

Selection of native yeasts for the production of sparkling ciders from apple varieties established in Querétaro, Mexico

Selección de levaduras nativas para la elaboración de sidras espumosas a partir de variedades de manzana establecidas en Querétaro, México

Alma Karina León-Teutli; Montserrat Hernández-Iturriaga;
Dalia Elizabeth Miranda-Castilleja; Jesús Alejandro Aldrete-Tapia;
Lourdes Soto-Muñoz; Ramón Álar Martínez-Peniche*

Universidad Autónoma de Querétaro, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química.
Centro Universitario s/n, col. Las Campanas, Querétaro, Querétaro, C. P. 76010, MÉXICO.

*Corresponding author: alvar@uaq.mx, tel. 442 1 92 13 04.

Abstract

The low quality of the apple produced in Querétaro, Mexico, impedes its efficient fresh marketing. One possible solution to this problem is to produce champagne-type sparkling cider. Therefore, the objective of this work was to select strains of *Saccharomyces* yeasts isolated from apple varieties of the region, based on desirable traits to make sparkling ciders. To select the yeasts, we induced the spontaneous fermentation of the must of 14 varieties, from which 135 strains (102 *Saccharomyces* spp.) were isolated and three (MM7, 436.4 and RY5) were selected, all with killer phenotype, β -glucosidase activity, tolerance to 8 % ethanol and 50 mg·L⁻¹ of SO₂, a different degree of flocculation and with the ability to produce more than 3 atm of pressure in the bottle. With MM7, a base cider of good quality was obtained (glucose < 2 g·L⁻¹, pH 3.57, total titratable acidity of 4.03 g·L⁻¹ and volatile acidity of 0.27 g·L⁻¹). For the second fermentation, the base ciders made with MM7 were bottled, 15 g·L⁻¹ of sucrose were added and then they were inoculated separately with MM7, 436.4, RY5 or K1-V1116. By day 21, they all reached about 6 atm of pressure. Sensorially, ciders made with MM7 stood out in effervescence speed, and those made with RY5 in taste acceptability. The amplification and sequencing of the ITS1/ITS4 domain identified MM7 and 436.4 as *S. cerevisiae*, and RY5 as *S. paradoxus*. The selected yeasts showed desirable traits for the production of quality sparkling ciders typical of the region.

Keywords: *Malus domestica*

Borkh, killer effect, β -glucosidase, *Saccharomyces*, champenoise method.

Resumen

La baja calidad de la manzana producida en Querétaro, México, impide su eficiente comercialización en fresco. Una alternativa a este problema es producir sidra espumosa tipo champaña. Por ello, el objetivo de este trabajo fue seleccionar cepas de levaduras *Saccharomyces* aisladas a partir de variedades de manzana de la región, con base en características deseables para elaborar sidras espumosas. Para seleccionar las levaduras, se indujo la fermentación espontánea del mosto de 14 variedades, de las que se aislaron 135 cepas (102 *Saccharomyces* spp.) y se seleccionaron tres (MM7, 436.4 y RY5), todas con fenotipo *killer*, actividad β -glucosidasa, tolerancia a 8 % de etanol y 50 mg·L⁻¹ de SO₂, distinto grado de floculación y con capacidad de producir más de 3 atm de presión en la botella. Con MM7 se obtuvo una sidra tranquila de buena calidad (glucosa < 2 g·L⁻¹, pH de 3.57, acidez total titulable de 4.03 g·L⁻¹ y volátil de 0.27 g·L⁻¹). Para la segunda fermentación, se embotellaron las sidras tranquilas elaboradas con MM7, se les agregaron 15 g·L⁻¹ de sacarosa y se inocularon por separado con MM7, 436.4, RY5 o K1-V1116. Para el día 21, todas alcanzaron cerca de 6 atm de presión. Sensorialmente, las sidras elaboradas con MM7 destacaron en velocidad de efervescencia, y la de RY5 en aceptabilidad gustativa. La amplificación y secuenciación del dominio ITS1/ITS4 identificó a MM7 y 436.4 como *S. cerevisiae*, y a RY5 como *S. paradoxus*. Las levaduras seleccionadas mostraron características deseables para la elaboración de sidras espumosas de calidad y típicas de la región.

Palabras clave: *Malus*

domestica Borkh, efecto *killer*, β -glucosidasa, *Saccharomyces*, método champenoise.

Please cite this article as follows (APA 6): León-Teutli, A. K., Hernández-Iturriaga, M., Miranda-Castilleja, D. E., Aldrete-Tapia, J. A., Soto-Muñoz, L., & Martínez-Peniche, R. A. (2020). Selection of native yeasts for the production of sparkling ciders from apple varieties established in Querétaro, Mexico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 26(1), 29-47. doi: 10.5154/r.rchsh.2019.06.010



Revista Chapingo
Serie Horticultura

Introduction

The main cider-producing states in Mexico are Puebla, Hidalgo and Chihuahua, and the main varieties used for its production are 'Golden Delicious', 'Red Delicious', 'Gala', 'Rome Beauty', 'Starking Delicious', 'Red Chief' and 'Top Red' (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [SAGARPA], 2017). For its part, the state of Querétaro has 422 ha established with apple trees (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2017), where the main varieties are 'Golden Delicious' and 'Red Delicious'; however, the climate of this state and the poor application of cultivation techniques mean that most of the apple produced does not meet the desired physical traits, such as size, shape and absence of damage caused by pathogens or hail, making it difficult to market it fresh at profitable prices (Paz-Cuadra et al., 2014).

One possible solution to this problem is to produce derivatives, such as champagne-style sparkling cider (Nogueira & Wosiacki, 2012), which is obtained from a second fermentation inside the airtight bottle containing the base cider (the one resulting from the alcoholic fermentation of the apple must) (Herrero, Gonzalo, & García, 2010). At this stage of the process the pressure increases, which gives rise to the effervescence at the time of uncorking (Esteruelas et al., 2015). Effervescence is a quality parameter of ciders, and depends, to a large extent; on the strain of *Saccharomyces* spp. yeast used (Mangas, 2010).

The desirable traits of the yeasts to make sparkling cider are tolerance to sulfur dioxide and ethanol, β -glucosidase activity, killer effect (ability to produce a toxin that inhibits the growth of other microorganisms), tolerance to high CO₂ pressures and flocculation capacity (Suárez-Valles, Pando-Bedriñana, Lastra-Queipo, & Mangas-Alonso, 2008). Therefore, Pando-Bedriñana, Querol-Simón, and Suárez-Valles (2010), when isolating yeasts during the fermentation of Asturian apple must (Spain), characterized their killer phenotype, β -glucosidase activity and production of hydrogen sulfide (H₂S). Suárez-Valles et al. (2008) isolated *Saccharomyces* spp. yeasts for the production of sparkling cider by the champenoise method and determined their tolerance to ethanol, production of acetic acid and H₂S, and their flocculant capacity.

In previous studies conducted in the region, the effect of commercial yeast and sugar level on the quality of sparkling cider was evaluated (Ramírez-Mora, Martínez-Peniche, & Fernández-Montes, 2005); however, the fermentation potential of the native yeast present in the apple has not been characterized so far. Therefore, the objective of the present study was to select strains of *Saccharomyces* yeasts isolated from various apple

Introducción

Los principales estados productores de sidra en México son Puebla, Hidalgo y Chihuahua, y las principales variedades empleadas para su elaboración son 'Golden Delicious', 'Red Delicious', 'Gala', 'Rome Beauty', 'Starking Delicious', 'Red Chief' y 'Top Red' (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación [SAGARPA], 2017). Por su parte, el estado de Querétaro cuenta con 422 ha establecidas con manzanos (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera [SIAP], 2017), donde las principales variedades son 'Golden Delicious' y 'Red Delicious'; no obstante, el clima de este estado y la deficiente aplicación de técnicas de cultivo propician que la mayor parte de la manzana que se produce no cumpla con las características físicas deseadas, como el tamaño, la forma y la ausencia de daños producidos por patógenos o por granizo, lo que dificulta su comercialización en fresco a precios rentables (Paz-Cuadra et al., 2014).

Una alternativa a dicho problema es la producción de derivados, como la sidra espumosa tipo champaña (Nogueira & Wosiacki, 2012), la cual se obtiene a partir de una segunda fermentación al interior de la botella hermética que contiene la sidra tranquila de base (aquella que resulta de la fermentación alcohólica del mosto de manzana) (Herrero, Gonzalo, & García, 2010). En esta etapa del proceso incrementa la presión, lo que origina la efervescencia al momento del descorche (Esteruelas et al., 2015). La efervescencia es un parámetro de calidad de las sidras, y depende, en gran medida, de la cepa de levadura *Saccharomyces* spp. utilizada (Mangas, 2010).

Las características deseables de las levaduras para elaborar sidra espumosa son la tolerancia a anhídrido sulfuroso y etanol, la actividad β glucosidasa, el efecto *killer* (capacidad de producción de una toxina que inhibe el crecimiento de otros microorganismos), la tolerancia a altas presiones de CO₂ y la capacidad de floculación (Suárez-Valles, Pando-Bedriñana, Lastra-Queipo, & Mangas-Alonso, 2008). Por ello, Pando-Bedriñana, Querol-Simón, y Suárez-Valles (2010), al aislar levaduras durante la fermentación del mosto de manzana asturiana (España), caracterizaron su fenotipo *killer*, actividad β -glucosidasa y producción de ácido sulfhídrico (H₂S). Suárez-Valles et al. (2008) aislaron levaduras *Saccharomyces* spp. para la producción de sidra espumosa por el método *champenoise* y determinaron su tolerancia al etanol, producción de ácido acético y H₂S, y su capacidad floculante.

En estudios previos realizados en la región, se evaluó el efecto del tipo de levadura comercial y el nivel de azúcar sobre la calidad de sidra espumosa (Ramírez-Mora, Martínez-Peniche, & Fernández-Montes, 2005); sin embargo, hasta el momento no se ha caracterizado

varieties in the region, based on desirable traits to make sparkling ciders. The hypothesis of this work is that in the Querétaro apple-producing region there are yeast strains with desirable genetic traits to make craft champagne-type ciders.

Materials and methods

Biological material and experimental site

We used apples (*Malus domestica* Borkh) of the varieties 'Golden Delicious', 'Red Delicious', 'Joya', 'Rayada', 'Royal Gala', 'Agua Nueva', 'Rosada', '424', '428', '429a', '429b', '436', '467' and '*Malus x Micromalus*' established in a phenological orchard in San José Itho, Amealco, Querétaro, Mexico, located at 20° 11' N and 100° 08' W, at 2,275 masl. The orchard is rain-fed, with auxiliary irrigation during the dry spring period. The average annual temperature is 15.2 °C, with average annual rainfall of 927.7 mm (Servicio Meteorológico Nacional [SMN], 2016) and an average accumulation of chill hours of 500. The soil is deep (> 50 cm) and clayey, with pH 5.6, low salinity (0.03 dS·m⁻¹) and low organic matter content (0.53 %).

The reference yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae* were K1-V1116 (LALVIN®) and AH22 (sensitive to the killer genotype).

Yeast isolation

Apples were harvested according to their apparent maturity (visual appreciation of color) due to the scarcity of material; from these, the musts were obtained with a standard extractor (TU04, Turmix, Mexico). All musts were adjusted to 20 °Brix sucrose, sulphited (50 mg·L⁻¹ of SO₂), racked at 3 °C for 24 h and left to ferment spontaneously at 19 °C. Halfway through the fermentation ($\rho = 1.03$ g·mL⁻¹) and at its end ($\rho = 0.99$ g·mL⁻¹, or when the density remained constant), aliquots were taken, serial decimal dilutions were made, 100 µL were spread plated on nutrient yeast dextrose agar (NYDA) – supplemented with chloramphenicol (100 mg·L⁻¹) and rose bengal (60 mg·L⁻¹) – and incubated for two days at 28 °C.

