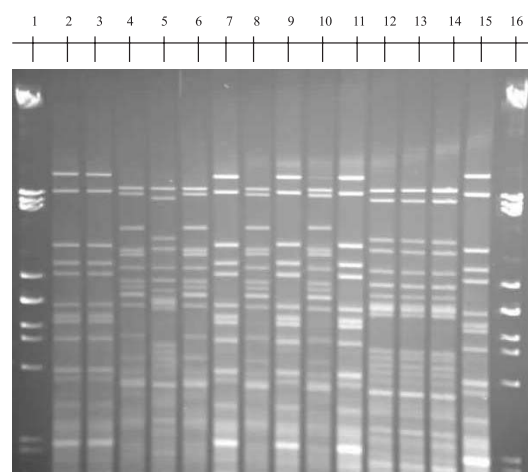




vierte en mayoría en la primera campaña mientras que en la segunda campaña son cepas *Saccharomyces* las que se convierten en dominantes.

Por otra parte, se caracterizaron genéticamente las cepas pertenecientes al género *Saccharomyces* mediante el análisis de los fragmentos de restricción del ADN mitocondrial, determinándose 94 patrones de restricción o cepas diferentes. De ellos, 46 sólo se repiten una vez y de los 48 patrones restantes, 17 se aislaron con cierta frecuencia, pero sólo siete de éstos estuvieron presentes en todas las unidades experimentales muestreadas. Como aspecto importante, cabe señalar que las siete cepas citadas pertenecen a la especie *S. bayanus*. A modo de ejemplo, en la figura 1 se muestran diversos patrones de restricción del ADN mitocondrial.



**Figura 1.**—Patrones de restricción del ADN mitocondrial de levaduras. Calles 1-16: (1,16) Marcador molecular  $\lambda$ , (2-15) 14 colonias de levaduras aisladas

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

### **Investigador responsable**

Juan José Mangas Alonso

### **Organismo**

SERIDA

### **Equipo técnico**

Javier Moreno Fernández

SERIDA

### **Equipo investigador**

Belén Suárez Valles

Anna Picinelli Lobo

Roberto Rodríguez Madrera

Noemí Palacios García

SERIDA

"

"

Valle, Ballina y  
Fernández S. A  
(Becaria)

Rosa Pando Bedriñana

Ayto. Villaviciosa  
(Becaria)

Yoana Expósito Cimadevilla

Univ. de Oviedo  
(Becaria)

Sara Junco Corujedo

"

### **Entidades colaboradoras**

Valle, Ballina y Fernández S. A

Ilmo. Ayuntamiento de Villaviciosa

Universidad de Oviedo

### **Objetivos**

- Elaboración y caracterización microbiológica y química de sidras espumosas.





## Resultados

### **Elaboración de sidras con segunda fermentación en botella**

#### **Campaña 2002**

Se llevaron a cabo los muestreos previstos para el análisis químico-físico, sensorial y microbiológico en las sidras espumosas elaboradas en la campaña anterior.

#### **Campaña 2003**

Se eligió en la bodega colaboradora una sidra fermentada con el grado adecuado de maduración y buenas características sensoriales, para utilizarla como sidra base en la elaboración de sidra con segunda fermentación en botella. Para ello, se microfiltraron, a través de un filtro tangencial cerámico de 0,22 micras, 4.000 L de sidra base, de los cuales, 2.000 L fueron inoculados con la levadura sidrera (*Saccharomyces cerevisiae*, var. *uvarum*) de la colección de microorganismos seleccionados del SERIDA; y los otros 2.000 L se inocularon con la levadura comercial Levuline CHP (*Saccharomyces cerevisiae*, var. *bayanus*). Como paso previo a la inoculación se añadieron a la sidra 20 g/L de sacarosa, un activador de fermentación (5%) y bentonita al 3%. Finalmente, la sidra se trasvasó a botella champanera, se alambrió y se colocó en forma de rima para la toma de espuma. Una vez finalizada la segunda fermentación en botella, con periodicidad trimestral, se hizo el removido y eliminación de las lías por el método tradicional. Se realizaron, coincidiendo con los degüelles, los muestreos previstos para realizar el seguimiento de la composición química y evolución de los inóculos en botella.

