

AGL 2001-0713. Elaboración y caracterización de sidras espumosas de calidad. Optimización de tecnologías en cubas cerradas con microorganismos seleccionados

Investigador responsable Organismo

Dr. Juan José Mangas Alonso SERIDA

Equipo investigador

Belén Suárez Valles	SERIDA
Dra. Anna Picinelli Lobo	"
Dr. Roberto Rodríguez Madrera	"
Javier Moreno Fernández	"
Noemí Palacios García	Becaria ⁽¹⁾
Rosa Pando Bedriñana	Becaria ⁽²⁾
Yoana Expósito Cimadevilla	U. Oviedo
Sara Junco Corujedo	"

Entidades colaboradoras

⁽¹⁾ Valle, Ballina y Fernández S.A.

⁽²⁾ Ilmo. Ayuntamiento de Villaviciosa

Objetivos

- Elaboración de sidras espumosas con segunda fermentación en botella.
- Caracterización microbiológica y química de las sidras espumosas.

Resultados

Elaboración de sidras espumosas con segunda fermentación en botella

A finales del año 2001 se "mayaron" en las instalaciones de la bodega colaboradora 30 Tm de manzana asturiana de sidra. Las manzanas, una vez lavadas y molidas, se maceraron a tem-

peratura controlada (7-10 °C) en un macerador dinámico de 40 Tm de carga total durante 12 horas, realizándose ciclos de removido cada 2 horas. El mosto yema se trasegó a un depósito (temperatura de almacenamiento: 10 °C) para ser mezclado posteriormente con el mosto prensa. A continuación, la masa de molienda se bombeó a dos prensas Bucher (ciclos de prensado de dos horas), obteniéndose mosto prensa con un rendimiento del 72 %. El mosto (20.000 litros) se fermentó en un único depósito de acero inoxidable a 14 °C.

La fermentación alcohólica y maloláctica se realizaron de manera espontánea por la flora natural del mosto de manzana. Cuando la concentración de azúcares llegó a 13 g/l, se trasegó la sidra y se añadieron 40 mg/l de anhídrido sulfuroso. En estas condiciones, la sidra siguió evolucionando en el tonel hasta que se consideró óptima (sidra base) para iniciar la segunda fermentación en botella.

Dos mil litros de sidra base fueron microfiltrados a través de un filtro tangencial cerámico de 0,22 µm. A partir de este momento se dobló el experimento, utilizando para la obtención de sidras de segunda fermentación dos levaduras seleccionadas de diferentes orígenes. Por una parte, mil litros de sidra microfiltrada fueron inoculados con una levadura seleccionada perteneciente a la colección del SERIDA (*Saccharomyces cerevisiae*, var. *uva-rum*), y otros mil litros de sidra, también microfiltrada, fueron inoculados con una levadura vínica seca activa, LEVULINE CHP (*Saccharomyces cerevisiae*, var. *bayanus*), recomendada para la elaboración de vinos espumosos. Como paso previo a la inoculación, se edulcoró la sidra base con 18 g/l de sacarosa y se añadió un complejo nutritivo (96% de sulfato amónico



más 0,7% de tiamina) al 5% y bentonita como coadyuvante de clarificación al 3%.

Seguidamente, se trasvasó la sidra base a botellas champaneras de 0,75 l y 1,50 l (magnum) de capacidad. La segunda fermentación en la botella finalizó al cabo de 21 días. A partir de este momento se realizó, con periodicidad trimestral, el removido de lías en pupitre seguido del degüelle por el método tradicional "champenoise".

A lo largo de todo el proceso de fermentación, toma de espuma y crianza en botella se realizaron muestreos periódicos que nos permitieron seguir la evolución tanto de los microorganismos como de la composición química.

Caracterización microbiológica y química de las sidras espumosas

Identificación genética de la microflora natural

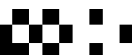
Se hicieron recuentos de levaduras (totales, oxidativas, fermentativas) así como de bacterias lácticas y acéticas utilizando la técnica de las diluciones seriadas en medios selectivos. Paralelamente, se procedió al aislamiento de mil cepas de levaduras y de cuatrocientas de bacterias lácticas, eligiendo para ello 50 colonias por placa (muestreo) que contuviera entre 30 y 300 colonias, para su posterior caracterización genética.