From the plates corresponding to each apple variety, five colonies with contrasting morphologies were isolated at each stage of fermentation. The isolated strains were differentiated by three consecutive passes in lysine agar medium incubated at 25 °C for two days. Strains that did not grow in the medium were considered to be of the genus *Saccharomyces* (Medina et al., 2007).

Saccharomyces yeast selection tests

To determine killer effect, the methodology proposed by Lopes and Sangorrín (2010) was used, with some

el potencial fermentativo de las levaduras nativas presentes en la manzana. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue seleccionar cepas de levaduras *Saccharomyces* aisladas a partir de diversas variedades de manzana de la región, con base en características deseables para elaborar sidras espumosas. La hipótesis de este trabajo es que en la región de Querétaro productora de manzanas existen cepas de levaduras con características genéticas deseables para elaborar sidras artesanales tipo champaña.

Materiales y métodos

Material biológico y sitio experimental

Se utilizaron manzanas (*Malus domestica* Borkh) de las variedades 'Golden Delicious', 'Red Delicious', 'Joya', 'Rayada', 'Royal Gala', 'Agua Nueva', 'Rosada', '424', '428', '429a', '429b', '436', '467' y '*Malus x Micromalus*' establecidas en un huerto fenológico en San José Itho, Amealco, Querétaro, México, localizado a 20° 11' latitud norte y 100° 08' longitud oeste, a 2,275 msnm. El huerto se encuentra bajo temporal, con riegos de auxilio durante el periodo seco de primavera. La temperatura media anual es de 15.2 °C, con una precipitación media anual de 927.7 mm (Servicio Meteorológico Nacional [SMN], 2016) y acumulación promedio de horas frío de 500. El suelo es profundo (> 50 cm) y arcilloso, con un pH de 5.6, baja salinidad (0.03 dS·m⁻¹) y bajo contenido de materia orgánica (0.53 %).

Las cepas de levadura de referencia de *Saccharomyces cerevisiae* fueron K1-V1116 (LALVIN®) y AH22 (sensible al genotipo killer).

Aislamiento de las levaduras

Las manzanas se cosecharon de acuerdo con su madurez aparente (apreciación visual del color) debido a la escasez de material; a partir de éstas se obtuvieron los mostos con un extractor estándar (TU04, Turmix, México). Todos los mostos se ajustaron a 20 °Brix con sacarosa, se sulfitaron (50 mg·L⁻¹ de SO₂), se desfangaron a 3 °C por 24 h y se dejaron fermentar espontáneamente a 19 °C. A la mitad de la fermentación ($\rho = 1.03$ g·mL⁻¹) y a su término ($\rho = 0.99$ g·mL⁻¹, o bien cuando la densidad permaneció constante) se tomaron alícuotas, se realizaron diluciones decimales seriadas, se sembraron 100 µL por extensión en superficie en agar nutritivo-dextrosa para levaduras (NYDA) – suplementado con cloranfenicol (100 mg·L⁻¹) y rosa de bengala (60 mg·L⁻¹) – y se inocularon durante dos días a 28 °C.

De las placas correspondientes a cada variedad de manzana, se aislaron cinco colonias con morfologías contrastantes en cada etapa de la fermentación. Las cepas aisladas se diferenciaron mediante tres pases consecutivos en medio agar lisina incubado a 25 °C

modifications. First, a total of 6 Log of CFU·mL⁻¹ of the killer effect-sensitive strain (AH22) were poured plated in NYDA medium with methylene blue (0.2 %), NaCl (1 %) and phosphate citrate to adjust the pH to 4.6. Once the medium solidified, 5 µL of each strain were inoculated in drop form at a concentration of 6 Log CFU·mL⁻¹ and incubated for 72 h at 25 °C. The strains were considered killer when a blue-framed inhibition halo was observed around them.

β-glucosidase activity was determined in esculin glycerol agar medium at pH 6, for which each strain was separately streak plated, and incubated at 25 °C for two days. β-glucosidase activity was evidenced by the hydrolysis of the substrate, in which a brown precipitate forms around the colony (Pérez et al., 2011).

Flocculation capacity was determined as reported by Suárez-Valles et al. (2008), with some modifications. The strains were inoculated in 5 mL of NYDB broth and incubated at 25 °C for 72 h. Subsequently, the cultures were centrifuged and resuspended in 5 mL of Helm's buffer solution (3 mmol·L⁻¹ of CaCl₂ and 50 mmol·L⁻¹ of acetate-acetic buffer solution, pH 4.5). The flocculation index (FI) was determined by the ratio, in percent, of the optical density at 620 nm of the culture suspension and that obtained 120 min after adding Helm's solution. The strains were classified as: highly flocculant (FI < 30 %), moderately flocculant (FI between 30 and 70 %) and slightly flocculant (FI > 70 %).

For the fermentation rate, each strain was inoculated at a concentration of 6 Log CFU·mL⁻¹ into tubes with 15 mL of sterile must adjusted to 25 °Brix and incubated at 25 °C for eight days. Weight loss per day was measured and a negative slope was obtained (g·day⁻¹), in which three groups were formed according to their fermentation rate: slow (< -0.07 g·day⁻¹), medium (between -0.071 and -0.08 g·day⁻¹) and fast (> -0.081 g·day⁻¹), preferring those cells that presented any of the last two.

Tolerance to ethanol and SO₂ was determined by turbidimetry. First, 5 Log CFU of each strain were inoculated into individual microplate pits containing 200 µL of NYDB medium (pH = 3.8), with ethanol (8 %) and potassium metabisulfite (50 mg·L⁻¹ of SO₂) added. The microplates were incubated for 72 h at 25 °C and at the end the optical density was measured at 600 nm in a VariouskanTM analyzer (Thermo Fisher®, Finland). Strains with an OD₆₀₀ > 0.7 were considered tolerant.

Pressure tolerance was evaluated from microfermentations. First, the base cider was obtained from pasteurized must and adjusted to 25 °Brix, for which the commercial yeast K1-V1116 was used. At the end of the first fermentation, 300 mL of base cider were emptied into disinfected PET bottles

durante dos días. Las cepas que no crecieron en el medio se consideraron del género *Saccharomyces* (Medina et al., 2007).

Pruebas de selección de levaduras *Saccharomyces*

Para determinar el efecto *killer*, se empleó la metodología propuesta por Lopes y Sangorrín (2010), con algunas modificaciones. Se inocularon por vaciado en placa 6 Log de UFC·mL⁻¹ de la cepa sensible al efecto *killer* (AH22) en medio NYDA con azul de metileno (0.2 %), NaCl (1 %) y fosfato-citrato para ajustar el pH a 4.6. Una vez solidificado el medio, se inocularon en forma de gota 5 µL de cada cepa a una concentración de 6 Log UFC·mL⁻¹ y se incubaron durante 72 h a 25 °C. Las cepas se consideraron *killer* cuando a su alrededor se observó un halo de inhibición enmarcado en azul.

La actividad β-glucosidasa se determinó en medio agar esculina-glicerol a pH 6, para lo cual cada cepa se inoculó por estría y por separado, e incubó a 25 °C por dos días. La actividad β-glucosidasa se evidenció por la hidrólisis del sustrato, en la cual se forma un precipitado color marrón alrededor de la colonia (Pérez et al., 2011).

La capacidad de floculación se determinó de acuerdo con lo reportado por Suárez-Valles et al. (2008), con algunas modificaciones. Las cepas se inocularon en 5 mL de caldo NYDB y se incubaron a 25 °C durante 72 h. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron y se resuspendieron en 5 mL de solución amortiguadora de Helm (3 mmol·L⁻¹ de CaCl₂ y 50 mmol·L⁻¹ de solución amortiguadora de acetato-acético, pH de 4.5). El índice de floculación (IF) se determinó mediante la relación, en porcentaje, de la densidad óptica a 620 nm de la suspensión de cultivo y la obtenida 120 min después de añadir la solución de Helm. Las cepas se clasificaron como: altamente floculantes (IF < 30 %), medianamente floculantes (IF entre 30 y 70 %) y ligeramente floculantes (IF > 70 %).

Para la velocidad de fermentación, cada cepa se inoculó a una concentración de 6 Log UFC·mL⁻¹ en tubos con 15 mL de mosto estéril ajustado a 25 °Brix y se incubaron a 25 °C durante ocho días. Se midió la pérdida de peso por día y se obtuvo una pendiente negativa (g·día⁻¹), en la cual se formaron tres grupos de acuerdo con su velocidad de fermentación: lenta (< -0.07 g·día⁻¹), media (entre -0.071 y -0.08 g·día⁻¹) y rápida (> -0.081 g·día⁻¹), prefiriéndose aquellas cepas que presentaran cualquiera de las dos últimas.

La tolerancia a etanol y a SO₂ se determinó por turbidimetría. Se inocularon 5 Log UFC de cada cepa en fosas individuales de microplacas que contenían 200 µL de medio NYDB (pH = 3.8), adicionado con etanol

fitted with a Schrader valve; 30 g·L⁻¹ of sugar and 6 Log UFC·mL⁻¹ of the native yeast to be evaluated were added. Finally, the pressure was measured weekly for 49 days with a pneumatic manometer (Autotec 77992, AutoZone, Mexico).

Production of sparkling cider

'Golden Delicious' apple must was sulphited, racked and inoculated (1x10⁵ CFU·mL⁻¹) with the most outstanding native strain to obtain the base cider. The juice was fermented at 19 ± 1 °C, as proposed by Soto-Herrera, Castillo-Castañeda, and Martínez-Peniche (2008). The cider obtained was decanted, clarified with albumin and divided into batches corresponding to the pre-selected strains to be evaluated. In each batch, tirage liquor (1x10⁵ CFU·mL⁻¹ of the yeast strain and 30 g·L⁻¹ of sucrose) and 50 mg·L⁻¹ of ammonium sulfate were added, and it was distributed in six 250 mL PET bottles fitted with a Schrader valve. The bottles were left to ferment at 16 ± 1 °C for 28 days. The internal pressure was measured weekly with the manometer.

At the end of the second fermentation, the sediments were removed by inverting the bottles (25 days), freezing the bottle neck and then disgorging. Finally, following the protocols recognized by the International Organisation of Vine and Wine (OIV, 2017), the following were determined: alcohol by volume (ABV) by distillation and densimetry, residual sugars (RS; g·L⁻¹) by Fheling-Causse-Bonnans, pH by means of a potentiometer, total titratable acidity (TTA; g·L⁻¹) by titration, volatile acidity (VA; g·L⁻¹) with the García-Tena methodology and total sulphurous anhydride (SO₂) by iodimetry (mg·L⁻¹).

Sensory analysis

Two unstructured linear hedonic tests were carried out with limits from 0 to 10 (where 0 corresponds to "I really dislike it" and 10 to "I like it a lot") and 10 semi-trained panelists. In the first test the foaming characteristics of the ciders were evaluated: a) crown height (foam formed on the liquid surface), b) crown reduction time, c) number of trains (corresponding to the bubble lines that form within the liquid and rise to the surface), d) bubble diameter and e) effervescence speed. The second test assessed the acceptability of appearance, aroma and taste (Soto-Herrera et al., 2008).

Identification of selected yeasts

Species-level identification of the selected yeasts was performed by amplification through polymerase chain reaction (PCR) and subsequent sequencing of the ITS1/ITS4 region with the oligonucleotides ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') and ITS4

(8 %) y metabisulfito de potasio (50 mg·L⁻¹ de SO₂). Las microplacas se incubaron durante 72 h a 25 °C y al final se midió la densidad óptica a 600 nm en un analizador Varioskan™ (Thermo Fisher®, Finlandia). Se consideraron tolerantes aquellas cepas con una DO₆₀₀ > 0.7.

