

***UNIVERSIDAD DE OVIEDO***

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA  
ALIMENTARIA**

**“UTILIZACIÓN DE LA DGGE PARA LA  
CARACTERIZACIÓN DE LA  
MICROBIOTA ASOCIADA A LA  
MANZANA DE SIDRA”**

**TRABAJO FIN DE MASTER**

**POR**

**SERGIO ALONSO FERNÁNDEZ**

**JULIO DE 2013**





Máster en Biotecnología Alimentaria  
Universidad de Oviedo  
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España  
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviado.es/MBTA>



**PROFESORES TUTORES:**

Dr. D. **Baltasar Mayo Pérez**, Instituto de Productos Lácteos de Asturias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Prof. Dr. D. **José Mario Díaz Fernández**, Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Oviedo

**CERTIFICAN:**

Que D. **Sergio Alonso Fernández** ha realizado bajo nuestra dirección el Trabajo Fin de Máster al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Máster Universitario en Biotecnología Alimentaria, 7ª promoción curso 2012-2013.

Oviedo, 16 de julio de 2013

Dr. Baltasar Mayo

D. José Mario Díaz

VºBº

D. José Mario Díaz Fernández  
Coordinador del Máster en Biotecnología Alimentaria

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis tutores Baltasar Mayo y Mario Díaz por su apoyo y paciencia; a Ana Belén Flórez, Lucía Guadamuro y los trabajadores del IPLA por su amabilidad y por hacer más agradable mi estancia en los laboratorios de Villaviciosa; a Amanda Laca por tener más paciencia que el santo Job; a Daniel Serna, José Luis Martínez y el personal de los Servicios Científico Técnico del Severo Ochoa por su ayuda siempre que lo necesité; a Saúl y el personal de los laboratorios de la Facultad de Químicas por su amabilidad y sus buenos consejos; a mis compañeros de Máster por compartir buenos momentos entre clase y clase y en los laboratorios; a Lucía Basco, Ana M<sup>a</sup> Moreno y Marce Sanabria –el trío de las Azores– por el apoyo moral; a Patricia Cofiño por su amistad durante mi estancia en Central Lechera Asturiana; a Rubén López, Cristina Gutiérrez, David Martínez y las hermanas Díez, por comprender mi azoramiento estos meses; a Jana, Vipo, Boy y Homer, la estirpe canina de la familia, por su leal compañía; a Olaya por sacar lo mejor de mí a pesar de sus rabietas y berrenchines; a mis padres, familiares y amigos; y en definitiva, a todos cuantos me ayudaron, directa o indirectamente, a hacer posible este trabajo fin de máster. *Gracies.*

## RESUMEN

La fabricación tradicional de sidra en el Principado de Asturias se realiza mediante una fermentación espontánea del mosto de manzana recién prensado. Según este proceso, la doble fermentación que experimenta el mosto se lleva a cabo por la acción de la microbiota indígena: levaduras del género *Saccharomyces* en el caso de la fermentación alcohólica y bacterias lácticas, principalmente de la *Oenococcus oeni*, en el caso de la fermentación maloláctica. La presencia de estos microorganismos en el mosto puede vincularse con la microbiota de la manzana y/o con los equipos y materiales de trabajo utilizados durante los procesos de molienda, prensado y macerado.

En este trabajo se estudió la microbiota presente en la superficie de cinco variedades de manzana para analizar la diversidad microbiana de la fruta y su posible vínculo con la microbiota que participa en los procesos fermentativos de la sidra. Para ello, se extrajo el ADN microbiano total de la superficie de las manzanas estudiadas y se amplificaron por PCR específico y de manera independiente las regiones V3 del gen que codifica el ARNr 16S de las bacterias y el dominio D1 del gen que codifica el ARNr 26S de los eucariotas. Los amplicones obtenidos se analizaron mediante DGGE, y con la finalidad de identificar las poblaciones que conforman los perfiles electroforéticos, varias bandas de los geles se aislaron, se reamplificaron y se secuenciaron para comparar las secuencias resultantes con las bases de datos públicas.

Los perfiles de DGGE revelaron una elevada diversidad microbiana en la fruta (15-20 bandas correspondientes a bacterias y 5-7 correspondientes a mohos y levaduras), con escasa variación entre las cinco variedades estudiadas. La identificación de las bandas reveló la dominancia de enterobacterias de los géneros *Escherichia* y *Shigella* en el perfil procariota, y la presencia de hongos del género *Exobasidium* entre los eucariotas. Estas poblaciones mayoritarias detectadas por DGGE no parecen estar relacionadas con los procesos de fermentación espontánea del mosto de manzana.

## **ABSTRACT**

Traditionally, the manufacturing of cider in Asturias is made by spontaneous fermentation of the freshly pressed apple juice. According to this process, the double fermentation of the apple juice is accomplished by the native microbiota: *Saccharomyces* yeasts, which takes over the alcoholic fermentation, and lactic acid bacteria species, mainly strains of *Oenococcus oeni*, which are responsible for the malolactic fermentation. The presence of these microorganisms in the apple juice can be linked to the apple ecology and/or to the equipment, tools and the production environment during the processes of crushing, pressing and mashing.

In the present work, we studied the microbiota present to the surface of five apple varieties in order to analyze the microbial diversity of the fruit and its potential link to the microorganisms involved in the cider fermentation process. For this, total microbial DNA of the apple surface was extracted by repeated washing and used as a template in specific and independent PCR experiments to amplify the V3 region of the bacterial 16S rRNA gene and the D1 domain of the eukaryotic 26S rRNA gene. The amplicons obtained were analyzed with the DGGE technique, and some of the bands observed in the profiles were then isolated, reamplified, sequenced and the sequences compared with those in databases in order to identify the microbial populations giving rise to the electrophoretic profiles.