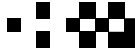
Tabla 1.- Especies de levaduras identificadas mediante RFLP

Muestreo	Especies identificadas
Mosto inicial Densidad 1048 g/l	84% <i>Hanseniaspora valbyensis</i> 16% <i>Metschnikowia pulcherrima</i>
Mosto al inicio de la fermentación Densidad 1044 g/l	84% <i>Candida parapsilisis</i> 14% <i>Hanseniaspora valbyensis</i> 2% <i>Pichia guillermondii</i>
Mosto en fermentación tumultuosa Densidad 1030 g/l	62% <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 38% <i>Saccharomyces bayanus</i>
Mosto en fermentación Densidad 1019 g/l	72% <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 16% <i>Saccharomyces bayanus</i> 12% <i>Hanseniaspora valbyensis</i>
Sidra base Densidad 1001 g/l	96% <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2% <i>Saccharomyces bayanus</i>

La identificación de la flora levaduriforme se realizó mediante el método RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) de la zona 5.8s-ITS del rDNA. Las especies identificadas se recogen en la tabla 1.

Como se puede observar, las especies existentes en el mosto fueron levaduras del tipo oxidativo. Éstas fueron perdiendo preponderancia a medida que transcurrió la fermentación, siendo desplazadas por levaduras del





género *Saccharomyces* que se implantaron y condujeron finalmente la fermentación alcohólica.

Análisis químico

Durante todo el período de elaboración de la sidra base y de la segunda fermentación en botella se analizaron los parámetros globales (densidad, acidez total y volátil, presión, etc.), ácidos mayoritarios, azúcares, polialcoholes, volátiles mayoritarios, polifenoles de baja masa molecular y polisacáridos neutros y ácidos.

En la figura 1, se recoge la evolución de los componentes mayoritarios del mosto (fructosa y ácido málico) y la síntesis de nuevos analitos (glicerina y ácidos láctico, acético y succínico) a lo largo de la transformación del mosto en sidra base.

Como se muestra en la figura 1, al cabo de 3 meses se había consumido el 87% de los azúcares fermentables, mientras que la transformación maloláctica tuvo lugar durante la primera fase de la fermentación alcohólica.

Por otra parte, se procedió a la puesta a punto de un método para el análisis y cuantificación de aminoácidos en mosto de manzana y sidra. Para ello, se eligió la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC). Los aminoácidos primarios son derivatizados con o-ftaldialdehído y ácido 3-mercaptopropiónico (OPA/3-MPA) previamente a la inyección y separados en una columna de fase inversa C18 Spherisorb ODS-2 (250 x 4,6 mm; 5 µm). La elución se realiza en la modalidad de gradiente con acetato sódico y metanol como fase móvil y la detección se efectúa a 338 nm. El método optimado permite la separación de 23 aminoácidos primarios en 35 minutos (Figura 2).