La tolerancia a la presión se evaluó a partir de microfermentaciones. Primero se obtuvo la sidra de base a partir de mosto pasteurizado y ajustado a 25 °Brix, para lo cual se empleó la levadura comercial K1-V1116. Al término de la primera fermentación, se vaciaron 300 mL de sidra tranquila en botellas de PET desinfectadas y adaptadas con una válvula tipo Schrader, se agregaron 30 g·L⁻¹ de azúcar y 6 Log UFC·mL⁻¹ de la levadura nativa a evaluar. Finalmente, se midió la presión cada semana durante 49 días con un manómetro neumático (Autotec 77992, AutoZone, México).

Elaboración de sidra espumosa

El mosto de manzana 'Golden Delicious' se sulfitó, desfangó e inoculó (1x10⁵ UFC·mL⁻¹) con la cepa nativa más sobresaliente para obtener la sidra tranquila. El jugo se fermentó a 19 ± 1 °C, de acuerdo con lo propuesto por Soto-Herrera, Castillo-Castañeda, y Martínez-Peniche (2008). La sidra obtenida se trasegó, clarificó con albúmina y se dividió en lotes correspondientes a las cepas preseleccionadas a evaluar. En cada lote se adicionó licor de tiraje (1x10⁵ UFC·mL⁻¹ de la cepa de levadura y 30 g·L⁻¹ de sacarosa) y 50 mg·L⁻¹ de sulfato de amonio, y se distribuyó en seis botellas de PET de 250 mL modificadas con válvula Schrader. Las botellas se dejaron fermentar a 16 ± 1 °C durante 28 días. La presión interna se midió cada semana con el manómetro.

Al término de la segunda fermentación se removieron los sedimentos mediante puesta en pupitre (25 días) y posterior degüelle. Finalmente, siguiendo los protocolos válidos ante la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2017), se determinó: grado alcohólico (GA; °GL) por destilación y densimetría, azúcares residuales (AR; g·L⁻¹) por Fheling-Causse-Bonnans, pH por medio de un potenciómetro, acidez total titulable (ATT; g·L⁻¹) por titulación, acidez volátil (AV; g·L⁻¹) con la metodología de García-Tena y anhídrido sulfuroso total (SO₂) por yodimetría (mg·L⁻¹).

Análisis sensoriales

Se realizaron dos pruebas hedónicas lineales no estructuradas con límites de 0 a 10 (donde el 0 corresponde a "me disgusta mucho" y 10 a "me gusta mucho") y 10 panelistas semientrenados. En la primera prueba se evaluaron las características espumantes de las sidras: a) altura de la corona (espuma formada en la superficie del líquido), b) tiempo de reducción de la corona, c) número de trenes (correspondientes a las

(5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), using the following conditions: 2 min at 95 °C, 35 cycles (30 s at 95 °C, 1 min at 56.75 °C and 1 min at 72 °C) and 10 min at 72 °C. The amplicons were sent to LANBAMA of the *Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica* (IPICYT, SLP) for purification and subsequent sequencing with Sanger's technique and a genetic analyzer (3130 Genetic analyzer, Thermo Fisher®, USA). The sequences obtained were compared with those of GenBank using the Blast program.

Statistical analysis

A completely randomized unifactorial experimental design with a different number of replicates was used, with the yeast strains being the study factor. All yeast preselection determinations were performed in triplicate. The data of the quantitative variables were subjected to an analysis of variance and Tukey's test ($P \leq 0.05$), for which the JMP version 11 statistical program was used. To determine differences between the sensory characteristics of the ciders, the Friedman test was used with the Prism-GraphPad program.

Results and discussion

Initial must characteristics

Table 1 shows the initial characteristics of each apple variety used, and it can be seen that there are important differences among them. The highest must yields were obtained with '429a', '428', 'Red Delicious' and 'Rayada' (0.45, 0.45, 0.44 and 0.43 L·kg⁻¹ of apple, respectively), which contrast with '*Malus x Micromalus*' (0.26 L·kg⁻¹ of apple); this is probably due to the low percentage of juice and greater firmness of the '*Malus x Micromalus*' pulp. The highest concentration of sugars was in 'Agua Nueva' and 'Royal Gala' (17 °Brix), which differs from that obtained with '424' and 'Rayada' (11.2 and 11.4 °Brix, respectively). Finally, the highest pH value was recorded by the must obtained with '428' (pH = 4.37), and the lowest value was shown by '*Malus x Micromalus*' (pH = 2.97).

Yeast isolation and differentiation

The evolution of spontaneous fermentations, measured by density, was very variable (Figure 1). Variety '436' completed fermentation in five days, while '467' and 'Golden Delicious' did so in 24 days. For their part, '*Malus x Micromalus*', 'Rayada', '429b' and 'Joya' did not finish the fermentation process. Many factors are involved in the development of fermentation, including the concentration of nutrients, the way in which the added sulphurous anhydride is combined, and the type of microorganisms present in the apple must, as they can compete with the fermentative yeasts for space

líneas de burbujas que se forman en el seno del líquido y ascienden a la superficie), d) diámetro de la burbuja y e) velocidad de la efervescencia. En la segunda se evaluó la aceptabilidad de la apariencia, el aroma y el sabor (Soto-Herrera et al., 2008).

Identificación de las levaduras seleccionadas

La identificación a nivel especie de las levaduras seleccionadas se realizó mediante amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y posterior secuenciación de la región ITS1/ITS4 con los oligonucleótidos ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), utilizando las siguientes condiciones: 2 min a 95 °C, 35 ciclos (30 s a 95 °C, 1 min a 56.75 °C y 1 min a 72 °C) y 10 min a 72 °C. Los amplicones se enviaron al LANBAMA del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT, SLP) para su purificación y posterior secuenciación con la técnica de Sanger y un analizador genético (3130 Genetic analyzer, Thermo Fisher®, EUA). Las secuencias obtenidas se compararon con las del *GenBank* mediante el programa Blast.

Análisis estadísticos

Se empleó un diseño experimental unifactorial completamente al azar con distinto número de repeticiones, siendo el factor de estudio las cepas de levaduras. Todas las determinaciones para la preselección de las levaduras se realizaron por triplicado. Los datos de las variables cuantitativas se sometieron a un análisis de varianza y una comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$), para lo cual se utilizó el programa estadístico JMP versión 11. Para determinar diferencias entre las características sensoriales de las sidras, se utilizó la prueba de Friedman con el programa Prism-GraphPad.

Resultados y discusión

Características iniciales del mosto

El Cuadro 1 muestra las características iniciales de cada variedad de manzana empleada, y se puede observar que presentan diferencias importantes entre ellas. Los mayores rendimientos de mosto se obtuvieron con '429a', '428', 'Red Delicious' y 'Rayada' (0.45, 0.45, 0.44 y 0.43 L·kg⁻¹ de manzana, respectivamente), los cuales contrastan con '*Malus x Micromalus*' (0.26 L·kg⁻¹ de manzana); esto debido, probablemente, al bajo porcentaje de jugo y mayor firmeza de la pulpa de '*Malus x Micromalus*'. La mayor concentración de azúcares se presentó en 'Agua Nueva' y 'Royal Gala' (17 °Brix), lo que difiere de la obtenida con '424' y 'Rayada' (11.2 y 11.4 °Brix, respectivamente). Finalmente, el mayor

Table 1. Initial must characteristics of different apple varieties.

Cuadro 1. Características iniciales de los mostos de diversas variedades de manzana.

Apple variety / Variedad de manzana	Yield (L.kg ⁻¹ of apple) / Rendimiento (L.kg ⁻¹ de manzana)	Sugars (°Brix) / Azúcares (°Brix)	Density (g.mL ⁻¹) / Densidad (g.mL ⁻¹)	pH
429a	0.45	12.2	1.049	3.27
Rayada	0.43	11.4	1.043	3.21
Red Delicious	0.44	11.6	1.043	3.64
428	0.45	12.8	1.047	4.37
424	0.33	11.2	1.044	3.51
<i>Malus x Micromalus</i>	0.26	15.0	1.058	2.97
467	0.30	12.0	1.043	3.32
Joya	0.31	12.0	1.044	4.10
429b	0.29	12.0	1.047	3.31
Golden Delicious	0.30	15.4	1.062	3.36
Agua Nueva	0.40	17.0	1.066	3.32
436	0.31	14.2	1.054	4.45
Royal Gala	0.29	17.0	1.069	3.26
Rosada	0.36	14.4	1.060	3.46

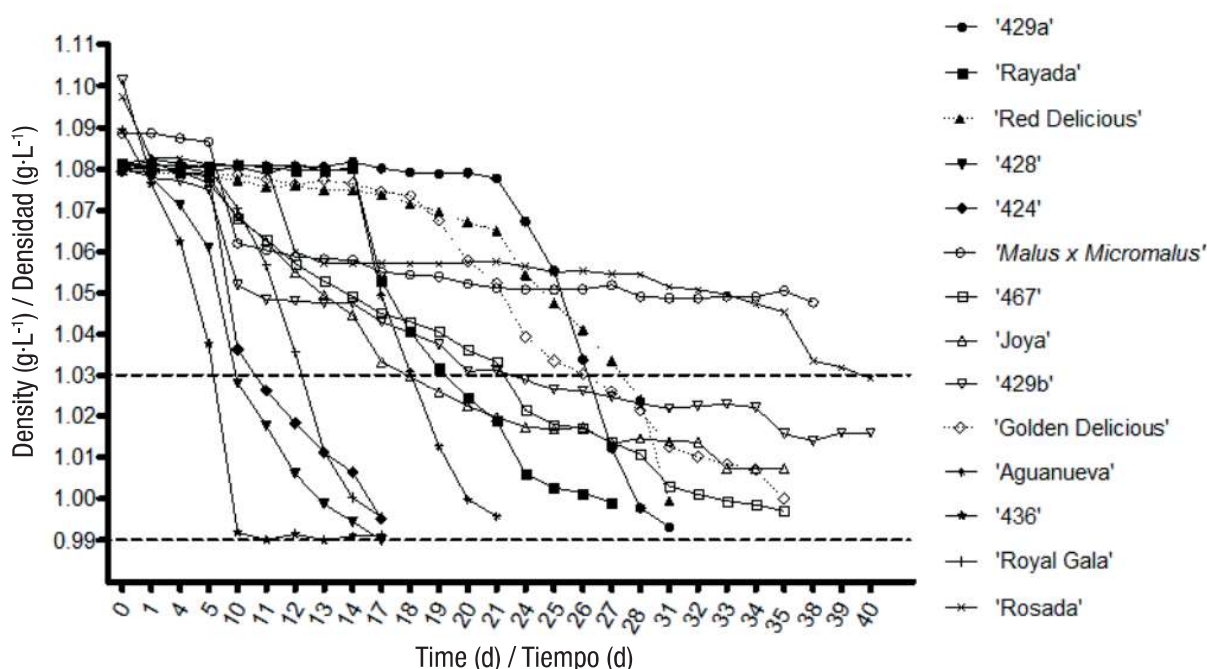


Figure 1. Evolution of the must density of 14 apple varieties.

Figura 1. Evolución de la densidad del mosto de 14 variedades de manzana.

and nutrients, or produce protein-type compounds (killer effect) or short- or medium-chain fatty acids that inhibit fermentation (Irastorza & Dueñas, 2010). Rapid fermentation is generally preferred, as otherwise there is a risk of microbiological contamination and increased production costs.

From the spontaneous fermentations produced with the 14 varieties, 135 yeasts were isolated, as it was

valor de pH lo tuvo el mosto obtenido con '428' (pH = 4.37), y el menor valor lo presentó '*Malus x Micromalus*' (pH = 2.97).