The DGGE profiles showed a high microbial diversity in the original fruit, with 15-20 bands and 5-7 bands corresponding to bacteria and yeasts and moulds, respectively. Little variation of the profiles was found among the five batches of apples studied. Identification of the bands showed the dominance of Enterobacteriaceae belonging to the genera *Shigella* and *Escherichia*, as well as the presence of fungi species of the genus *Exobasidium*. Among the dominant populations detected by DGGE, usual species associated with apple juice's spontaneous fermentation were not identified.

## ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	viii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Antecedentes.....	2
1.2. Objetivo.....	4
<b>2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS</b> .....	5
2.1. La sidra en el mundo.....	6
2.2. Elaboración de la sidra natural.....	8
2.3. Microbiología de la sidra.....	11
2.3.1. Levaduras.....	12
2.3.2. Bacterias lácticas.....	16
2.3.3. Bacterias acéticas.....	18
2.3.4. Otros géneros.....	19
2.4. Técnicas de laboratorio.....	20
2.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	20
2.4.2. Electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE).....	22
2.4.3. Secuenciación de ADN.....	23
<b>3. METODOLOGÍA</b> .....	26
3.1. Lixiviado de manzanas.....	27
3.2. Extracción de ADN.....	27
3.3. PCR.....	28
3.4. Electroforesis en gel de agarosa.....	30
3.5. DGGE.....	31
3.6. Reamplificación y purificación de bandas.....	33
3.7. Secuenciación.....	36
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	37
4.1. Perfiles de DGGE.....	38
4.2. Resultados de la secuenciación.....	40
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	44
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	46

## ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARNr 16S	Ácido ribonucleico ribosomal 16S
APS	Persulfato amónico
BAL	Bacterias del ácido láctico o ácido lácticas
BrEt	Bromuro de etidio
C	Citosina
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
DOP	Denominación de origen protegida
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
G	Guanina
g	Gramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pb	Par de bases
PME	Pectín metilesterasa
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmento de restricción
T	Timina
TAE	Tris-acetato EDTA
TBE	Tris-borato EDTA
TEMED	Tetrametil etilen-diamina
ufc	Unidad formadora de colonia
V	Voltio
µg	Microgramo
µM	Micromolar
µL	Microlitro

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Porcentaje de volumen de producción de sidra en la UE.....	6
Figura 1: Diagrama de flujo del proceso de elaboración de sidra natural.....	8
Figura 2: Perfil habitual de la evolución de la microbiota dominante en el proceso de fabricación de sidra natural en Asturias y en el País Vasco.....	13
Figura 3: Esquema de las tres etapas cíclicas de una PCR.....	21
Figura 4: Diagrama de la secuenciación de ADN por el método de Sanger.....	25
Figura 6: Estructura de los operones ribosomales en bacterias y levaduras.....	28
Figura 7: Marcador GRS Universal Ladder.....	30
Figura 8: Visión parcial de un equipo DCode Universal Mutation Detection System.....	31
Figura 9: Marcador Low DNA Mass Ladder .....	34
Figura 10: Perfil DGGE de amplicones de la región V3 del gen ARNr 16S en bacterias.....	39
Figura 11: DGGE de amplicones de la región D1 del gen ARNr 26S en levaduras...	39
Figura 12: Porción de la secuencia nucleotídica correspondiente a una banda de levaduras.....	42



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Bloques tecnológicos de las variedades de manzana utilizadas en la elaboración de la «Sidra de Asturias».....	8
Tabla 2: Distribución de especies de levaduras en diferentes estudios a lo largo de las diferentes etapas de la fermentación espontánea de mostos de manzana de Asturias.....	15
Tabla 3: Bloques tecnológicos de las variedades de manzana estudiadas.....	27
Tabla 4: Reactivos utilizados en la PCR de bacterias y levaduras.....	29
Tabla 5: Procedimiento de PCR para amplificación en bacterias.....	29
Tabla 6: Procedimiento de PCR para amplificación en levaduras.....	30
Tabla 7: Composición de las soluciones de acrilamida 0% y 100% desnaturalizantes.....	31
Tabla 8: Composición de las partes incluidas en el gel de DGGE.....	32
Tabla 9: Marcadores utilizados en la DGGE de bacterias.....	32
Tabla 10: Reactivos utilizados en la reamplificación de bandas aisladas.....	33
Tabla 11: Peso en gramos de las bandas observadas en la reamplificación.....	34
Tabla 12: Cantidad de ADN presente en cada fragmento en función del volumen del marcador pipeteado.....	35
Tabla 13: Estimación de la concentración de ADN en las muestras de bacterias y levaduras.....	35

# ***1. INTRODUCCIÓN***

## 1.1. Antecedentes

La sidra natural es una bebida alcohólica resultante de la fermentación total o parcial del mosto de manzana, elaborada en países como Inglaterra, Francia, Estados Unidos, Canadá y España. Dentro de nuestro país, su vínculo con la tradición cultural y social de Asturias ha conseguido que, a pesar de la introducción de novedades gastronómicas como la sidra de nueva expresión o de mesa y la sidra gasificada, la sidra natural mantenga en muchos lugares de producción un proceso de fabricación tradicional con una fermentación espontánea.