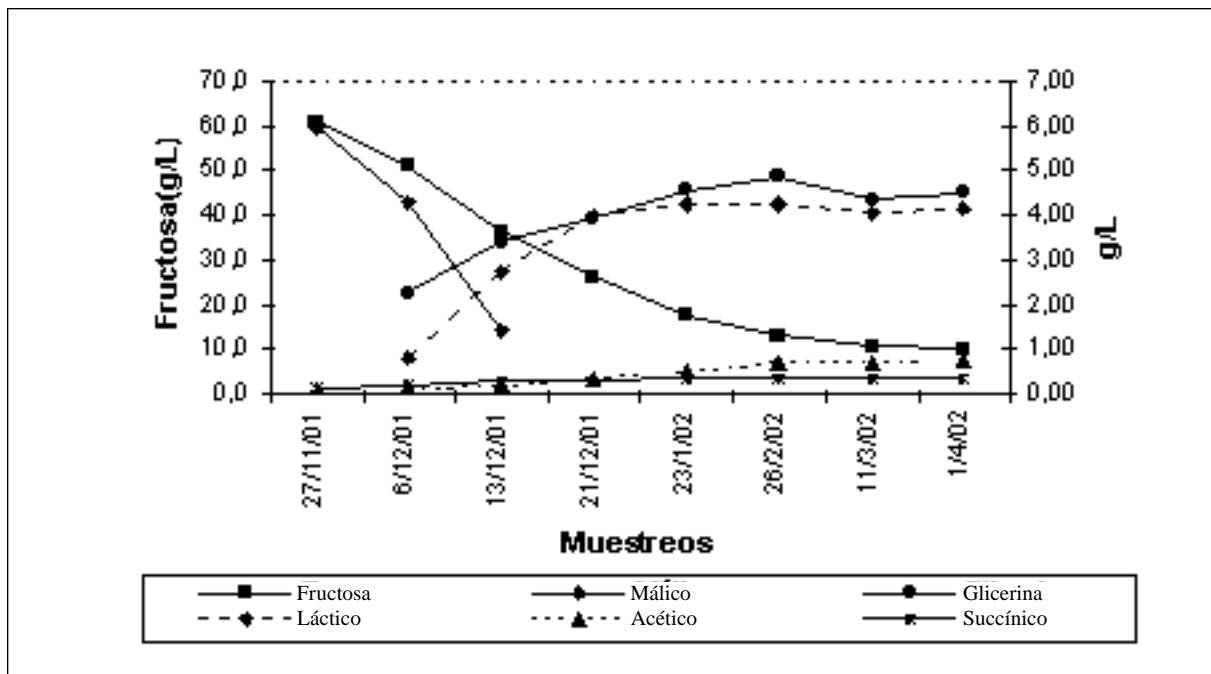


Figura 1.-Evolución de los ácidos orgánicos, fructosa y glicerina

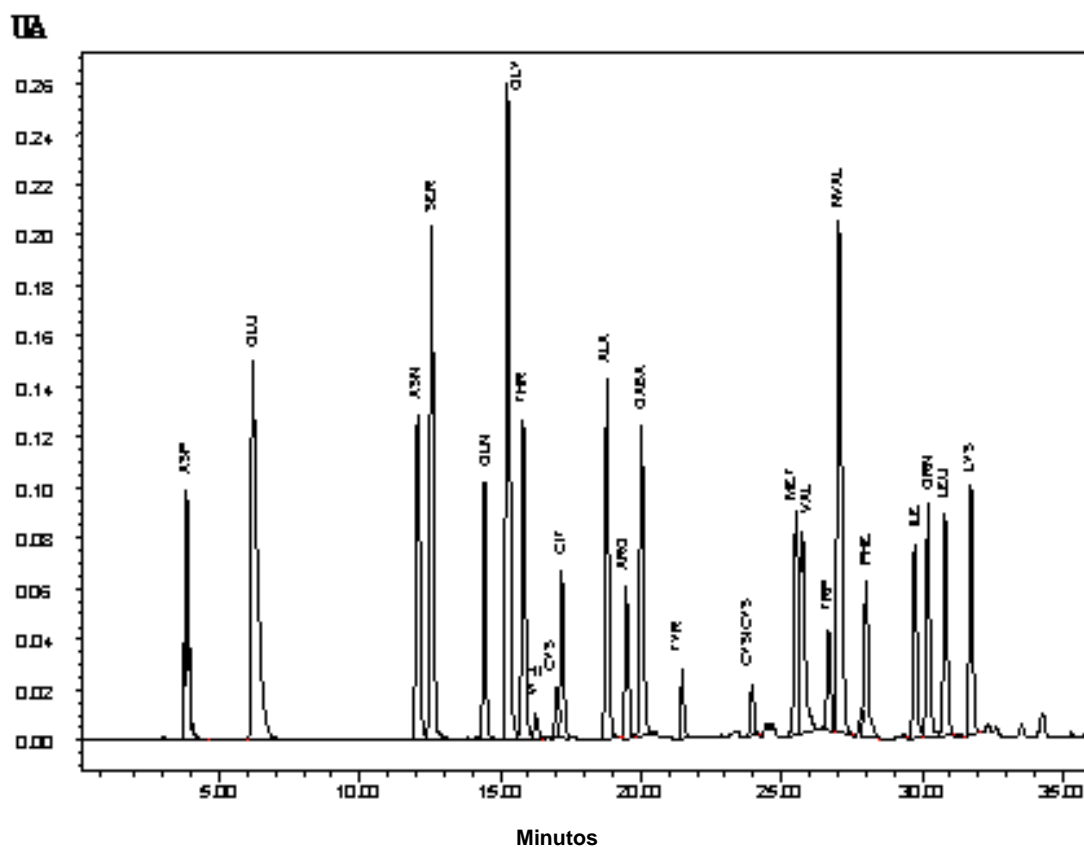


Figura 2.—Cromatograma ($\lambda = 338$ nm) de la mezcla de patrones de aminoácidos.
ASP:Ac. aspártico, **GLU:** Ac. glutámico, **ASN:** asparagina, **SER:** serina,
GLN: glutamina, **GLY:** glicina, **THR:** treonina, **HIS:** histidina, **CYS:** cisteína,
CIT: citrulina, **ALA:** alanina, **ARG:** arginina, **GABA:** Ac. gamma-aminobutírico,
TYR: tirosina, **CYS/CYS:** cistina, **MET:** metionina, **VAL:** valina, **TRP:** triptófano,
NVAL: norvalina (patrón interno), **PHE:** fenilalanina, **ILE:** isoleucina, **ORN:** ornitina,

