOMIS

**SERIE  
TÉCNICA  
Nº. 6 / 93**

**PROGRAMA DE SIDRAS Y OTROS DERIVADOS**

**INSTITUTO DE EXPERIMENTACIÓN Y PROMOCION AGRARIA**



# INFLUENCIA DE LA FLORA MICROBIOLÓGICA EN LOS COMPONENTES DE LA SIDRA NATURAL ASTURIANA.

Carmen Cabranes Benduero<sup>1</sup>, Juan José Mangas Alonso<sup>1</sup> y Domingo Blanco Gomis<sup>2</sup>.

## RESUMEN

El principal agente en la elaboración de sidra asturiana es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, aunque es necesario señalar que *Kloeckera apiculata* se encuentra siempre presente en nuestros mostos. Se realizó la caracterización bioquímica a 12 y 18°C de siete cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y tres de *Kloeckera apiculata*: el acetato de etilo, metanol, propanol, isobutanol, butanol, alcohol amílico e isoamílico fueron determinados en los mostos y en los productos fermentados. *Kloeckera apiculata* produjo las cantidades más elevadas de acetato de etilo y las más bajas de butanol, alcohol amílico e isoamílico.

## INTRODUCCION

Indudablemente, la proporción y distribución de las distintas especies de levaduras no es gratuito para el proceso fermentativo, ni para la calidad del producto fermentado. Las fermentaciones espontáneas realizadas actualmente en mosto de manzana dan como resultado un producto de características variables, no sólo entre los distintos elaboradores, sino incluso en campañas sucesivas de un mismo productor. La alternativa debe de ir encaminada hacia fermentaciones dirigidas con cultivos puros, práctica que comienza a tener eco en la fermentación del mosto de uva (Barre y Vezinhet, 1984). Mediante la experiencia obtenida a través de la práctica de algunos lagareros, se ha comprobado que las levaduras secas seleccionadas y comercializadas para la producción de vinos no son adecuadas para mosto de manzana, pues producen aromas propios de los primeros que resultan desagradables para la sidra natural.

Existen numerosos trabajos sobre caracterización bioquímica de levaduras, en lo que se refiere a la fracción no volátil (Barcenilla, 1989) y a la volátil, tanto en vinos (Reed y col. 1988; Whiting, 1975) como en sidras. La especificidad y variabilidad que se desprende de estos trabajos, en cuanto a la producción de compuestos volátiles por parte de las levaduras, justifican un estudio detenido de las cepas aisladas de sidra natural en Asturias.

En esta influencia hay que tener en cuenta tanto el papel de las levaduras dominantes en el proceso fermentativo, es decir, las distintas especies de *Saccharomyces cerevisiae*, como las de las levaduras de carácter débilmente fermentativo o incluso oxidativo.

De este grupo de levaduras de carácter, en principio, indeseable desde el punto de vista de la fermentación alcohólica hay que destacar por su elevadísima frecuencia de aislamiento a la especie *Kloeckera apiculata*. Esta levadura es señalada por las diversas publicaciones desde totalmente nociva, hasta elevadamente recomendable, fundamentalmente en cuanto a la producción de compuestos volátiles, (Mafart, 1986 y Peynaud, 1965).

---

<sup>1</sup> Instituto de Experimentación y Promoción Agraria. Villaviciosa

<sup>2</sup> Dpto. Química Física y Analítica. Universidad de Oviedo

Así mismo, no se deben perder de vista sus interacciones con la levadura fermentativa *Saccharomyces cerevisiae* (Owuama y col., 1989). En algunos trabajos, (Herraiz y col., 1990) se apunta que *Kloeckera apiculata* tiene un efecto retardante sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.

## MATERIAL Y METODOS

El diseño experimental de la caracterización bioquímica de cepas de la primera y segunda fase es el que se describe en la figura 1.