Esta fermentación espontánea, a diferencia del método industrial que hace uso de *starters* o inóculos iniciadores, utiliza la microbiota indígena presente en el medio líquido para realizar la doble fermentación necesaria a la hora de obtener la sidra: la fermentación alcohólica o tumultuosa, realizada por levaduras del género *Saccharomyces*, y la fermentación maloláctica o lenta, realizada por bacterias lácticas. El resultado de esta fermentación espontánea son productos con características organolépticas que varían de año en año y entre *llagares* —término asturiano que describe las bodegas donde se elabora la sidra—, dado que, al igual que ocurre en la fermentación del vino, el control microbiológico en las etapas de producción es menos riguroso que en la industria.

A lo largo de los años, esta microbiota ha sido analizada y caracterizada en múltiples estudios científicos y asociada de forma genérica tanto a la superficie de la manzana como a los utensilios y equipos de molienda, maceración y prensado utilizados en los *llagares*. No obstante, el conocimiento sobre la microbiología de la superficie de la manzana es escaso y cuenta con pocos estudios científicos (Beech, 1972; Rosini y col., 1982; Bizeau y col., 1990), dado que las levaduras fermentativas del género *Saccharomyces* se asocian principalmente con el instrumental y los equipos de molienda, maceración y prensado presentes en la bodega.

Durante las décadas de 1980 y 1990, la identificación de estos microorganismos fue realizada mediante caracterización fenotípica, empleando métodos como la siembra en placa con medios selectivos para levaduras como agar-malta (Cabranes y col., 1990). Sin embargo, estas técnicas clásicas de identificación pueden subestimar la biodiversidad, dada la existencia de microorganismos difíciles de cultivar al requerir factores de crecimiento desconocidos, además de presentar baja sensibilidad y reproducibilidad.

Sin embargo, el advenimiento de técnicas genéticas y moleculares de identificación de microorganismos ha permitido una mayor sofisticación de los estudios y la obtención de datos experimentales más identificativos al tratarse de técnicas independientes de cultivo. Algunas de estas técnicas moleculares se utilizan para la identificación y cuantificación de microorganismos individuales; no obstante, existen técnicas capaces de determinar la composición poblacional de un ecosistema en su conjunto, usando genes conservados evolutivamente como secuencias diana.

En Asturias, autores como Suárez Valles (2007) y Pando Cabriñana (2010) han utilizado recientemente el análisis de RFLP —polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción— del gen que codifica el ARNr 5,8S para identificar las levaduras asociadas con la fermentación espontánea de sidra autóctona. Aún así, existen otros métodos para identificar y tipificar poblaciones microbianas como la hibridación cuantitativa de ADN o ARN, las electroforesis en geles desnaturizantes —DGGE y TGGE— y el análisis del polimorfismo conformacional de cadena sencilla —SSCP—.

Dentro de las técnicas electroforéticas, la DGGE —del inglés *Denaturing gradient gel electrophoresis*— es una técnica que permite identificar de forma precisa y rápida la microbiota mayoritaria que dirige los procesos y estudiar la dinámica espacial y temporal de las poblaciones en procesos fermentativos. Esta característica ha permitido su utilización para el estudio de la fermentación en una amplia lista de alimentos, con destacados estudios a nivel regional de la diversidad y evolución microbiana durante la elaboración y maduración de los quesos de Cabrales (Flórez y Mayo, 2006) y de Casín (Alegría y col., 2009), realizados en el Instituto de Productos Lácteos de Asturias.

El fundamento de la DGGE radica en la variación nucleotídica interespecífica en la secuencia un gen altamente conservado como el ARNr 16S. Debido a esta variación, y aun teniendo el mismo tamaño, los amplicones del gen de las distintas especies de una mezcla microbiana heterogénea pueden individualizarse durante la electroforesis en un gel con un gradiente lineal de un agente desnaturizante. Dado que la desnaturización en dominios internos de la doble hélice depende de la estructura nucleotídica del ADN, cada amplicón se desnaturiza progresivamente hasta frenar su migración en una zona determinada del gel.

Si bien la técnica presenta limitaciones, incluye ventajas frente a los métodos tradicionales de identificación como la independencia de cultivo y la capacidad para estudiar muestras poco conocidas, y es idónea para realizar un seguimiento temporal y espacial de comunidades microbianas en diferentes hábitats o ecosistemas. Estas características convierten la DGGE en una técnica muy aconsejable para el estudio de la microbiología de alimentos y bebidas obtenidos por fermentación tales como la sidra natural.

## 1.2. Objetivo

El objetivo principal de este trabajo consiste en evaluar las poblaciones microbianas mayoritarias presentes en la piel de cinco variedades de manzana reconocidas por el Consejo Regulador de la Denominación de Origen Protegida —D.O.P.— «Sidra de Asturias» para la fabricación de sidra natural con el sello D.O.P. en la región. La metodología empleada para conocer la microbiología de la manzana incluyó las siguientes etapas:

- Aislamiento de la microbiota de la superficie de la manzana mediante lavado con agua destilada y extracción del ADN microbiano total.
- Amplificación por PCR de la región V3 del gen ARNr 16S de las bacterias y del dominio D1 del gen ARNr 26S de las levaduras.
- Análisis electroforético de los amplicones de levaduras y bacterias mediante DGGE en geles de poliacrilamida.
- Identificación de las bandas obtenidas en los geles de poliacrilamida mediante aislamiento, reamplificación, purificación, secuenciación y análisis de secuencias.

Una vez contrastados los datos de la secuenciación con las bases de datos y conocidas las especies estudiadas, se pretende obtener información sobre la posible vinculación de la microbiota de la manzana con el proceso de elaboración de la sidra natural por fermentación espontánea, teniendo presente los datos experimentales de estudios realizados con anterioridad.