### **Elaboración de sidras espumosas en tanques cerrados**

#### **Campaña 2003**

Se *mayó* en la bodega colaboradora una mezcla de variedades de manzana de sidra

asturianas obteniéndose 58.000 L de mosto. Del total, 56.000 L se trasegaron a un depósito de acero inoxidable para obtener la sidra base, que será utilizada en la elaboración de sidra espumosa con segunda fermentación en depósitos isobáricos. Los 2.000 L restantes se trasladaron a la bodega experimental del SERIDA para obtener las sidras espumosas con única fermentación a temperatura y presión controlada.

A lo largo de todo el proceso de fermentación se realizó diariamente el control de la masa volúmica y temperatura de fermentación y los muestreos periódicos previstos en el diseño experimental.

### **Identificación y caracterización genética y tecnológica de levaduras**

#### **Campaña 2002**

Una vez identificada genéticamente la flora levaduriforme, las levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* (244 colonias) fueron diferenciadas a nivel de microorganismos mediante el estudio de los polimorfismos del ADN mitocondrial. La aplicación de esta técnica condujo a la clasificación de las cepas en 54 grupos con patrones de bandas diferentes.

Por otra parte, dado que nuestro objetivo es la selección de cepas para la fermentación de sidras espumosas, se llevaron a cabo pruebas de floculación/agregación/adherencia como primer criterio de selección. Como consecuencia de esta selección, se eligieron 11 cepas con las características deseadas, siendo todas ellas poco productoras de ácido acético y con buenas aptitudes fermentativas en medios alcohólicos. En la tabla 1 se recoge la frecuencia de aparición de las cepas floculantes en los distintos estadios de la fermentación y sus características en cuanto a: la producción de ácido sulfhídrico (placa: medio BIGGY escala 0-5); la producción de acidez volátil (placa: medio a la Tiza escala 0-5); la producción de dióxido de azufre (placa: medio Agar-fuschine escala 0-4); y las aptitudes floculantes, utilizando el tampón



**Tabla 1.—Frecuencia de aparición de patrones de bandas caracterizados por ADN mitocondrial y características de floculación de 11 cepas de *S. cerevisiae* a lo largo de la fermentación de la sidra base**

Patrón mitocondrial	3	10	19	20	25	27	29	32	34	40	50
Especie	S.cer.	S.cer.	S.cer.	S.cer.	S.cer.	S.cer.	S.cer.	S.cer.	S.cer.	S.cer.	S.cer.
D=1030	16%	4%	2%	2%	2%	2%					
D=1019		2%		6%			2%	2%	2%	2%	
D=1003	4%			4%	2%			18%			
D=1003								6%			2%
D=1001											22%
Total de colonias	10	3	1	6	2	1	1	13	1	1	12
H2S	3	3	3	3	4	3	2	2	3	3	3
HAc	2	2	2	2	3	2	1	1	2	1	3
SO2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Helm	alta	alta	alta	alta	alta	alta	alta	alta	alta	alta	alta
Flc.obs	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Form. agrega.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Adherencia	3	2	2	1	0	1	1	2	2	0	0

HAc= ácido acético. Helm=capacidad de floculación. Flc. obs= observación visual de la floculación. Form. agre= formación de agregados. D= masa volumica (g/L)

de Helm (escala: baja, media y alta) y la observación visual (escala: 0-3); asimismo, se observó: la capacidad de formación de agregados (+/-) y la adherencia al vidrio (escala: 0-3). El estudio se está completando con la determinación de la velocidad de fermentación a baja temperatura (12° C) y el análisis de su capacidad autocatalítica y de las propiedades espumantes de sus autolisados.

### **Campaña 2003**

Se realizaron los recuentos de levaduras, bacterias lácticas y acéticas y se procedió al aislamiento, en distintos estadios de las fermentaciones, de 1.000 cepas de levaduras para su identificación mediante el análisis de los tamaños moleculares del amplificado de la región 5.8S-ITS de ARNr (RFLP). En las sidras con segunda fermentación en botella se realizaron los análisis de restricción del ADN mito-

condrial para observar la imposición del inóculo a lo largo de la toma de espuma y crianza sobre lías.