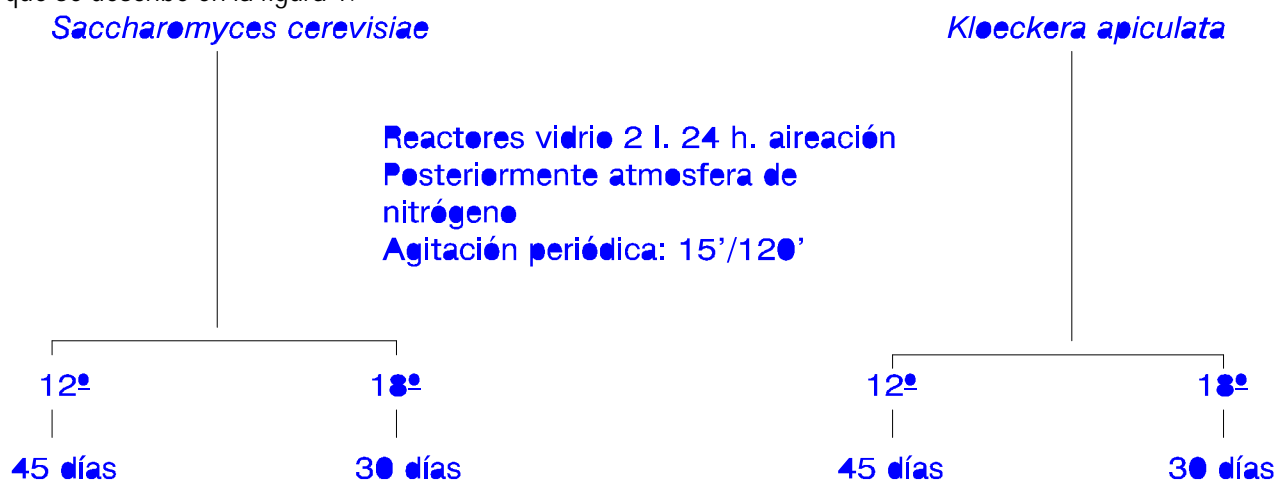


Figura 1. Caracterización bioquímica de levaduras de la primera y segunda fase.

El mosto empleado corresponde a la mezcla acidulada tradicional en Asturias.

**Filtración del mosto:** La esterilización del mosto se realizó mediante filtración tangencial microporosa a través de un poro de 0.33  $\mu\text{m}$  sobre membrana de polietersulfona y filtración esterilizante a través de 0.22  $\mu\text{m}$  sobre membrana de fluoruro de polivilideno.

**Condiciones de los fermentadores:** Reactores de vidrio de 2l de capacidad con entrada y salida de gases, toma de muestra en condiciones asépticas, sonda de temperatura y guía de agitación. Todo el conjunto se autoclavó durante 15 minutos a 121°C. El llenado se realizó en cámara de flujo laminar. La agitación se programó en periodos de 15 minutos cada dos horas a 350 rpm.

**Condiciones de los inóculos:** Las cepas a ensayar se crecieron durante 24 horas a 28°C, hasta alcanzar una densidad celular de 107 cels/ml. Se adicionaron 20 ml de cultivo a los 2000 ml de mosto estéril. Durante las primeras 24 horas se permitió la proliferación de las células en el fermentador en presencia de oxígeno, suministrando posteriormente condiciones de anaerobiosis mediante un flujo continuo de nitrógeno.

**Determinación de volátiles mayoritarios:** Se realizó utilizando un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer mod. 8500 con una cámara de inyección provista de un inserto de vidrio «glass liner», donde se llevó a cabo la vaporización de la muestra, y un detector de ionización de llama (FID); la señal detectada, después de su amplificación, se recogió en un registrador mod. GP-100. El equipo lleva acoplado un automuestreador AS-8300 con capacidad para cien muestras. Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica (pureza mínima del 99%) y el agua empleada fue ultrapura de calidad Mili-Q.

Los patrones se prepararon disolviendo los reactivos en una solución hidroalcohólica al 6%, porcentaje alcohólico aproximado al esperado en la sidra. La disolución resultante presentó una concentración de cada uno de los analitos que, manteniéndose dentro del rango lineal determinado, arqueará la concentración estimada en las muestras reales.

La muestra, previamente a su determinación analítica, se desgasificó en un baño de ultrasonidos y se filtró a través de filtros de membrana Durapore (di-fluoruro de polivinilideno, PVDF) de 0,45 µm.