## ***2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS***

## 2.1. La sidra en el mundo

La sidra es una bebida resultante de la fermentación alcohólica, total o parcial, del mosto de manzana o del propio fruto, con una graduación alcohólica que puede oscilar entre el 2% y el 8,5% en volumen. Bajo la denominación de sidra, que el *Codex Alimentarius* define como «vinos de fruta elaborados a base de manzana», se agrupa un amplio número de productos derivados de la fermentación de zumo de manzana (Codex Stan 192-1995).

Su producción está extendida a numerosas regiones del mundo y varía según la zona. En Norteamérica, los principales productores de sidra son Canadá y los estados de la Costa Oeste de los Estados Unidos. En el primero, el producto más consumido es la sidra de hielo —*ice cider*—, que se obtiene por prensado de manzanas recogidas tras las primeras heladas y posterior fermentación del zumo, lo cual aumenta la concentración de azúcares y crea productos con una graduación entre el 7 y el 13% (v/v). En Estados Unidos, la producción se localiza en los estados septentrionales como Nueva Inglaterra, Michigan y Nueva York, y el término *cider* se refiere exclusivamente al zumo de manzana, reservando la expresión *hard cider* para la bebida alcohólica.

En Europa, la producción de sidra está ligada a la costa atlántica, siendo sus principales productores países como Reino Unido, Irlanda, Francia y España, así como Alemania —*apfelwein*, con una limitada producción en la zona suroccidental— y varios países escandinavos. El principal productor mundial es el Reino Unido, donde la NACM —*National Association of Cider Makers*— cifra una industria sidrera que supera los 1000 millones de litros anuales. Tras Irlanda, el tercer productor europeo es Francia, cuya producción es mayoritariamente espumosa y se focaliza en regiones como Normandía y Bretaña, región en la que existen dos D.O.C. — Denominación de Origen Controlada—, el *pommeau* y la sidra de Cornouaille.

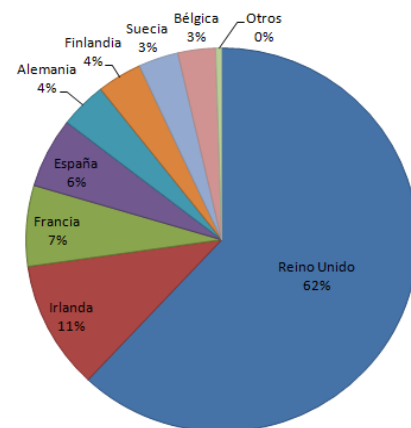


Figura 1: Producción de sidra por países dentro de la Unión Europea (Fuente: *L'Association des Industries des Cidres et Vins de l'U.E.*)

España es el cuarto país productor de Europa en volumen, con 62 millones de litros en 2011 según el Instituto Nacional de Estadística ([www.ine.es](http://www.ine.es)), siendo el 55% sidra natural y el 45% sidra espumosa. La producción está ligada a la zona cantábrica, siendo las principales regiones productoras el Principado de Asturias, País Vasco, Galicia y Navarra. La industria sidrera de Asturias representa el 80% de la producción nacional —77% de la sidra natural y 84% de la gasificada— y ocupa la tercera posición de los sectores agropecuarios de la región, detrás de los sectores lácteo y cárnico (González Torre y col., 2002).

Su consumo está unido prioritariamente al sector hostelero, dado el vínculo de la sidra natural a la cultura gastronómica y social en Asturias, mientras que en el hogar su consumo es menor en comparación con la sidra gasificada. No obstante, y aun superado por otras bebidas alcohólicas como la cerveza y el vino, el consumo de sidra ha experimentado un crecimiento notable tanto en España como en otros países, tales como el Reino Unido (Blake y Boyle, 1992) y los Estados Unidos (Kitsock, 1998).

Parte de la producción de sidra en Asturias cuenta con el reconocimiento de una Denominación de Origen Protegida —D.O.P.—, aprobada mediante Reglamento por la Consejería de Medio Rural y Pesca del Principado el 24 de octubre de 2002 y ratificada en la orden APA/224/2003 del 28 de enero de 2003 por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Esta denominación establece los límites territoriales de las zonas protegidas, las variedades de manzana que pueden ser utilizadas y las prácticas de cultivo, recolección y elaboración, además de otorgar la defensa de la D.O.P. a un Consejo Regulador y definir las características que deben de tener los tres principales productos protegidos por la D.O.P. (B.O.E. nº 36 de 11 de febrero de 2003):

- Sidra natural tradicional. Bebida fermentada de manzanas procedentes de las 22 variedades reconocidas por la D.O.P., sin aporte de azúcares ni de dióxido de carbono exógeno. Dada su importancia tanto por su volumen de producción como por su interés en el estudio de la microbiología de la sidra, su proceso de elaboración se detalla en el siguiente apartado.
- Sidra de nueva expresión o de mesa. Producto semejante a la sidra natural salvo por la inclusión de un proceso de filtración que estabiliza el producto, le da un aspecto transparente y hace que no requiera escanciado.
- Sidra de doble fermentación o espumosa. Producto con mayor contenido en anhídrido carbónico endógeno procedente de una segunda fermentación alcohólica, previa adición de azúcar y levaduras, que sufre la sidra en un recipiente cerrado, bien en la propia botella —método *champenoise*— bien en grandes envases —método *charmat* o *granvass*—. Tras la crianza se eliminan las levaduras congelando el cuello de la botella, en el que se forma un bloque de hielo con las lías. Durante este proceso se pierde una pequeña cantidad de producto que es repuesto con un licor o jarabe de expedición, una solución azucarada que le confiere el grado de dulzor a la sidra espumosa y su denominación: *extra brut*, *brut*, *seco*, *semiseco* o *dulce*.