Aislamiento y diferenciación de levaduras

La evolución de las fermentaciones espontáneas, medidas por la densidad, resultó muy variable (Figura 1). La variedad '436' finalizó la fermentación a los cinco

not possible to recover viable yeasts from variety '429' at the end of fermentation. This is probably because none of the yeasts were able to tolerate the inhibitory conditions generated during the fermentation of this variety. Of the 135 isolated yeasts, 102 (75.5 %) corresponded to the genus *Saccharomyces*, which coincides with the findings reported by Suárez-Valles et al. (2008), who obtained 70 % *Saccharomyces* spp. yeasts in isolations carried out at different stages of cider fermentation.

Characterization and selection of yeast strains

Two factors were considered in the selection of *Saccharomyces* spp. yeasts: β -glucosidase activity and the presence of the killer phenotype. Of the initial 102 strains, 60 (58.8 %) had β -glucosidase activity, which contrasts with Pando-Bedriñana et al. (2010), who found only 2 of 134 strains. The divergence of the results may be due to the fact that in this study the yeasts were isolated from 14 varieties, separately, while in the reported work the isolates were made in Asturian cider cellars, frequently prepared with mixtures (Boletín Oficial de Estado [BOE], 2003). A greater number of varieties obtained from the field increases the possibilities of obtaining phenotypic diversity from isolated microorganisms.

Glucosylated terpenes present in apples can be hydrolyzed by β -glucosidase, which releases volatile compounds that enhance the aroma and reveal typical varietal characteristics (Carrau, Dellacassa, & Boido, 2008). However, the presence of the enzyme does not ensure its action in the fermentation medium, because it is associated with the yeast cell wall, which makes it susceptible to inhibition by ethanol (Mateo & Maicas, 2016).

On the other hand, of the total initial strains, only 18 (17.5 %) presented killer effect. These results contrast with what was reported by Pando-Bedriñana et al. (2010), who observed that of 134 strains isolated from cider, only two (1.9 %) exhibited this effect. These differences may be due to the origin of the yeasts. In the field, yeasts compete with a greater diversity of microorganisms, so they must develop mechanisms, such as the killer phenotype, to survive; in wineries, on the other hand, yeasts are adapted to the limiting conditions of the environment, which favor not requiring certain antagonistic mechanisms.

The secretion of toxins that inhibit the development of susceptible microorganisms acts as a mechanism for regulating population dynamics in microbial ecosystems and is considered a favorable factor for the selection of fermentative microorganisms, since they provide a competitive advantage. The susceptibility to

días, mientras que '467' y 'Golden Delicious' lo hicieron en 24 días. Por su parte, 'Malus x Micromalus', 'Rayada', '429b' y 'Joya' no finalizaron el proceso fermentativo. Los factores que intervienen en el desarrollo de la fermentación son muchos, entre ellos la concentración de nutrientes, la forma en que se combina el anhídrido sulfuroso adicionado, así como los tipos de microorganismos presentes en el mosto de la manzana, ya que éstos pueden competir con las levaduras fermentativas por espacio y nutrientes, o producir compuestos de tipo proteico (efecto *killer*) o ácidos grasos de cadena corta o media que inhiban la fermentación (Irastorza & Dueñas, 2010). En general, se prefiere una fermentación rápida, ya que de lo contrario se corre el riesgo de contaminación microbiológica y aumentan los costos de producción.

De las fermentaciones espontáneas producidas con las 14 variedades se aislaron 135 levaduras, ya que no fue posible recuperar levaduras viables de la variedad '429' al final de la fermentación. Lo anterior debido, probablemente, a que ninguna de las levaduras fue capaz de tolerar las condiciones inhibitorias que se generaron durante la fermentación de esta variedad. De las 135 levaduras aisladas, 102 (75.5 %) correspondieron al género *Saccharomyces*, lo que coincide con lo reportado por Suárez-Valles et al. (2008), quienes obtuvieron 70 % de levaduras *Saccharomyces* spp. en aislamientos realizados en diferentes etapas de la fermentación de sidra.

Caracterización y selección de las cepas de levaduras

Para seleccionar las levaduras *Saccharomyces* spp. se consideraron dos factores: la actividad β -glucosidasa y la presencia de fenotipo *killer*. De las 102 cepas iniciales, 60 (58.8 %) presentaron actividad β -glucosidasa, lo que contrasta con Pando-Bedriñana et al. (2010), quienes únicamente encontraron 2 de 134 cepas. La divergencia de los resultados puede deberse a que en este estudio las levaduras se aislaron de 14 variedades, por separado, mientras que en el trabajo reportado los aislamientos se realizaron en bodegas de sidra asturiana, frecuentemente elaborada con mezclas (Boletín Oficial de Estado [BOE], 2003). Un mayor número de variedades obtenidas del campo aumenta las posibilidades de obtener diversidad fenotípica de los microorganismos aislados.

Los terpenos glucosilados presentes en la manzana se pueden hidrolizar por la β -glucosidasa, lo que libera compuestos volátiles que potencian el aroma y permiten revelar características varietales típicas (Carrau, Dellacassa, & Boido, 2008). Sin embargo, la presencia de la enzima no asegura su acción en el medio fermentativo, debido a que se encuentra asociada con la pared celular de la levadura, lo que la hace susceptible a la inhibición por etanol (Mateo & Maicas, 2016).

these toxins is regulated by receptors in the cell wall of the sensitive microorganism (García, Esteve-Zarzozo, & Arroyo, 2016).

In total, 66 strains showed one or two characteristics indicated above, so for the rest of the tests only these were considered (Table 2).

Por otro lado, del total de cepas iniciales, únicamente 18 (17.5 %) presentaron efecto *killer*. Estos resultados contrastan con lo reportado por Pando-Bedriñana et al. (2010), quienes observaron que de 134 cepas aisladas de sidra, únicamente dos (1.9 %) exhibieron dicho efecto. Estas diferencias pueden ser debidas a la procedencia de las levaduras. En el campo, las levaduras compiten con

Table 2. Phenotypic characterization for the selection of cider fermenting yeasts.

Cuadro 2. Caracterización fenotípica para la selección de levaduras fermentadoras de sidra.

Apple variety/ Variedad de manzana	Strain/ Cepa	Positive aspects/ Aspectos positivos	β -glucosidase/ β -glucosidasa	Killer effect/ Efecto <i>killer</i>	Flocculation/ Floculación	Fermentation rate/ Velocidad de fermentación	Tolerance to ethanol and SO ₂ / Tolerancia al etanol y SO ₂	Fermentation stage/ Etapa de la fermentación
-	k1	5	+	+	Medium/Media	Medium/Media	+	-
<i>Malus x Micromalus</i>	MM7	5	+	+	Medium/Media	Medium/Media	+	Final
Royal Gala	RG6	5	+	+	Medium/Media	Fast/Rápida	+	Final
436	436.4	5	+	+	Medium/Media	Fast/Rápida	+	Intermediate/Intermedia
Red Delicious	RD4	4	+	+	Medium/Media	Medium/Media	-	Intermediate/Intermedia
428	428.5	4	+	+	Medium/Media	Medium/Media	-	Intermediate/Intermedia
Agua Nueva	AN7	4	+	-	High/Elevada	Fast/Rápida	+	Final
Rayada	RY3	4	+	-	Medium/Media	Fast/Rápida	+	Intermediate/Intermedia
Royal Gala	RG4	4	+	-	Medium/Media	Fast/Rápida	+	Intermediate/Intermedia
428	428.6	4	+	-	Medium/Media	Medium/Media	+	Final
429a	429 ^a .9	4	+	-	Medium/Media	Fast/Rápida	+	Final
436	436.5	4	-	+	Medium/Media	Medium/Media	+	Intermediate/Intermedia
467	461.1	4	+	-	Medium/Media	Fast/Rápida	+	Intermediate/Intermedia
467	467.2	3	+	+	Slight/Poca	Medium/Media	-	Intermediate/Intermedia
467	467.4	3	+	+	Slight/Poca	Medium/Media	-	Intermediate/Intermedia
467	467.5	3	+	+	Slight/Poca	Medium/Media	-	Intermediate/Intermedia
Red Delicious	RD3	3	+	+	Slight/Poca	Fast/Rápida	-	Intermediate/Intermedia
428	428.3	3	+	+	Slight/Poca	Medium/Media	-	Intermediate/Intermedia
Red Delicious	RD2	3	+	-	Medium/Media	Fast/Rápida	-	Intermediate/Intermedia
Agua Nueva	AN5	3	+	-	Medium/Media	Medium/Media	-	Intermediate/Intermedia
Agua Nueva	AN10	3	+	-	High/Elevada	Fast/Rápida	-	Final
Agua Nueva	AN8	3	+	-	High/Elevada	Fast/Rápida	-	Final
Joya	JY4	3	+	-	Medium/Media	Slow/Lenta	+	Intermediate/Intermedia
Royal Gala	RG7	3	+	-	Medium/Media	Fast/Rápida	-	Final
Royal Gala	RG8	3	+	-	Medium/Media	Fast/Rápida	-	Final
424	424.4	3	+	-	Medium/Media	Fast/Rápida	-	Intermediate/Intermedia
428	428.4	3	+	-	Medium/Media	Medium/Media	-	Intermediate/Intermedia
428	428.8	3	+	-	Medium/Media	Fast/Rápida	-	Final
429a	429.10	3	+	-	Medium/Media	Fast/Rápida	-	Final
436	436.3	3	+	-	High/Elevada	Fast/Rápida	-	Intermediate/Intermedia
436	436.9	3	+	-	Medium/Media	Medium/Media	-	Final
436	436.10	3	+	-	Medium/Media	Medium/Media	-	Final
Rayada	RY5	3	-	+	Slight/Poca	Medium/Media	+	Intermediate/Intermedia
Rayada	RY9	3	-	+	Slight/Poca	Fast/Rápida	+	Final

Table 2. Phenotypic characterization for the selection of cider fermenting yeasts. (cont.)

Cuadro 2. Caracterización fenotípica para la selección de levaduras fermentadoras de sidra. (cont.)