Teniendo en cuenta las variables cromatográficas que influyen notablemente en la separación de los analitos en cromatografía en fase gaseosa, se procedió a la optimización del tipo de columna y temperatura de trabajo a fin de resolver y cuantificar de un modo adecuado los volátiles mayoritarios de bajo punto de ebullición. A la vista de los resultados obtenidos, las condiciones cromatográficas propuestas para efectuar la separación de los compuestos volátiles mayoritarios de bajo punto de ebullición son las siguientes:

- Gas portador: He a P=85 psi y un flujo de 16 ml/min.
- T inyector: 170(C).
- T detector: 170(C).
- F H<sub>2</sub>: 30 ml/min.
- F aire: 300 ml/min.
- V inyección: 1 µl.
- T horno: 70(C).
- Carbowax 300 + bis-2-etil-hexil-sebacato (92:8) (5m x 0.85mm d.i.) rellena sobre Volaspher A-2 al 4% desilanzado (120-140 µm).

Para realizar el estudio de recuperaciones en muestras reales se utilizó el método del patrón interno con el objeto de corregir las fluctuaciones que se producen en la señal obtenida de las diferentes inyecciones. El patrón interno elegido fue el 4-metil-2-pentanol.

## RESULTADOS

Con el objeto de poder analizar las diferencias obtenidas entre cepas en el consumo y producción de los distintos parámetros bioquímicos considerados, así como la influencia de la temperatura, se realizó un análisis de varianza y posteriormente se aplicó el Test de Duncan para observar los agrupamientos producidos en los diferentes casos.

### Análisis de los compuestos volátiles

Este grupo de compuestos es posiblemente uno de los más interesantes en cuanto a las propiedades organolépticas del producto que son perceptibles a través de las pruebas de cata. En el presente trabajo, el estudio se limita al análisis de los volátiles mayoritarios (Tablas 1 y 2), posponiéndose el de los componentes minoritarios por limitaciones técnicas y no por ser considerados de importancia menor.

**Tabla 1. Caracterización bioquímica de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* previamente aisladas, identificadas y pre caracterizadas en el IEPA de Villaviciosa. Análisis de volátiles mayoritarios.**

Cepa	°C	Acetato (ppm)		Metanol (ppm)		Propanol (ppm)	
		x	s	x	s	x	s
C27419	12	83,73	4,67	107,47	5,62	204,82	137,38
	18	74,93	3,06	105,60	3,48	136,78	2,70
C27520	12	75,02	2,28	96,89	2,22	117,75	7,03
	18	78,36	4,76	105,75	5,44	147,50	8,73
F235	12	65,31	1,59	102,95	1,80	205,05	33,53
	18	66,67	1,24	96,15	11,03	119,47	19,71
F486	12	66,38	2,69	105,23	4,12	73,88	63,49
	18	69,37	3,18	105,48	2,62	93,94	85,34
M267	12	68,84	3,05	112,83	3,71	175,47	34,33
	18	68,90	4,38	101,47	8,17	149,61	23,39
M468	12	104,97	22,34	99,52	10,99	135,48	12,66
	18	76,91	5,58	124,65	11,24	182,56	12,74
T279	12	65,67	3,02	105,97	2,52	126,93	82,28
	18	69,97	3,53	106,85	6,37	136,29	1,86
MOSTO		0,00		29,21		0,85	

Cepa	°C	l-Butanol (ppm)		Butanol (ppm)		Amílico (ppm)		l-Amílico (ppm)	
		x	s	x	s	x	s	x	s
C27419	12	171,11	165,79	37,55	32,32	44,41	11,36	157,19	21,28
	18	72,08	20,02	19,86	0,44	43,62	3,03	152,27	5,14
C27520	12	74,61	16,98	18,14	0,16	36,55	1,12	131,27	2,01
	18	91,41	27,46	25,94	4,85	42,57	3,40	168,23	10,44
F235	12	58,85	8,43	20,22	0,23	51,12	0,86	146,18	1,25
	18	36,74	3,56	18,51	2,48	42,07	8,16	157,72	29,92
F486	12	60,76	13,38	20,43	0,67	42,55	1,55	131,18	9,22
	18	61,06	5,48	20,73	0,61	46,87	1,90	176,79	9,48
M267	12	94,06	0,35	20,18	1,30	48,42	8,97	187,13	31,06
	18	67,28	14,23	19,59	1,38	44,34	6,07	135,66	15,61
M468	12	89,71	8,91	19,26	2,18	45,36	5,82	158,37	18,13
	18	74,04	6,87	22,84	1,09	53,36	3,98	225,24	16,55
T279	12	66,14	3,90	20,14	1,04	47,83	5,74	141,12	10,64
	18	50,05	4,59	20,93	0,67	54,83	6,70	142,79	23,14
MOSTO		0,00		18,96		15,35		10,67	