Una característica relevante de la sidra es que sus niveles de producción están influidos por la vecería del manzano, fenómeno que consiste en una alternancia entre cosechas abundantes y exiguas, generalmente de carácter bianual, y que también sufren otros cultivos como el olivo. Aunque esta falta puede suplirse con la importación de fruto foráneo, los productos protegidos por la D.O.P. solo pueden utilizar las variedades autorizadas por Ley.



## 2.2. Elaboración de sidra tradicional

En industria, la fabricación de sidra natural comienza con la recogida de manzana, continúa con la extracción del mosto y finaliza con una etapa de clarificación optativa antes de entrar en la doble fermentación característica del proceso, alcohólica y maloláctica.

Una vez recolectadas, las variedades de manzana se clasifican en bloques tecnológicos según su acidez y su contenido en polifenoles, dos grupos químicos que contribuyen al sabor de la sidra. En la Tabla 1 se recogen las principales variedades de manzana autorizadas por la D.O.P. «Sidra de Asturias», los bloques tecnológicos a los que pertenecen y sus características:

Bloque	Variedades	Acidez (g H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> /L)	Taninos (g ácido tánico/L)
Ácido	Durona de Trésali, Blanquina, Limón Montés, Teórica, San Roqueña, Raxao, Fuentes, Xuanina,	>4,80	<1,45
Amargo	Clara	<3,29	>2,00
Dulce	Ernestina, Verdialona	<3,29	<1,45
Dulce-amargo	Coloradona	<3,29	1,45-2,00
Ácido-amargo	Regona, Meana, Panquerina	>4,80	1,45-2,00
Acidulado o semiácido	Solarina, De la Riega, Collao, Perico, Carrió, Prieta, Perezosa	3,29-4,80	<1,45

Tabla 1: Bloques tecnológicos de las variedades de manzana utilizadas en la elaboración de la «Sidra de Asturias».

Tras su clasificación en bloques, se selecciona una proporción de variedades adecuada para elaborar la sidra. De forma general, variedades que aportan acidez —pertenecientes a los bloques ácidos, semiácidos y ácido-amargos— no deben superar el 60% en la mezcla, mientras que el 40% restante puede incluir variedades dulces y amargas.



Figura 2: Diagrama de flujo del proceso de elaboración de sidra natural.

Las manzanas se seleccionan y se lavan en tolvas de recepción para garantizar unas condiciones higiénico-sanitarias óptimas. A continuación, se extrae el mosto de la manzana mediante un proceso que incluye tres etapas:

- Molienda o trituración. Consiste en la fragmentación mecánica de la manzana, su transformación en pulpa —en asturiano, *magaya*— y la extracción del mosto. El tipo de molienda usado determina el tamaño de partícula de la pulpa, a definir según la madurez del fruto. Los molinos más usados en la trituración son los de martillo y los de rejilla.
- Maceración. Etapa opcional tras la molienda en la cual la pulpa de manzana permanece sin prensar durante 3-24 horas. En industria se suele realizar una maceración en medio hidroazucarado, manteniendo en contacto la pulpa y el primer mosto obtenidos tras la molienda, o mediante el empleo de pectinasas u otras enzimas macerantes. Este proceso permite extraer compuestos que pueden influir en las características del producto final, tales como pectinas, aldehídos y alcoholes (Schreier y col., 1978). El mosto obtenido tras la maceración —denominado primer mosto o mosto flor— se almacena para su posterior mezclado con el mosto de prensa.
- Prensado. En esta etapa se extrae el mosto de la pulpa obtenida en la molienda. Tradicionalmente, la prensa más usada es la vertical discontinua o de cajón, de madera o acero inoxidable, con un sistema mecánico o hidráulico que ejerce presión desde la parte superior, disminuyendo la altura del contenido por efecto del prensado. Este prensado se realiza en varios ciclos que requieren remover la pulpa (corte) para facilitar el drenaje del mosto hacia la parte inferior de la prensa. El rendimiento de este tipo de prensas oscila entre el 75-80% según la temperatura del proceso, la madurez de la fruta y el número de cortes realizados.  
Frente al sistema lento de extracción de la fabricación tradicional, descrito en el párrafo anterior, en la industria se emplea un sistema de extracción rápido con prensas discontinuas —hidráulicas o neumáticas— y continuas —de tornillo o de bandas—, mediante tiempos cortos de prensado y mayor automatismo. Sin embargo, este sistema consigue un rendimiento de prensado ligeramente inferior a la extracción lenta, en torno al 70-75%, junto un mayor contenido en sólidos en suspensión y un déficit en compuestos aromáticos en el mosto. Ambos inconvenientes se pueden controlar: el primero mediante una etapa de clarificación y el segundo mediante la maceración comentada entre las etapas de molienda y de prensado.  
Finalmente, el mosto extraído del prensado, denominado generalmente mosto de prensa, se mezcla con el mosto flor o primer mosto, obtenido tras la maceración, y se mantiene a baja temperatura (10-12°C).