Apple variety/ Variedad de manzana	Strain/ Cepa	Positive aspects/ Aspectos positivos	β -glucosidase/ β -glucosidasa	Killer effect/ Efecto killer	Flocculation/ Floculación	Fermentation rate/ Velocidad de fermentación	Tolerance to ethanol and SO ₂ / Tolerancia al etanol y SO ₂	Fermentation stage/ Etapa de la fermentación
Rayada	RY10	3	-	+	Slight/Poca	Medium/Media	+	Final
Royal Gala	RG10	2	+	-	Slight/Poca	Fast/Rápida	-	Final
436	436.2	2	+	-	Slight/Poca	Fast/Rápida	-	Intermediate/Intermedia
Royal Gala	RG3	2	-	+	Slight/Poca	Slow/Lenta	-	Intermediate/Intermedia
424	424.5	2	+	+	Slight/Poca	Slow/Lenta	-	Intermediate/Intermedia
428	428.2	2	+	+	Slight/Poca	Slow/Lenta	-	Intermediate/Intermedia
Joya	JY1	2	+	+	Slight/Poca	Slow/Lenta	-	Intermediate/Intermedia
428	428.1	2	+	-	Medium/Media	Slow/Lenta	-	Intermediate/Intermedia
436	436.1	2	+	-	Medium/Media	Slow/Lenta	-	Intermediate/Intermedia
436	436.2	2	+	-	Medium/Media	Slow/Lenta	-	Intermediate/Intermedia
436	436.7	2	+	-	Medium/Media	Slow/Lenta	-	Final
Golden Delicious	GD10	1	+	-	Slight/Poca	Slow/Lenta	NE ¹	Final
Red Delicious	RD7	1	+	-	Slight/Poca	Slow/Lenta	NE	Final
Agua Nueva	AN1	1	+	-	Slight/Poca	Slow/Lenta	NE	Intermediate/Intermedia
Agua Nueva	AN2	1	+	-	Slight/Poca	Slow/Lenta	NE	Intermediate/Intermedia
Agua Nueva	AN3	1	+	-	Slight/Poca	Slow/Lenta	NE	Intermediate/Intermedia
Agua Nueva	AN4	1	+	-	Slight/Poca	Slow/Lenta	NE	Intermediate/Intermedia
Agua Nueva	AN6	1	+	-	Slight/Poca	Slow/Lenta	NE	Final
Joya	JY6	1	+	-	Slight/Poca	Slow/Lenta	NE	Final
Joya	JY8	1	+	-	Slight/Poca	Slow/Lenta	NE	Final
Malus x Micromalus	MM4	1	+	-	Slight/Poca	Slow/Lenta	NE	Intermediate/Intermedia
Malus x Micromalus	MM8	1	+	-	Slight/Poca	Slow/Lenta	NE	Final
Rayada	RY1	1	+	-	Slight/Poca	Slow/Lenta	NE	Intermediate/Intermedia
424	424.3	1	+	-	Slight/Poca	Slow/Lenta	NE	Intermediate/Intermedia
424	424.7	1	+	-	Slight/Poca	Slow/Lenta	NE	Final
424	424.9	1	+	-	Slight/Poca	Slow/Lenta	NE	Final
428	428.7	1	+	-	Slight/Poca	Slow/Lenta	NE	Final
436	436.6	1	+	-	Slight/Poca	Slow/Lenta	NE	Final
467	467.3	1	+	-	Slight/Poca	Slow/Lenta	NE	Intermediate/Intermedia
467	467.6	1	+	-	Slight/Poca	Slow/Lenta	NE	Final
467	467.7	1	+	-	Slight/Poca	Slow/Lenta	NE	Final
467	467.8	1	+	-	Slight/Poca	Slow/Lenta	NE	Final

Strains are ordered from highest to lowest number of characteristics presented considered to be positive. The symbols indicate presence (+) or absence (-) of the aspect evaluated in each strain. ¹NE = phenotype not evaluated due to lack of other desirable traits.

Las cepas se encuentran ordenadas de mayor a menor número de características presentadas consideradas como positivas. Los símbolos indican presencia (+) o ausencia (-) del aspecto evaluado en cada cepa. ¹NE = fenotipo no evaluado debido a la falta de otras características deseables.

Regarding flocculant capacity, 30 of the 66 yeasts evaluated were moderately or highly flocculant according to the scale proposed by Suárez-Valles et al. (2008). This characteristic is essential for yeasts, mainly in the second fermentation by the champenoise method, since to eliminate the lees in the disgorging

una mayor diversidad de microorganismos, por lo que deben desarrollar mecanismos, como el fenotipo *killer*, para sobrevivir; mientras que en bodegas, las levaduras se encuentran adaptadas a las condiciones limitantes del medio, las cuales favorecen el no requerir ciertos mecanismos antagónicos.

process it is required that the yeast has the capacity to generate flocs and precipitate without adding any clarifier (Garofalo et al., 2016).

In terms of fermentation rate, 38 strains showed medium or high values, which depends on the ability of each yeast to respond to stress conditions: nutrient content of the must, temperature, ethanol or fatty acid toxicity, and proportion of nitrogen sources, among others (Irastorza & Dueñas, 2010; Varela, Pizarro, & Agosin, 2004). For selection purposes, if fermentation is slow, there is a risk of contamination and production costs increase as fermentation tanks are used longer; however, if it is very fast, the temperature tends to increase, which causes fermentation to stop and there is a loss of aromatic compounds. High temperature and fast fermentation are considered controllable by cooling systems, so medium to high speeds are recommended (Bisson & Batszuke, 2000).

To assess the tolerance of the strains to ethanol and SO_2 , only the 45 strains (including K1-V1116) that had at least two of the four previously evaluated traits (killer effect, β -glucosidase, flocculation and fermentation rate) were considered. The presence of turbidity in the medium containing 8 % ethanol and $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ of SO_2 , after a 48 h incubation, indicated yeast growth and, therefore, tolerance to these two compounds; 15 strains with this trait stood out in the test (Table 2).

Ethanol is one of the most inhibitory compounds formed during fermentation, as it affects plasma membrane fluidity, vacuole morphology, glycolytic enzyme activity and mitochondrial DNA (Miranda et al., 2017). Mukherjee et al. (2014) report that some yeast strains may grow or survive in the presence of ethanol due to certain alleles that counteract the toxic effects of this compound. Likewise, sterols and unsaturated fatty acids synthesized in the presence of oxygen, such as palmitoleic acid (D9-cisC16:1) and oleic acid (D9-cisC18:1), play a fundamental role in ethanol tolerance (García, Quintero, & López-Munguía, 2004). In addition, it is important that the selected yeasts tolerate high concentrations of SO_2 , as this will allow them to survive being sulphited, which will help them to impose themselves on wild yeasts (Ubeda, Briones, Izquierdo, & Palop, 1995). The test carried out (combining two inhibitors) is more demanding and more representative than the condition presented in the fermentation medium, where various factors that limit the development of microorganisms interact.

Of the 66 yeasts evaluated, four (including reference K1-V1116) showed the five desirable traits, while 34 (51 %) presented at least three of these traits (Table 2). Of the latter, 19 (56 %) were isolated halfway through fermentation and 15 (44 %) at the end of the process, a stage in which yeasts with the best fermentative

La secreción de toxinas que inhiben el desarrollo de microorganismos susceptibles funge como un mecanismo de regulación de la dinámica poblacional en los ecosistemas microbianos y se considera un factor favorable para la selección de microorganismos fermentativos, pues brindan una ventaja competitiva. La susceptibilidad a estas toxinas está regulada por receptores en la pared celular del microorganismo sensible (García, Esteve-Zarzozo, & Arroyo, 2016).

En total, 66 cepas mostraron una o dos características señaladas anteriormente, por lo que para el resto de las pruebas sólo se consideraron éstas (Cuadro 2).

Respecto a la capacidad floculante, 30 levaduras, de las 66 evaluadas, resultaron mediana o altamente floculantes de acuerdo con la escala propuesta por Suárez-Valles et al. (2008). Esta característica resulta fundamental para las levaduras, principalmente en la segunda fermentación por el método *champenoise*, ya que para eliminar las lías en el degüelle se requiere que la levadura tenga la capacidad de generar flóculos y precipitar sin añadir ningún clarificante (Garofalo et al., 2016).

En cuanto a la velocidad de fermentación, 38 cepas mostraron valores medios o altos, lo cual depende de la capacidad de cada levadura para responder a las condiciones de estrés: contenido de nutrientes del mosto, temperatura, toxicidad por etanol o por ácidos grasos, proporción de fuentes de nitrógeno, entre otras (Irastorza & Dueñas, 2010; Varela, Pizarro, & Agosin, 2004). Para fines de selección, si la fermentación es lenta se corre el riesgo de contaminación y aumentan los costos de producción al usarse por más tiempo los tanques de fermentación; no obstante, si es muy rápida, la temperatura tiende a incrementar, lo que causa que se detenga la fermentación y haya pérdida de compuestos aromáticos. La temperatura alta y la fermentación rápida se consideran controlables mediante sistemas de enfriamiento, por lo que resultan recomendables velocidades medias a altas (Bisson & Batszuke, 2000).

Para evaluar la tolerancia de las cepas a etanol y a SO_2 , se consideraron únicamente las 45 cepas (incluyendo K1-V1116) que presentaron al menos dos de las cuatro características evaluadas previamente (efecto *killer*, β -glucosidasa, floculación y velocidad de fermentación). La presencia de turbidez en el medio que contenía 8 % de etanol y $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de SO_2 , después de una incubación de 48 h, indicó crecimiento de las levaduras y, por lo tanto, tolerancia a estos dos compuestos; en la prueba destacaron 15 cepas con esta característica (Cuadro 2).

El etanol es uno de los compuestos más inhibitorios que se forman durante la fermentación, ya que afecta la fluidez de la membrana plasmática, la morfología

characteristics were expected to predominate, as they would be adapted to the medium and would tolerate the most inhibitory conditions present in advanced stages of fermentation (Steensels & Verstrepen, 2014).

Regarding apple varieties, those with the highest number of strains with at least two desirable traits were '436' (rapid fermentation), '428' and 'Royal Gala' (with eight, seven and six strains, respectively), and with '467', 'Agua Nueva' and 'Rayada' four strains were found. The varieties that contributed strains with three or fewer desirable traits were 'Red Delicious', '424', '429b', 'Joya', '*Malus x Micromalus*' and 'Golden Delicious'. In general, the varieties where fermentation was not completed, or where it took longer, were those with the fewest number of strains with positive traits; however, strain MM7, from incomplete fermentation, manifested the five desirable traits evaluated.

Considering the above results, ten strains were selected for the following tests: three that presented the five traits evaluated (MM7, 436.4 and RG6), three with four traits (AN5, RG8 and 429a.9) and four with three traits (428.3, RY3, RY5 and 428.6). In this way, different varieties and different combinations of aspects of interest were covered.

Pressure tolerance

Figure 2 shows a similar behavior in the evolution of the pressure in the bottle generated by the different yeast strains throughout the process, with the exception of

de la vacuola, la actividad de enzimas glucolíticas y el ADN mitocondrial (Miranda et al., 2017). Mukherjee et al. (2014) mencionan que algunas cepas de levaduras pueden crecer o sobrevivir en presencia de etanol debido a ciertos alelos que permiten contrarrestar los efectos tóxicos de este compuesto. Asimismo, los esteroides y los ácidos grasos insaturados sintetizados en presencia de oxígeno, como el palmitoleico (D9-cisC16:1) y el oleico (D9-cisC18:1), juegan un papel fundamental en la tolerancia a etanol (García, Quintero, & López-Munguía, 2004). Además, es importante que las levaduras seleccionadas toleren concentraciones altas de SO_2 , ya que esto les permitirá sobrevivir al sulfitado, lo que les ayudará a imponerse sobre las levaduras silvestres (Ubeda, Briones, Izquierdo, & Palop, 1995). La prueba realizada (combinando dos inhibidores) resulta más exigente y más representativa que la condición que se presenta en el medio de fermentación, donde interactúan diversos factores que limitan el desarrollo de los microorganismos.

De las 66 levaduras evaluadas, cuatro (incluida la de referencia K1-V1116) mostraron las cinco características deseables consideradas, mientras 34 (51 %) presentaron al menos tres de dichas características (Cuadro 2). De estas últimas, 19 (56 %) se aislaron a la mitad de la fermentación y 15 (44 %) al final del proceso; etapa en la que se esperaba que predominaran las levaduras con las mejores características fermentativas, ya que estarían adaptadas al medio y tolerarían las condiciones más inhibitorias presentes en estados avanzados de la fermentación (Steensels & Verstrepen, 2014).