## **Caracterización química**

### **Campañas 2002 y 2003**

A lo largo del proceso de elaboración de las sidras espumosas se analizaron, utilizando la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y la gaseosa (GC), las siguientes familias químicas: ácidos orgánicos mayoritarios, azúcares y polialcoholes, compuestos fenólicos de baja masa molecular, y los compuestos volátiles mayoritarios. Se analizaron también los parámetros globales por métodos de análisis clásicos.

En la tabla 2, se recoge la evolución de la fracción volátil y no volátil de las sidras espumosas durante la toma de espuma. Como se





**Tabla 2.—Evolución de los principales parámetros globales, ácidos orgánicos, azúcares, glicerina y compuestos volátiles durante la toma de espuma**

Toma de espuma	masa volúmica (kg/L)	grado alcohólico (% v/v)	extracto seco (g/L)	ac. láctico (g/L)	ac. acético (g/L)	sacarosa (g/L)	glucosa (g/L)	fructosa (g/L)	glicerina (g/L)	acetaldehído (mg/L)	acetato de etilo (mg/L)	metanol (mg/L)	1-propanol (mg/L)	isobutanol (mg/L)	1-butanol (mg/L)	alcoholes amilícos (mg/L)	acetoina (mg/L)	lactato de etilo (mg/L)	2-feniletanol (mg/L)
Sidra base	0,999	6,18	23	4,6	0,9	nd	nd	nd	4,4	36,2	99,7	109,1	12,3	50,2	7,5	231,1	2	185,3	49,9
<b>Levadura vínica</b>																			
inóculo	1,007		46,2	4,6	0,9	18,3	1,8	2,3	4,3										
primera semana	0,999		28,1	4,3	0,8	nd	2,1	3,5	4,7	66,5	70,7	99,1	16	49,1	7	229,4	13	181,6	45
segunda semana	0,997	7,54	23,3	4,3	0,8	nd	nd	nd	4,8	49,8	68,9	100,5	16,1	48,7	7,1	233,2	7,5	177,9	46
<b>Levadura sidrera</b>																			
inóculo	1,008		47,2	4,5	0,9	20,4	1,4	2,3	4,3										
primera semana	1,002		33,1	4,4	0,8	nd	3,4	6,5	4,6	82,6	70,2	97,7	12,9	48,1	7	230,2	16,4	185,8	50
segunda semana	0,998	7,31	26,1	4,3	0,8	nd	0,4	3,2	4,8	66,2	71,3	98	13,2	48,8	7,2	234	11,4	182,7	53,1

n.d. no detectado

puede apreciar en dicha tabla, las dos cepas ensayadas fueron capaces de hidrolizar la sacarosa añadida en el "licor de tiraje", no obstante, la velocidad de metabolización de los azúcares por parte de la levadura vínica es mayor que la de la levadura sidrera.

Por otro lado, en las figuras 1 y 2, se recoge la evolución de los aminoácidos primarios durante la toma de espuma y la crianza sobre lías.

Como se puede observar en dichas figuras, hay un comportamiento diferente entre las dos levaduras utilizadas, tanto en relación con la metabolización y asimilación de los aminoáci-

dos durante la fase de toma de espuma como durante la excreción de éstos al medio (autólisis) durante la crianza sobre lías. Así, durante la toma de espuma la levadura vínica consume el 89% del nitrógeno asimilable mientras que la levadura sidrera sólo el 41%. Durante la crianza en contacto con las lías es la levadura vínica la que primero comienza a excretar aminoácidos al medio (tres meses), mientras que este fenómeno se retarda hasta los nueve meses para el caso de la levadura autóctona. Por otra parte, con independencia de la levadura inoculada, el aminoácido mayoritario durante las etapas de toma de espuma y crianza fue la asparagina.