Una vez obtenido el mosto, se recurre a una etapa de clarificación previa a la fermentación que reduce los sólidos en suspensión, favorece la estabilidad microbiológica del mosto y limita la turbidez de la sidra. Un exceso de turbidez en el mosto, debida a sustancias insolubles como fibras, celulosa, hemicelulosas y

macromoléculas coloidales —pectinas, proteínas y polifenoles, entre otros— puede incrementar la velocidad de fermentación y con ello la producción de compuestos azufrados indeseables como sulfuros y de alcoholes superiores en cantidades superiores a las normales. La clarificación, que no se realiza en la elaboración tradicional de sidra, se puede llevar a cabo mediante dos técnicas extendidas en la industria:

- a) Clarificación enzimática. Método químico con solubilización e hidrólisis de pectinas asociadas a partículas en suspensión usando un complejo enzimático pectinolítico. Este proceso puede acompañarse de una posterior decantación —en inglés, *finning*— al añadir gelatina y bentonita al mosto: la primera insolubiliza partículas de carga negativa, mientras que la segunda interacciona con partículas proteicas de carga positiva. El proceso deriva en la formación de flóculos que sedimentan arrastrando partículas en suspensión y disminuyendo la turbidez del mosto.
- b) Defecación enzimática. De amplio uso en bodegas francesas, provoca la desmetilación de la pectina por acción de una pectin metilesterasa —PME—. El ácido péctico resultante se compleja con cloruro de calcio —CaCl<sub>2</sub>— formando un gel de pectato cálcico, que arrastra partículas en suspensión a la superficie.

En ambos casos, la clarificación modifica la composición del mosto, provocando un descenso en la concentración de proteínas y polifenoles, así como el perfil aromático de la sidra resultante, con variación en compuestos, según la tecnología de clarificación empleada, como el acetato de etilo y algunos alcoholes superiores (Mangas Alonso y col., 1996).

Una vez clarificado, el mosto obtenido experimenta una doble fermentación, alcohólica y maloláctica, realizada respectivamente por levaduras —principalmente del género *Saccharomyces*— y bacterias lácticas —principalmente la especie *Oenococcus oeni*—, bien presentes de forma espontánea en el proceso o bien inoculadas de forma controlada. Una vez consumido el oxígeno por levaduras oxidativas, las levaduras fermentativas del género *Saccharomyces* transforman los azúcares en etanol y gas carbónico en condiciones de anaerobiosis. Parte del ácido pirúvico resultante de la glucólisis de los azúcares experimenta una descarboxilación para convertirse en acetaldehído, que finalmente se reduce a etanol; mientras, por otra parte el piruvato es oxidado a gas carbónico por respiración celular en el ciclo de Krebs. Durante la glucólisis, un 8% de los azúcares experimentan una reacción paralela llamada fermentación glicero-pirúvica que origina glicerina, la cual protege a la célula del estrés osmótico (Mangas Alonso, 1992). Además, durante el proceso se sintetizan productos secundarios como ácido láctico, acético, succínico y málico, además de aminoácidos que retornan al medio tras la autólisis de las levaduras al final de la fermentación, una vez consumidos los azúcares fermentables del líquido. La duración de la fermentación alcohólica oscila entre diez y catorce días.

Durante la fermentación alcohólica, el desprendimiento de CO<sub>2</sub> arrastra materias en suspensión —material nitrogenado y pectínico— y forma espumas, mientras que las levaduras acaban por depositarse en el fondo y forman las conocidas *borras*, que producen una clarificación espontánea de la sidra, aunque parcial. Por este motivo, es conveniente realizar un proceso de clarificación entre la fermentación alcohólica y la maloláctica más profundo que recibe el nombre de *trasiego* y que elimina las borras y las espumas para obtener un líquido claro. El *trasiego*, además, elimina materia que podría servir de sustrato para el crecimiento de microorganismos alterantes, así como de las levaduras que podrían recuperar su actividad en posteriores operaciones y alterar el producto final.

Tras la fermentación alcohólica, las bacterias lácticas presentes en el medio o inoculadas de forma controlada en la industria, principalmente del género *Oenococcus*, inician la fermentación maloláctica que transforma el ácido málico en láctico. La actividad de las bacterias durante la etapa fermentativa anterior está limitada debido a la presencia de las levaduras, que inhiben su crecimiento debido a que consumen nutrientes esenciales como azúcares y aminoácidos. Sin embargo, la autólisis de las levaduras al final de la fermentación alcohólica devuelve al medio hasta un tercio de los nutrientes nitrogenados, que pueden ser utilizados por las bacterias lácticas para su crecimiento, lo cual facilita esta segunda fermentación, necesaria en la producción de sidra (Beelman y col., 1982).

Una vez finalizada la fermentación maloláctica y clarificada la sidra, el producto se embotella y se etiqueta para su comercialización.

### 2.3. Microbiología de la sidra

La elaboración de sidra es un proceso que requiere una obligada presencia de microorganismos en el mosto para llevar a cabo las fermentaciones alcohólica y maloláctica. Estos microorganismos constituyen uno de los factores determinantes de las características organolépticas del producto final, ya que influyen en el desarrollo del proceso metabolizando los azúcares y desdoblado las proteínas para originar etanol y productos responsables del aroma y del sabor.

En el mosto se puede encontrar una gran variedad de microorganismos con distinto origen: la piel de la manzana, los equipos de trabajo —prensas, fermentadores—, el suelo, el propio *llagar* y los utensilios empleados en la extracción, *trasiego* y fermentación, con levaduras del género *Saccharomyces*, bacterias lácticas de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Oenococcus*, y bacterias acéticas de los géneros *Gluconobacter* y *Acetobacter*. Esta situación se produce especialmente cuando se habla de métodos tradicionales de elaboración en los que no se aplican métodos industriales como el uso de cultivos iniciadores o *starters*.

A pesar de su riqueza nutritiva, la elevada acidez —pH— del medio convierte al mosto resultante del prensado de la manzana en un sustrato accesible a microorganismos ácido-tolerantes. La microbiota presente en el medio establece fenómenos de competencia microbiana, a raíz de los cuales pueden proliferar las levaduras y bacterias lácticas deseables para la fermentación del mosto de manzana y la producción de sidra o, por el contrario, microorganismos alterantes responsables de alteraciones de la sidra como el filado, el picado láctico y acético, y el amargor.