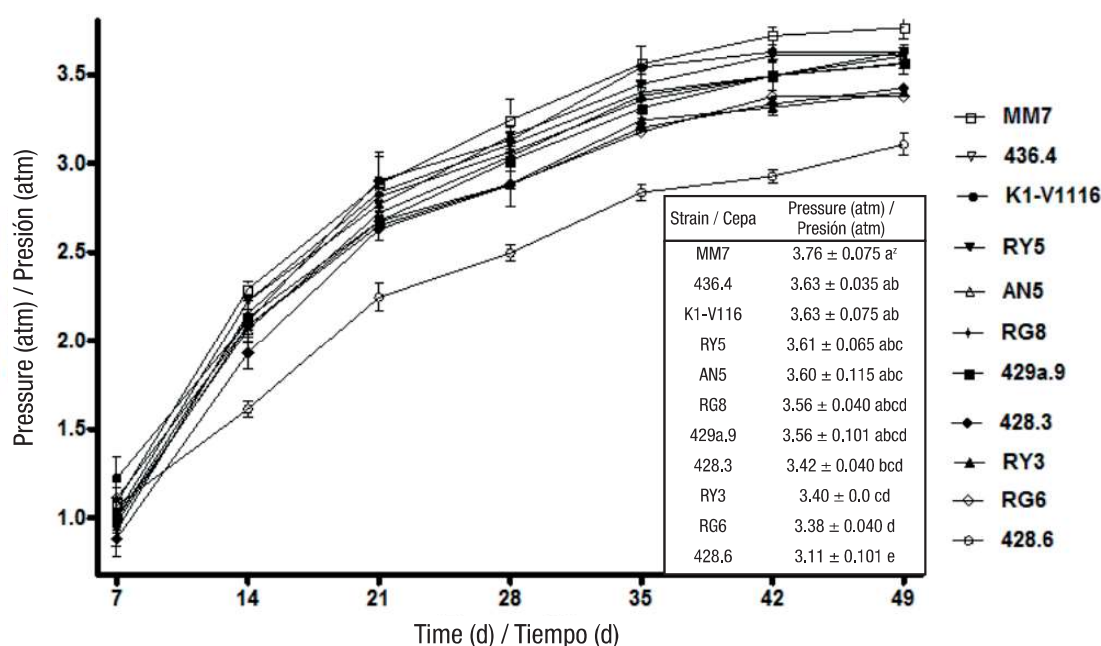


Figure 2. Pressure generated by ten strains of native yeasts and commercial control K1-V1116 inside bottles. ²Means with the same letter do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

Figura 2. Presión generada por diez cepas de levaduras nativas y el control comercial K1-V1116 al interior de botellas. ²Medias con la misma letra no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

strain 428.6, which generated a lower pressure than the rest of the yeasts. After 49 days, there were differences among the yeasts, especially MM7, a strain similar to the commercial control K1-V1116 and contrasting with 428.6.

The carbon dioxide in the medium is inhibitory to yeasts, as it can slightly lower the pH, although, fundamentally, it increases atmospheric pressure, which limits the development of microorganisms. Yeasts tolerate around 7 atm (maximum reached in sparkling wines), as a higher pressure inhibits their metabolism and slows their development (Borrull, Poblet, & Rozès, 2015). Like many types of stress, pressure decreases the cell cycle and reduces the viability of microorganisms as it increases; above 30 atm it generates inhibition and when it is greater than 500 atm it alters the morphology of microorganisms. Additionally, it is known that, like other stressors, pressure can generate cross-tolerance; that is, barotolerance can be acquired by sublethal pretreatment with other stressors such as temperature, ethanol or the same pressure (Fernandes, 2005).

Behavior of selected native yeasts in the production of sparkling cider

Considering the above tests, strain MM7 was selected for the first fermentation, as it presented the killer effect, β -glucosidase activity and average fermentation speed. For the second fermentation, MM7 and 436.4 were chosen, as they presented the five desirable traits, and RY5 which presented three of these traits, including killer effect, average fermentation speed and tolerance to ethanol and SO_2 ; in addition, these three strains were the most pressure tolerant. Also, commercial yeast K1-V1116 was included.

The first fermentation took place normally, reaching a constant density by the sixth day, which indicated its end. The evolution of the second fermentation, measured by the pressure increase in the bottle, is shown in Figure 3 where it can be observed that by day seven the reference yeast K1-V1116 already had a pressure of 5.10 atm, followed by 436.4 (4.39 atm), MM7 (3.25 atm) and RY5 (2.91). Day 21 was considered the end of the second fermentation, at which time K1-V1116, 436.4 and MM7 reached a similar pressure (5.93, 5.83 and 5.75 atm, respectively), being higher than RY5 (5.49 atm).

During the second fermentation, the CO_2 produced raises the internal pressure of the bottle and generates effervescence at the time of serving (Liger-Belair et al., 2009). It is considered that 5 g·L⁻¹ of sugar increases the pressure by approximately 1 atm (Navarre, 1998), which coincides with this study, because with 30 g·L⁻¹ of sugar, about 6 atm of pressure were obtained with the four strains evaluated. Yeast RY5 was the least efficient in this respect, which coincides with the fact that it

Respecto a las variedades de manzana, las que presentaron el mayor número de cepas con al menos dos características deseables fueron '436' (rápida fermentación), '428' y 'Royal Gala' (con ocho, siete y seis cepas, respectivamente), mientras que con '467', 'Agua Nueva' y 'Rayada' se encontraron cuatro cepas. Las variedades que aportaron cepas con tres o menos características deseables fueron 'Red Delicious', '424', '429b', 'Joya', '*Malus x Micromalus*' y 'Golden Delicious'. De manera general, las variedades donde no se finalizó la fermentación, o donde tardó más, fueron las que tuvieron menor número de cepas con características positivas; sin embargo, la cepa MM7, proveniente de una fermentación incompleta, manifestó las cinco características deseables evaluadas.

Considerando los resultados anteriores, se seleccionaron diez cepas para las pruebas siguientes: tres que presentaron las cinco características evaluadas (MM7, 436.4 y RG6), tres con cuatro características (AN5, RG8 y 429a.9) y cuatro con tres características (428.3, RY3, RY5 y 428.6). De esta manera se cubrieron distintas variedades y diferentes combinaciones de aspectos de interés.

Tolerancia a la presión

En la Figura 2 se observa un comportamiento similar de la evolución de la presión generada en la botella por las distintas cepas de levaduras a lo largo del proceso, a excepción de la cepa 428.6, la cual generó una presión inferior al resto de las levaduras. Después de 49 días, se presentan diferencias entre las levaduras, destacando MM7, cepa similar al testigo comercial K1-V1116 y contrastante con 428.6.

El dióxido de carbono en el medio resulta inhibitorio para las levaduras, ya que puede disminuir ligeramente el pH, aunque, fundamentalmente, aumenta la presión atmosférica, lo que limita el desarrollo de los microorganismos. Las levaduras toleran alrededor de 7 atm (máxima alcanzada en vinos espumosos), una presión mayor inhibe su metabolismo y ralentiza su desarrollo (Borrull, Poblet, & Rozès, 2015). Como muchos tipos de estrés, la presión disminuye el ciclo celular y reduce la viabilidad de los microorganismos conforme aumenta; por encima de 30 atm genera inhibición y cuando es mayor a 500 atm altera la morfología de los microorganismos. Adicionalmente, se sabe que, como otros agentes causantes de estrés, la presión puede generar una tolerancia cruzada; es decir, la barotolerancia puede ser adquirida mediante pretratamientos subletales con otros agentes estresantes como temperatura, etanol o la misma presión (Fernandes, 2005).

Comportamiento de levaduras nativas seleccionadas en la elaboración de sidra espumosa

Considerando las pruebas anteriores, se seleccionó la cepa MM7 para la primera fermentación, ya que

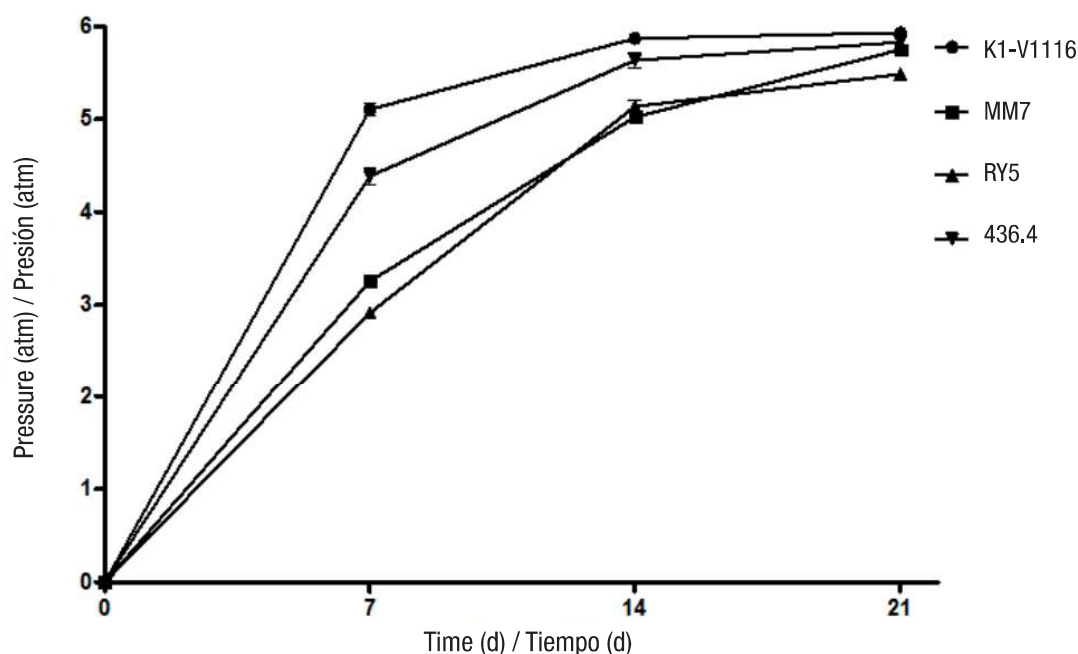


Figure 3. Evolution of the pressure in the bottle as a function of the yeast used for the second fermentation of base cider. Means of six observations $\pm$ standard error.

Figura 3. Evolución de la presión de la botella en función de la levadura utilizada para la segunda fermentación de la sidra tranquila. Medias de seis observaciones $\pm$ error estándar.

was the least outstanding of the three in the other selection criteria.

With respect to the physical and chemical analysis of the ciders (Table 3), the three strains selected obtained values similar to those of the commercial strain. The ABV fluctuated between 8.13 and 8.89, being higher with strain RY5. The RS ranged from 1.65 to 1.96 g·L⁻¹, which corresponds to complete fermentations. The VA ranged from 0.04 to 0.48 g·L⁻¹, obtaining the highest concentration with RY5; pH, from 3.61 to 3.66; TTA, from 4.05 to 4.28 g·L⁻¹, and SO₂, from 202 to 226 mg·L⁻¹, values that are within the standards established by the Mexican official standard for alcoholic beverages (NOM-199-SCFI-2017, 2017).

presentó efecto *killer*, actividad β -glucosidasa y velocidad de fermentación media. Para la segunda fermentación se eligieron MM7 y 436.4, las cuales presentaron las cinco características deseables, y RY5 que presentó tres de dichas características, incluyendo efecto *killer*, velocidad de fermentación media y tolerancia a etanol y SO₂; además, estas tres cepas fueron las más tolerantes a la presión. Adicionalmente, se incluyó la levadura comercial K1-V1116.

La primera fermentación transcurrió de forma normal, alcanzando una densidad constante hacia el sexto día, lo que indicó su término. La evolución de la segunda fermentación, medida por el incremento de la presión en la botella, se presenta en la Figura 3 y se puede

Table 3. Physical and chemical characteristics of sparkling ciders as a function of the yeast used in the second fermentation.

Cuadro 3. Características físicas y químicas de sidras espumosas en función de la levadura utilizada en la segunda fermentación.