Tabla 2. Caracterización bioquímica de cepas de *Kloeckera apiculata* previamente aisladas, identificadas y pre caracterizadas en el IEPA. Análisis de compuestos volátiles.



Cepa	°C	Acetato (ppm)		Metanol (ppm)		Propanol (ppm)	
		x	s	x	s	x	s
C0223K	12	295,64	167,22	89,28	2,57	132,22	7,18
	18	315,02	95,66	112,25	13,40	136,48	40,13
C0424K	12	339,76	105,88	102,92	6,08	127,77	23,28
	18	301,85	80,45	116,60	2,95	151,49	28,63
C0721K	12	214,04	67,43	61,79	2,81	135,45	15,75
	18	322,51	87,97	100,86	6,75	135,07	21,56
MOSTO		0,00		29,21		0,85	

Cepa	°C	lButanol (ppm)		Butanol (ppm)		Amílico (ppm)		lAmílico (ppm)	
		x	s	x	s	x	s	x	s
C0223K	18	59,63	16,42	16,93	0,61	19,78	1,34	55,22	5,99
	18	56,89	4,48	19,50	1,71	23,12	2,57	59,63	5,94
C0424K	18	51,59	9,73	19,46	1,40	19,88	0,99	48,37	2,73
	18	45,96	14,16	20,12	0,34	24,23	1,56	58,95	7,01
C0721K	18	73,04	47,83	16,03	6,17	18,92	3,35	82,52	20,04
	18	58,65	21,23	19,36	0,61	26,50	1,44	86,59	6,88
MOSTO		0,00		18,96		15,35		10,67	

El análisis de varianza, efectuado sobre los resultados de los diferentes ensayos de fermentación realizados por triplicado, muestra los siguientes resultados.

**La concentración de acetato de etilo** presente en los distintos productos fermentados resultado de las fermentaciones puras con distintas cepas de *Saccharomyces* se ve afectada de forma significativa por la cepa considerada en el estudio ( $P=0.0001$ ) con un grado de significación elevado, por el contrario la temperatura a la que transcurrió la fermentación no tuvo un grado de significación estadísticamente aceptable sobre la cantidad de acetato producida por las cepas. La concentración de acetato es considerablemente mayor en los productos fermentados exclusivamente con cepas de *Kloeckera apiculata*, lo cual desvía sin duda los resultados del análisis estadístico realizado. En la observación hecha de los agrupamientos producidos mediante la aplicación del test de Duncan, se observa de forma muy clara como las tres cepas ensayadas de *Kloeckera apiculata* se agrupan como las mayores productoras de acetato con notable diferencia frente a todas las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* empleadas en las fermentaciones controladas, que no muestran diferencias significativas entre sí y se agrupan dentro de un mismo bloque.

El papel de *Kloeckera apiculata* en las fermentaciones espontáneas es especialmente controvertido y los resultados obtenidos en fermentaciones puras hacen que al menos respecto al parámetro en estudio sea difícil justificar su presencia, ya que la elevada propensión que muestran a la producción de acetato resulta altamente inconveniente desde un punto de vista tecnológico.