Las alteraciones en la sidra natural tienen una incidencia menor en el caso de productos industriales con una microbiología controlada como la sidra achampanada, dado que la tecnología empleada, inoculando cultivos iniciadores, dificulta la presencia de microorganismos alterantes. Así mismo, si la fermentación se inicia mediante un inóculo con la levadura deseada, se dificulta que otros microorganismos tomen el control de la fermentación, lo cual, sumado a procesos físicos como la filtración al final del proceso, contribuye a generar un producto final estable desde el punto de vista microbiológico.

### **2.3.1. Levaduras**

Las levaduras son microorganismos eucariotas unicelulares utilizados durante siglos por el hombre en la elaboración de productos fermentados como el pan, el vino y la cerveza, entre otros. Su crecimiento vegetativo se produce mayoritariamente por gemación o fisión binaria, y se clasifican según su desarrollo sexual en dos grandes divisiones: ascomicetos y basidiomicetos. Las principales especies de levaduras asociadas a la fermentación de la sidra pertenecen al grupo de los ascomicetos.

En la elaboración de sidra natural con fermentación no controlada, la fermentación alcohólica o tumultuosa tiene lugar sin el empleo de cultivos iniciadores, mediante la intervención exclusiva de la microbiota indígena que llega al mosto de forma espontánea a través de la superficie de la manzana o de los utensilios y equipos del lagar (Beech, 1993). En la manzana, las principales levaduras descritas en la literatura pertenecen a los géneros *Rhodotorula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Cryptococcus* y a la especie *Metschnikowia pulcherrima*, con escasa presencia de especies del género *Saccharomyces*, salvo en el caso de manzanas dañadas (Beech, 1972; Rosini y col., 1982). En consonancia con lo descrito, Bizeau y col. (1990) señalaron la presencia de las especies *Aureobasidium* sp., *Cryptococcus hungaricus*, *Hanseniaspora uvarum* y *Rhodotorula* sp. en la epidermis de manzanas de cultivares franceses.

No obstante, la diversidad de levaduras varía conforme avanza la maduración de la manzana, así como durante su recogida, transporte y almacenamiento; momento éste en el que puede producirse el incremento de representantes de los géneros *Saccharomyces*, *Hansenula* y *Pichia*, procedentes de los equipos de transporte, almacenamiento y

prensado, en detrimento de los géneros descritos con anterioridad, que representan grupos minoritarios en el mosto de manzana (Beech y Davenport, 1970; Cabranes, 1994).

Una vez prensada la manzana, la concentración de levaduras en el mosto puede alcanzar valores entre  $10^5$  y  $10^7$  ufc/ml, según el estado fitosanitario de la materia prima y de las condiciones de lavado y prensado (Cabranes y col, 1991; Dueñas y col, 1994). De forma general, se ha visto que la población de levaduras aumenta su concentración durante los primeros días de fermentación hasta valores de  $10^7$  ufc/ml y posteriormente sufre un declive hasta valores de  $10^1$ - $10^3$  ufc/ml, frente a un mantenimiento de los niveles numéricos de las bacterias lácticas responsables de la fermentación maloláctica (véase Figura 3).

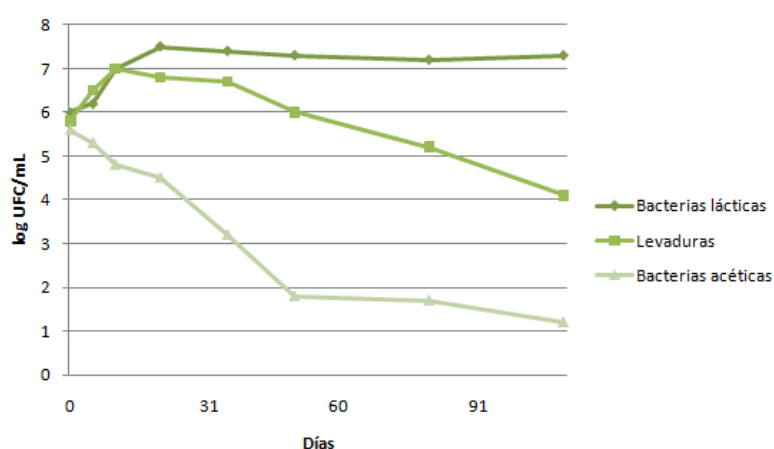


Figura 3: Perfil habitual de la evolución de la microbiota dominante en el proceso de fabricación de sidra natural en Asturias y en el País Vasco (Irastorza y Dueñas, 2011).

Al inicio de la fermentación tumultuosa crecen principalmente especies ajenas al género *Saccharomyces*, con una amplia presencia de levaduras apiculadas pertenecientes a los géneros *Hanseniaspora* —*H. valbyensis*, *H. uvarum* y *H. osmophila*— y *Kloeckera* —*K. apiculata*— (Michel y col., 1988). Las levaduras apiculadas tienen bajo rendimiento alcohólico y producen elevadas cantidades de productos secundarios como glicerina y compuestos volátiles; por el contrario, no toleran concentraciones elevadas de etanol —5-7%— y apenas sintetizan alcoholes superiores.