Treatment ¹ / Tratamiento ¹	ABV/ GA (°GL)	RS (g·L ⁻¹)/ AR (g·L ⁻¹)	TTA (g·L ⁻¹)/ ATT (g·L ⁻¹)	pH	VA (g·L ⁻¹)/ AV (g·L ⁻¹)	SO ₂ (mg·L ⁻¹)
MM7-K1-V1116	8.57 $\pm$ 0.05 b ²	1.65 $\pm$ 0.01 c	4.28 $\pm$ 0.03 a	3.66 $\pm$ 0.01 a	0.05 $\pm$ 0.03 b	226.13 $\pm$ 9.4 a
MM7-MM7	8.59 $\pm$ 0.05 b	1.96 $\pm$ 0.03 a	4.05 $\pm$ 0.03 c	3.64 $\pm$ 0.03 ab	0.07 $\pm$ 0.03 b	221.87 $\pm$ 0.9 a
MM7-436.4	8.13 $\pm$ 0.08 c	1.78 $\pm$ 0.01 b	4.21 $\pm$ 0.03 b	3.61 $\pm$ 0.02 b	0.04 $\pm$ 0.03 b	202.99 $\pm$ 13 a
MM7-RY5	8.89 $\pm$ 0.05 a	1.80 $\pm$ 0.03 b	4.21 $\pm$ 0.03 b	3.61 $\pm$ 0.01 ab	0.48 $\pm$ 0.03 a	205.3 $\pm$ 12 a

¹Yeast strain used for the first fermentation + strain used for the second fermentation; ABV = alcohol by volume; RS: residual sugars; TTA: total titratable acidity; VA = volatile acidity. ²Means with the same letter within each column do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

¹Cepa de levadura usada para la primera fermentación + cepa usada para la segunda fermentación; GA = grado alcohólico; AR: azúcares residuales; ATT: acidez total titulable; AV = acidez volátil. ²Medias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

Sensory analysis

The Friedman test showed significant differences ($P \leq 0.05$) in all sensory variables evaluated (Table 4). At crown height, cider made with 436.4 obtained the highest value in the rank sum (RS = 34.5), corresponding to a greater preference. According to Esteruelas et al. (2015), ciders are expected to have a higher crown height at the time of serving. K1-V1116 achieved the highest values for crown reduction time (RS = 40.0), number of trains (RS = 38.5) and bubble diameter (RS = 37.5); the highest values in this last variable indicate smaller bubbles. Finally, with strains MM7 and 436.4, the highest effervescence speed values were obtained (higher speed in the ascent of the bubbles to the liquid surface) (RS = 36.0 and 34.0, respectively).

Effervescence is a key attribute in sparkling beverages, as it is the first thing consumers perceive (Brissonnet & Maujean, 1993; González, 2010). The yeast used in the second fermentation of sparkling cider affects its composition, mainly due to the speed of autolysis that allows the release of polysaccharides, proteins, peptides, free amino acids, lipids and nucleotides into the medium (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2008; Comuzzo et al., 2015), which provides the cider with foam stability, decreased astringency, protection against oxidation, and greater aromatic and flavor complexity (Pozo-Bayón, Andujar-Ortiz, Alcaide-Hidalgo, Martín-Álvarez, & Moreno-Arribas, 2009).

In terms of visual preference, ciders made with K1-V1116 and MM7 (RS = 35.5 and 33.5, respectively) stood out, which coincides with the results obtained in the sensory evaluation of the effervescence produced. In the olfactory aspect, the commercial strain K1-V1116 (RS = 40.0) stood out, which agrees with its technical fact sheet in which it is recognized as an ester-producing yeast that releases floral and fruity aromas

observar que para el día siete la levadura de referencia K1-V1116 ya tenía una presión de 5.10 atm, seguida de 436.4 (4.39 atm), MM7 (3.25 atm) y RY5 (2.91). El día 21 se consideró el final de la segunda fermentación, momento en el que K1-V1116, 436.4 y MM7 alcanzaron una presión similar (5.93, 5.83 y 5.75 atm, respectivamente), siendo superiores a RY5 (5.49 atm).

Durante la segunda fermentación, el CO₂ producido eleva la presión interna de la botella y genera efervescencia al momento de servirlo (Liger-Belair et al., 2009). Se considera que 5 g·L⁻¹ de azúcar incrementan la presión en aproximadamente 1 atm (Navarre, 1998), lo cual coincide con este estudio, debido a que con 30 g·L⁻¹ de azúcar se obtuvieron cerca de 6 atm de presión con las cuatro cepas evaluadas. La levadura RY5 resultó la menos eficiente en este aspecto, lo que coincide con el hecho de que fue la menos sobresaliente de las tres en los otros criterios de selección.

Con respecto a los análisis físicos y químicos de las sidras (Cuadro 3), las tres cepas seleccionadas obtuvieron valores similares a los de la cepa comercial. El GA fluctuó entre 8.13 y 8.89 °GL, siendo superior con la cepa RY5. Los AR variaron de 1.65 a 1.96 g·L⁻¹, lo que corresponde con fermentaciones completas. La AV varió de 0.04 a 0.48 g·L⁻¹, obteniéndose la mayor concentración con RY5; el pH, de 3.61 a 3.66; la ATT, de 4.05 a 4.28 g·L⁻¹, y el SO₂, de 202 a 226 mg·L⁻¹, valores que se encuentran dentro de los estándares establecidos por la norma oficial mexicana para bebidas alcohólicas (NOM-199-SCFI-2017, 2017).

Análisis sensoriales

La prueba de Friedman mostró diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en todas las variables sensoriales evaluadas (Cuadro 4). En la altura de la corona, la sidra elaborada con 436.4 obtuvo el mayor valor en la suma de rangos

Table 4. Rank sum of the Friedman test to sensorially evaluate the quality of sparkling ciders made with four yeast strains.

Cuadro 4. Suma de rangos de la prueba de Friedman para evaluar sensorialmente la calidad de sidras espumosas elaboradas con cuatro cepas de levaduras.

Trait evaluated / Característica evaluada	K1-V1116	436.4	MM7	RY5	F	P
Crown height / Altura de la corona	22.5 ¹	34.5	24.5	18.5	9.58	0.0224
Crown reduction time / Tiempo de reducción de la corona	40.0	30.0	20.0	10.0	30.00	< 0.0001
Number of trains / Número de trenes	38.5	10.0	31.5	20.0	29.35	< 0.0001
Bubble diameter / Diámetro de burbujas	37.5	19.0	32.5	11.0	26.94	< 0.0001
Effervescence speed / Velocidad de efervescencia	20.0	34.0	36.0	10.0	27.12	< 0.0001
Visual / Visual	33.5	18.0	35.5	13.0	22.76	< 0.0001
Olfactory / Olfativa	40.0	30.0	20.0	10.0	30.00	< 0.0001
Taste / Gustativa	29.0	21.0	10.0	40.0	28.92	< 0.0001

¹The treatment averages come from ten replicates (judges).

¹Las medias de los tratamientos provienen de diez repeticiones (jueces).

(LALVIN, 2014). On the other hand, with strain RY5 a very low value was obtained (RS = 10.0) in this aspect; however, this strain reached the highest preference at taste level (RS = 40.0), being above the control. This contrasts sharply with the values obtained in the rest of the variables, both sensory and analytical. In general terms, MM7 stood out among the native strains, contrasting strongly with RY5.

The results obtained show that native strains can produce sparkling ciders of quality and acceptability comparable to those produced with commercial strains. The economic benefits of having a yeast strain that produces a sparkling cider that stands out in its characteristics are that it can be recognized by the knowledgeable consumer and, therefore, can generate greater prestige and profit, as is the case with champagne.

Molecular identification of yeasts

The homologues with the database showed, with sufficient confidence (E-Values of 0 & Query Cover of 99 %), that strain RY5 belongs to *Saccharomyces paradoxus* (100 % ID), while MM7 and 436.4 belong to *S. cerevisiae* (99 and 87 % ID, respectively). Strain RY5, with the least outstanding traits, belongs to a species little related to fermentative environments; instead, its presence has been detected in the field (Kowallik, Miller, & Greig, 2015). However, this strain had outstanding taste acceptance and high alcohol production, which has not been reported for cider production, so it should be further studied.

Conclusions

The greatest number of strains with desirable traits is obtained halfway through fermentation. Some of the isolated strains, such as MM7 and 436.4, had similar behavior to that of the control strain (K1-V1116), showing desirable characteristics for the production of sparkling ciders.

The PCR amplification technique of the ITS1/ITS4 domain and its sequencing allowed the identification of the three selected strains. Most of the yeasts isolated from spontaneous fermentations of different apple varieties in the region belong to the genus *Saccharomyces*. Strain RY5 (*S. paradoxus*) stood out for its taste acceptability and its high efficiency in the conversion of sugar into alcohol, characteristics not previously reported, which merits further study.

Acknowledgments

The authors thank the National Council of Science and Technology (CONACyT) for its financial support, and the

(SR = 34.5), correspondiente a una mayor preferencia. De acuerdo con Esteruelas et al. (2015), se busca que las sidras tengan una mayor altura de la corona al momento de servirla. Por su parte, con K1-V1116 se alcanzaron los mayores valores de tiempo de reducción de la corona (SR = 40.0), número de trenes (SR = 38.5) y diámetro de la burbuja (SR = 37.5); los valores mayores en esta última variable indican burbujas más pequeñas. Finalmente, con las cepas MM7 y 436.4 se consiguieron los valores más elevados en velocidad de efervescencia (mayor velocidad en el ascenso de las burbujas a la superficie del líquido) (SR = 36.0 y 34.0, respectivamente).

La efervescencia es un atributo fundamental en las bebidas espumantes, ya que es lo primero que perciben los consumidores (Brissonnet & Maujean, 1993; González, 2010). La levadura utilizada en la segunda fermentación de sidra espumosa afecta su composición, debido, principalmente, a la velocidad de autólisis que permite la liberación de polisacáridos, proteínas, péptidos, aminoácidos libres, lípidos y nucleótidos al medio (Alexandre & Guilloux-Benatier, 2008; Comuzzo et al., 2015), lo que proporciona a la sidra estabilidad de la espuma, disminución de la astringencia, protección frente a la oxidación, y mayor complejidad aromática y de sabor (Pozo-Bayón, Andujar-Ortiz, Alcaide-Hidalgo, Martín-Álvarez, & Moreno-Arribas, 2009).

En cuanto a la preferencia a nivel visual, destacaron las sidras elaboradas con K1-V1116 y MM7 (SR = 35.5 y 33.5, respectivamente), lo cual coincide con los resultados obtenidos en la evaluación sensorial de la efervescencia producida. En el aspecto olfativo sobresalió la cepa comercial K1-V1116 (SR = 40.0), lo que concuerda con su ficha técnica en la que se reconoce como una levadura productora de ésteres que libera aromas florales y afrutados (LALVIN, 2014). Por su parte, con la cepa RY5 se obtuvo un valor muy bajo (SR = 10.0) en este aspecto; sin embargo, esta cepa alcanzó la mayor preferencia a nivel gustativo (SR = 40.0), encontrándose por encima del testigo. Lo anterior contrasta fuertemente con los valores obtenidos en el resto de las variables, tanto a nivel sensorial como analítico. En términos generales, entre las cepas nativas destacó MM7, contrastando fuertemente con RY5.

Los resultados obtenidos muestran que las cepas nativas pueden producir sidras espumosas de calidad y aceptabilidad comparables con las producidas con cepas comerciales. Los beneficios económicos de contar con una cepa de levadura que produzca una sidra espumosa que destaque en sus características son que puede ser reconocida por el consumidor conocedor y, por lo tanto, puede generar un mayor prestigio y ganancia, tal como ocurre con el champaña.

apple producers of San José Itho, Amealco, Querétaro, for the assistance provided for conducting this research.