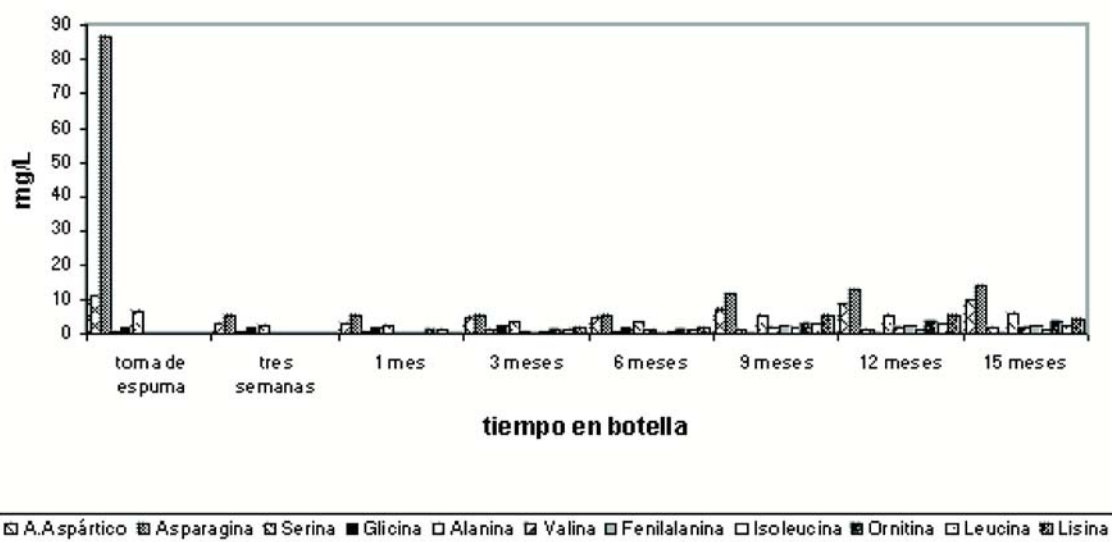


Figura 1.—Evolución de los aminoácidos (mg/L) durante la toma de espuma y crianza de la sidra espumosa elaborada con una levadura vínica

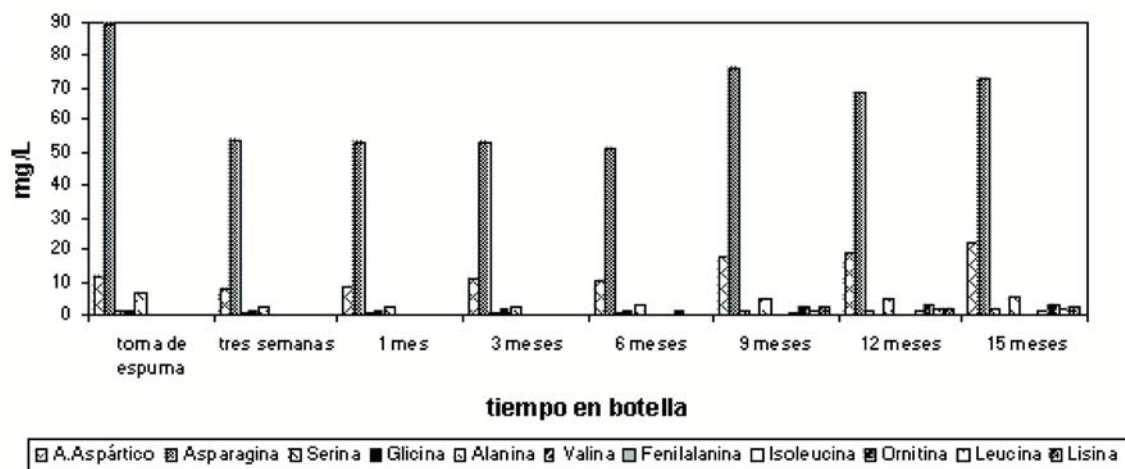


Figura 2.—Evolución de los aminoácidos (mg/L) durante la toma de espuma y crianza de la sidra espumosa elaborada con una levadura sidrera