**La concentración de metanol** se vio afectada de forma significativa tanto por el tipo de cepa empleado en la fermentación ( $P=0.0001$ ) como por la temperatura a la que transcurre la misma ( $P=0.0001$ ), así como por la interacción entre ambos factores ( $P=0.0001$ ). Al contrario de lo que ocurría para el acetato no aparecen diferencias apreciables entre la producción de este compuesto por parte de las cepas de *Saccharomyces* y las de *Kloeckera*. En el estudio de los agrupamientos entre cepas hay que señalar que aunque el tratamiento estadístico muestra la aparición de cuatro grupos distintos, existen solapamientos importantes entre los mismos apareciendo la mayor parte de las cepas con carácter mixto a caballo entre dos de ellos. Únicamente los extremos más opuestos en cuanto a la producción de este compuesto, se desvelan con identidad suficiente como para considerarlos desligados en cuanto a su comportamiento del de el resto de las cepas, de este modo la cepa M468 destaca por su mayor capacidad para la producción de metanol, y la cepa CO721K como la menos propensa a la producción del mismo.

**La producción de propanol** se muestra totalmente independiente del tipo de cepa inoculada en los reactores y de la temperatura a la que transcurrió la fermentación. Los valores obtenidos en los productos fermentados de todos los ensayos y todas las repeticiones muestran valores muy similares en cuanto a sus concentraciones finales. Por estas razones, y de forma obvia, el estudio de agrupamientos no muestra diferencias concluyentes que sea necesario comentar.

**La concentración de isobutanol** está, al contrario de lo que ocurría con la de propanol, claramente influida por el tipo de cepa empleado en la fermentación ( $P=0.0001$ ) y por la temperatura a la que transcurrió la misma ( $P=0.0048$ ). Igualmente significativa resultó la interacción entre las dos variables consideradas ( $P=0.0604$ ).

En el estudio de los agrupamientos producidos tras la aplicación del test de Duncan, se observa que las cepas C27419, C27520, M468 y M267, todas ellas pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, presentan un comportamiento homogéneo situándose a la cabecera de la producción de isobutanol frente al resto de las cepas ensayadas, que se agrupan en un segundo bloque de producción significativamente inferior al anterior.

**La concentración de butanol** es en todos los ensayos la más baja de todos los compuestos volátiles analizados, el análisis de varianza realizado pone de manifiesto que los resultados se ven afectados tanto por la cepa que lleve a cabo la fermentación ( $P=0.0254$ ) como por la temperatura a la que ésta transcurra ( $P=0.0065$ ) Igualmente refleja un grado de significación estadísticamente aceptable la interacción de ambos factores ( $P=0.0072$ ).

La cepa C27419 de *Saccharomyces cerevisiae* es la que demostró mayor capacidad para la producción de butanol, mientras que la cepa CO721K de *Kloeckera apiculata* aparece en el extremo opuesto con la capacidad más pequeña para liberar en el medio butanol, al menos en fermentaciones en pureza con esta cepa.

Las tres cepas ensayadas de *Kloeckera apiculata* junto con la cepa F235 de *Saccharomyces cerevisiae* forman el grupo de producción menos elevado de butanol, mostrando el resto de las cepas ensayadas un comportamiento intermedio entre el de aquellas y el de la cepa C27419.

**Las concentraciones medias de alcohol amílico** son ligeramente superiores a las de butanol y al igual que ocurría con éste su producción se ve afectada de forma significativa por la cepa que lleva a cabo la fermentación ( $P=0.0001$ ) y por la temperatura a la que transcurre la misma ( $P=0.0605$ ), así como por la interacción entre ambos factores ( $P=0.0941$ ).

La cepa T279 de *Saccharomyces cerevisiae* mostró la mayor propensión a la producción de alcohol amílico, por el contrario las tres cepas ensayadas de la especie *Kloeckera apiculata* se agrupan produciendo concentraciones significativamente menores del compuesto en estudio.

**En las concentraciones de alcohol isoamílico** existen diferencias considerables, apreciables incluso con un primer vistazo a la tabla de resultados, entre las producidas por las cepas ensayadas de *Kloeckera* y las de *Saccharomyces*. Estos resultados tienen como primera consecuencia inmediata un elevado grado de significación para el efecto cepa sobre el resultado de las fermentaciones ( $P=0.0001$ ). Por otro lado la producción de este alcohol parece ser también fuertemente afectada por la temperatura a la que transcurre la fermentación ( $P=0.0001$ ), siendo igualmente fuerte la interacción de ambos factores ( $P=0.0001$ ).