End of English version

References / Referencias

- Alexandre, H., & Guilloux-Benatier, M. (2008). Yeast autolysis in sparkling wine-a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(2), 119-127. doi: 10.1111/j.1755-0238.2006.tb00051.x
- Bisson, L. F., & Butzke C. E. (2000). Diagnosis and rectification of stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(2), 168-177. Retrieved from <https://www.ajevonline.org/content/51/2/168>
- Boletín Oficial de Estado (BOE). (2003). *Consejo regulador sidra de Asturias*. Retrieved from http://sidradeasturias.es/archivos/enlaces_1266846536.pdf
- Borrull, A., Poblet, M., & Rozès, N. (2015). New insights into the capacity of commercial wine yeasts to grow on sparkling wine media. Factor screening for improving wine yeast selection. *Food Microbiology*, 48, 41-48. doi: 10.1016/j.fm.2014.12.006
- Brissonnet, F., & Maujean, A. (1993). Characterization of foaming proteins in a champagne base wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44(3), 297-301. Retrieved from <https://www.ajevonline.org/content/44/3/297>
- Carrau, F., Dellacassa, E., & Boido, E. (2008). Terpenoids in grapes and wines: origin and micrometabolism during the vinification process. *Natural Product Communications*, 3(4), 577-592. doi: 10.1177/1934578X0800300419
- Comuzzo, P., Battistutta, F., Vendrame, M., Páez, M. S., Luisi, G., & Zironi, R. (2015). Antioxidant properties of different products and additives in white wine. *Food Chemistry*, 168, 107-114. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.07.028
- Esteruelas, M., González-Royo, E., Gil, M., Kountoudakis, N., Orte, A., Cantos, A., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2015). Influence of temperature during the second fermentation and aging of sparkling wine (Cava) on the properties of the foam. *BIO Web Conferences*, 5, 02011. doi: 10.1051/bioconf/20150502011
- Fernandes, P. M. B. (2005). How does yeast respond to pressure?. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(8), 1239-1245. doi: 10.1590/S0100-879X2005000800012
- García, M., Quintero, R., & López-Munguía, A. (2004). *Biotechnología alimentaria*. Ciudad de México, México: Limusa.
- García, M., Esteve-Zarzozo, B., & Arroyo, T. (2016). Non-*Saccharomyces* yeasts: biotechnological role for wine production. In: Morata, A., & Loira, I. (Eds.), *Grape and wine biotechnology* (pp. 261). Zagreb, Croatia: IntechOpen. doi: 10.5772/64957
- Garofalo, C., Arena, M. P., Laddomada, B., Cappello, M. S., Blevé, G., Grieco, F., Beneduce, L., Berbegal, C., Spano, G., & Capozzi, V. (2016). Starter cultures for sparkling wines. *Fermentation*, 2(21), 1-16. doi: 10.3390/fermentation2040021

Identificación molecular de las levaduras

Las homologías con la base de datos mostraron, con suficiente confianza (E-Values de 0 & Query Cover de 99 %), que la cepa RY5 pertenece a *Saccharomyces paradoxus* (100 % ID), mientras que MM7 y 436.4 pertenecen a *S. cerevisiae* (99 y 87 % ID, respectivamente). La cepa RY5, con las características menos destacadas, pertenece a una especie poco relacionada con ambientes fermentativos, más bien se ha detectado su presencia en campo (Kowallik, Miller, & Greig, 2015). No obstante, esta cepa tuvo una destacada aceptación gustativa y una alta producción de alcohol, lo cual no ha sido reportado para producción de sidra, por lo que se deberá seguir estudiando.

Conclusiones

El mayor número de cepas con características deseables se obtiene a la mitad de la fermentación. Algunas de las cepas aisladas, como MM7 y 436.4, presentaron un comportamiento similar al de la cepa testigo (K1-V1116), mostrando características deseables para la elaboración de sidras espumosas.

La técnica de amplificación mediante PCR del dominio ITS1/ITS4 y su secuenciación permitieron identificar las tres cepas seleccionadas. La mayoría de las levaduras aisladas de fermentaciones espontáneas de distintas variedades de manzanas en la región pertenecen al género *Saccharomyces*. La cepa RY5 (*S. paradoxus*) destacó por su aceptabilidad gustativa y su elevada eficiencia en la conversión de azúcar en alcohol, características no reportadas anteriormente, lo que amerita que se siga estudiando.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero, y a los productores de manzana de San José Itho, Amealco, Querétaro, por las facilidades brindadas para la realización de esta investigación.

Fin de la versión en español

- González, M. (2010). La evaluación sensorial. In: Blanco, D., & Mangas, J. (Eds.), *La manzana y la sidra: bioprocesos, tecnologías de elaboración y control* (pp. 139). Asturias, España: Asturgraf.
- Herrero, M., Gonzalo, Á., & García, L. (2010). Tecnología de la producción de sidra. Equipamiento industrial. In: Blanco, D., & Mangas, J. (Eds.), *La manzana y la sidra: bioprocesos, tecnologías de elaboración y control* (pp. 198-207). Asturias, España: Asturgraf
- Irastorza, A., & Dueñas, M. (2010). Microbiología de la sidra. In: Blanco, D., & Mangas, J. (Eds.), *La manzana y la sidra:*

- bioprocesos, tecnologías de elaboración y control (pp. 105-120). Asturias, España: Asturgraf.
- 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. doi: 10.1111/mec.13120
- LALVIN (2014). *Lalvin V1116: Fresh fruit white wines*. Retrieved from https://www.lallemandbrewing.com/docs/products/tds/TDS_LALVIN_V1116_ENG_DIGITAL.pdf
- Liger-Belair, G., Cilindre, C., Gougeon, R. D., Lucio, M., Gebeffugi, I., Jeandet, P., & Schmitt-Kopplin, P. (2009). Unraveling different chemical fingerprints between a champagne wine and its aerosols. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(39), 16545-16549. doi: 10.1073/pnas.0906483106
- Lopes, C. A., & Sangorrín, M. P. (2010). Optimization of killer assays for yeast selection protocols. *Revista Argentina de Microbiología*, 42(4), 298-306. doi: 10.1590/S0325-75412010000400011
- Mangas, J. (2010). Sidras espumosas. In: Blanco, D., & Mangas, J. (Eds.), *La manzana y la sidra: bioprocesos, tecnologías de elaboración y control* (pp. 224). Asturias, España: Asturgraf.
- Mateo, J., & Maicas, S. (2016). Application of non-*Saccharomyces* yeasts to wine-making process. *Fermentation*, 2(3), 1-13. doi: 10.3390/fermentation2030014
- Medina, K., Ferreri, L., Fariña, L., Boido, E., Dellacassa, E., Gaggero, C., & Carrau, F. (2007). Aplicación de la levadura *Hanseniaspora vineae* en cultivos mixtos con *Saccharomyces cerevisiae* en la vinificación. *Enología*, 4(6), 1-6. Retrieved from <http://riquim.fq.edu.uy/archive/files/c59d9a5a4792851512e4821636c4e9e8.pdf>
- Miranda, D., Aldrete, J., Arvizu, S., Hernández, M., Soto, L., & Martínez, R. (2017). Growth kinetics for the selection of yeast strains for fermented beverages. In: Morata, A., & Loira, I. (Eds.), *Yeast - Industrial applications* (pp. 74-75). Sarajevo, Croitia: InTech. doi: 10.5772/intechopen.70224
- Mukherjee, V., Steensels, J., Lievens, B., Van de Voorde, I., Verplaetse, A., Aerts, G., Willems, K., Thevelein, J., Verstrepen, K., & Ruyters, S. (2014). Phenotypic evaluation of natural and industrial *Saccharomyces* yeasts for different traits desirable in industrial bioethanol production. *Applied Microbiology of Biotechnology*, 98(22), 9483-9498. doi: 10.1007/s00253-014-6090-z
- Navarre, J. (1998). *Manuel d'Enologie*. Paris, France: Bailliere.
- Nogueira, A., & Wosiacki, G. (2012). Apple cider fermentation. In: Hui, Y., & Özgül, E. (Eds.), *Handbook of plant-based fermented food and beverage technology* (pp. 209-235). Boca Ratón, USA: CRC Press.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-199-SCFI-2017). (2017). *Bebidas alcohólicas - Denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba*. Retrieved from http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5502882&fecha=30/10/2017
- Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). (2018). *Compendio de los métodos internacionales de análisis de los vinos y de los mostos*. París, Francia: Author.
- Pando-Bedriñana, R., Querol-Simón, A., & Suárez-Valles, B. (2010). Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. *Food Microbiology*, 27(4), 503-508. doi: 10.1016/j.fm.2009.11.018
- Paz-Cuadra, A., Guzmán-Pantoja, L., Martínez-Peniche, R., Caltzontzin-Fernández, K., Pacheco-Aguilar, J., & Arvizu-Medrano, S. (2014). Evaluation of the susceptibility of apple genotypes in Queretaro, Mexico to powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*). *Scientia Horticulturae*, 170, 53-60. doi: 10.1016/j.scienta.2014.01.044
- Pérez, G., Fariña, L., Barquet, M., Boido, E., Gaggero, C., Dellacassa, E., & Carrau, F. (2011). A quick screening method to identify β -glucosidase activity in native wine yeast strains: application of Esculin Glycerol Agar (EGA) medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(1), 47-55. doi: 10.1007/s11274-010-0425-4
- Pozo-Bayón, M. A., Andujar-Ortiz, I., Alcaide-Hidalgo, J., Martín-Álvarez, P., & Moreno-Arribas, M. (2009). Characterization of commercial inactive dry yeast preparations for enological use based on their ability to release soluble compounds and their behavior toward aroma compounds in model wines. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 57(22), 10784-10792. doi: 10.1021/jf900904x
- Ramírez-Mora, E., Martínez-Peniche, R., & Fernández-Montes, M. (2005). Efecto de la concentración de azúcar y la cepa de levadura en la calidad de sidra espumosa. *Brazilian Journal of Food Technology*, 5, 89-95. Retrieved from <https://docplayer.es/14988843-Efecto-de-la-concentracion-de-azucar-y-la-cepa-de-levadura-en-la-calidad-de-sidra-espumosa.html>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2017). *Un buen vino o una buena sidra para despedir el año*. Ciudad de México, México: Author. Retrieved from <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/un-buen-vino-o-una-buena-sidra-para-despedir-el-ano>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2017). *Avance de siembras y cosechas. Resumen nacional por cultivo*. Ciudad de México: Author. Retrieved from <http://infosiap.siap.gob.mx>
- Servicio Meteorológico Nacional (SMN) (2016). *Información climatológica por estado*. Ciudad de México: Author. Retrieved from <http://smn.cna.gob.mx/es/informacion-climatologica-ver-estado?estado=qro>
- Soto-Herrera, J., Castillo-Castañeda, E., & Martínez-Peniche, R. A. (2008). Efecto del nivel de azúcar en la calidad de la efervescencia en sidra espumosa mediante análisis de imágenes. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6(1), 33-40. doi: 10.1080/11358120809487625
- Steensels, J., & Verstrepen, K. J. (2014). Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts

- in industrial fermentations. *Annual Review of Microbiology*, 68(1), 61-80. doi: 10.1146/annurev-micro-091213-113025
- Suárez-Valles, B., Pando-Bedriñana, R., Lastra-Queipo, A., & Mangas-Alonso, J. (2008). Screening of cider yeasts for sparkling cider production. *Food Microbiology*, 25(5), 690-697. doi: 10.1016/j.fm.2008.03.004
- Ubeda, J., Briones, A. I., Izquierdo, P., & Palop, L. I. (1995). Predominant *Saccharomyces cerevisiae* strains in the fermentation of Airén grape musts with SO₂. *LWT- Food Science and Technology*, 28(6), 584-588. doi: 10.1016/0023-6438(95)90005-5
- Varela, C., Pizarro, F., & Agosin, E. (2004). Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. *Applied and environmental microbiology*, 70(6), 3392-3400. doi: 10.1128/AEM.70.6.3392-3400.2004