El resultado del test de Duncan agrupa de forma clara a la cepas de *Kloeckera apiculata* como las menos productoras de alcohol isoamílico, oponiéndose respecto a este carácter a la cepa M468 de *Saccharomyces cerevisiae* que presentó la mayor capacidad para la formación de este compuesto. Entre el grupo de las levaduras apiculadas se observa que CO721K forma un subagrupamiento con una producción de isoamílico ligeramente superior al de las otras dos cepas de *Kloeckera*, aunque significativamente inferior al de la menos productora de *Saccharomyces*. Por otro lado, se observa la formación de otro grupo comprendiendo al resto de las levaduras ensayadas de esta especie con producciones elevadas del alcohol aunque significativamente inferiores a las de M468.

Tal y como comentábamos anteriormente, la concentración de alcohol isoamílico es del orden de dos a tres veces inferior en *Kloeckera apiculata* que en *Saccharomyces*, estos resultados frente a los igualmente llamativos obtenidos en torno a la producción de acetato, ponen de manifiesto las elevadas diferencias, en cuanto a propiedades organolépticas, que puede presentar la sidra natural en ausencia/presencia de esta levadura de primera fase que se ha manifestado como cuantitativamente importante en los primeros momentos de aislamiento en nuestra región.

En los resultados obtenidos se desvela que únicamente la producción de propanol es independiente de la cepa empleada, no apareciendo diferencias considerables ni siquiera entre las especies *Kloeckera* y *Saccharomyces*.

En cuanto a la temperatura a la que transcurrió la fermentación, no influyó de forma significativa ni sobre la producción de propanol ni sobre la de acetato, lo cual quiere decir que si lo hizo de forma significativa sobre el resto de los compuestos volátiles analizados, y con ellos sobre las propiedades aromáticas y gustativas del producto obtenido, siendo la producción de metanol y de alcohol isoamílico claramente más elevada a 18o que 12o C.

## BIBLIOGRAFIA

BARCENILLA, J.; ESTRELLA, C.; GOMEZ-CORDOVES, T. Y HERNANDEZ, L. (1989). «The influence of yeasts on certain non-volatile componentes of wine». Food Chemistry. 31 177-187

BARRE, P. Y VEZINHET, F. (1984). «Evolution towards fermentation with pure culture yeast in wine making». Microbiological Sciences. 1 (7) 159-163.

HERRAIZ, T.; REGLERO, G.; HERRAIZ, M.; MARTIN-ALVAREZ, P. J. Y CABEZUDO, M. D. (1989). «The influence of yeast strain and type of culture on the volatile composition of wines fermented without sulfur dioxide». Am. J. Enol. Vitic. 41 (4) 313-318.

LEGUERINEL, I.; CLERET, J.J.; BOURGEOIS, C. MAFART, P. (1988) «Yeast strain and the formation of flavour components in cider». J. Inst. Brew. 96 391-395.

MAFART, P. (1986). «The influence de la flore de fermentation sur la flaveur des cidres et selection des souches». 17 (4) 33-37.

OWUAMA, C. I. Y SAUNDERS, J. R. (1990). «Physiological variants of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* from palm wine ans cashew juice». J. Appl. Bacteriology 68 491-494.

PEYNAUD, E. (1956) «Sur la formation d'acetate d'ethyle par les levures de vin. Industr. Alim. Agr. 73 253-257.

POLLARD, A.; KIESER, H. Y BEECH, F. W. (1966). «Factors influencing the flavour: the effect of fermentation treatment on fusel oil production. J. Appl. Bact. 29 (2) 253-259.

REED, G. Y NAGODA, T. W. (1988). «Technology of yeast usage in winemaking». Am. J. Enol. Vitic. 39 (1) 83-90.

WHITING, G. C. (1976). «Organic acid metabolism of yeast during formation of alcoholic beverages». J. Inst. Brew. 82 84-89.





PRINCIPADO DE ASTURIAS

CONSEJERIA DE MEDIO RURAL  
Y PESCA

**Instituto de Experimentación y Promoción Agraria**  
*Programa de Difusión y Transferencia de Tecnología Agraria*

Aptdo. 13 – 33300 Villaviciosa – Asturias (España)

Telf. 985890066 – Fax: 985891854

Email: [seridavilla@serida.org](mailto:seridavilla@serida.org)