En mostos de sidra obtenidos por prensado tradicional en Asturias, Cabranes (1990) describió un predominio de *K. apiculata* frente a *H. uvarum* y *Pichia ohmeri* en experimentos realizados en plantas piloto, mientras que en plantas de elaboración tradicional observó por el contrario una mayor heterogeneidad microbiológica, con especies del género *Saccharomyces* —*S. bayanus* y *S. cerevisiae*— además de especies minoritarias como *K. apiculata*, *Candida vartiavaarae*, *Candida vini*, *Brettanomyces naardenensis* y *Pichia membranifaciens*. Más recientemente, Suárez Valles (2007) describió la presencia de *H. valbyensis*, *H. osmophila* y *M. pulcherrima* en mostos de manzana obtenidos por prensado tradicional, con la presencia de porcentajes intermedios de *S. bayanus* y *S. cerevisiae*, mientras que Pando Bedriñana (2010)

observó un predominio de *H. valbyensis* y una menor presencia de especies secundarias como *M. pulcherrima*, *H. uvarum* y *Candida parasilopsis* en muestras extraídas de mostos de manzana de dos cosechas no consecutivas.

A continuación, en la fase más activa de la fermentación alcohólica, se imponen levaduras con gran capacidad fermentativa como *Saccharomyces*, de escasa o nula presencia en la manzana, de lo que se deduce que son aportadas por los equipos del lagar (Cabranes y col., 1990; Dueñas y col., 1994). Las especies de este género colonizan el medio y desplazan significativamente al resto de levaduras, llegando a representar hasta el 90% del total una vez iniciada la fermentación maloláctica, independientemente de los tipos de prensado y de fermentación empleados (Cabranes, 1994).

Dentro del género *Saccharomyces*, se han identificado las especies *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. mikatae* y *S. kudriavzevii* en la fermentación espontánea de sidra (Pando y col., 2010; Coton y col., 2006; Suárez y col., 2007a). En este sentido, Cabranes (1990) identificó mediante caracterización fenotípica un predominio de *S. cerevisiae* —65,7%—, *S. steineri* —17,8%— y *S. bayanus* —12,4%— en tres lagares asturianos, frente a otras especies del mismo género menos representativas como *S. chevalieri* —3,6 %— y *S. aceti* —0,5%—.

Más recientemente, Pando Bedriñana (2010) describió, durante dos producciones no consecutivas en un mismo lagar de Asturias, un predominio de *S. cerevisiae* a lo largo de la fermentación, frente a porcentajes inferiores de *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. kudriavzevii* y *S. mikatae*. Por el contrario, Suárez Valles (2007a) observó resultados opuestos en dos fermentaciones de mosto de manzana realizadas en 2001 y 2002: una de ellas controlada por *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, tal y como se describe en la literatura, y otra con un predominio de *H. valbyensis*, cuya concentración a lo largo del proceso osciló entre el 36% y el 94% del total de levaduras presentes en el medio, frente a porcentajes mínimos de *S. bayanus*. Esta situación puede explicarse por la tecnología empleada en la elaboración tradicional de sidra, con bajas temperaturas, así como por un contenido bajo en azúcares que da lugar a un bajo contenido en alcohol, lo cual permite la supervivencia de levaduras apiculadas en el medio (Suárez y col., 2007a).

Dentro del género *Saccharomyces* hay que destacar también la presencia de un alto grado de polimorfismo, con la sucesión de diferentes cepas de *S. cerevisiae* y *S. bayanus* durante el proceso de fermentación del mosto (Suárez y col., 2007b). Además, la elevada variedad de cepas de *Saccharomyces* contrasta con la posible presencia de cepas con fenotipo *killer*, es decir, con capacidad para secretar polipéptidos tóxicos e inhibir el crecimiento de levaduras del mismo género: en el mismo estudio de Suárez Valles, se observó la baja frecuencia de levaduras tipo *killer* en Asturias (Suárez y col., 2007b).

Autor/a	Método de identificación	Distribución de levaduras (%)	
		Comienzo de fermentación	Final de fermentación
Cabranes y col., 1990	Caracterización fenotípica	<i>K. apiculata</i> (70%) <i>H. uvarum</i> (20%) <i>P. ohmeri</i> (10%)	<i>S. cerevisiae</i> (65.7%) <i>S. steineri</i> (17.8%) <i>S. bayanus</i> (12.4%) <i>S. chevalieri</i> (3.6%) <i>S. aceti</i> (0.5%)
Suárez y col., 2007a	ITS-RFLP	<i>S. bayanus</i> (32%) <i>H. valbyensis</i> (20%) <i>H. uvarum</i> (17%) <i>H. osmophila</i> (16%) <i>M. pulcherrima</i> (12%) <i>S. cerevisiae</i> (3%)	<i>H. valbyensis</i> (90%) <i>S. bayanus</i> (8%)
			<i>S. cerevisiae</i> (72%) <i>S. bayanus</i> (28%)
Pando y col., 2010	ITS-RFLP	<i>H. valbyensis</i> (75%) <i>H. uvarum</i> (15%) <i>M. pulcherrima</i> (10%)	<i>S. cerevisiae</i> (73%) <i>S. bayanus</i> , <i>S. pastorianus</i> , <i>S. kudriavzevii</i> , <i>S. mikatae</i> (27%)

Tabla 2: Distribución de especies de levaduras en diferentes estudios a lo largo de las diferentes etapas de la fermentación espontánea de mostos de manzana de Asturias.

En el embotellado, y a pesar de la disminución en la concentración, se vuelve a observar la presencia de algunos tipos de levaduras débilmente fermentativas y oxidativas como *Candida pelliculosa*, *C. vini* y *K. apiculata*, que pueden representar hasta un 20% de las levaduras presentes en la botella frente al 80% restante representado por especies de *Saccharomyces* (Cabranes, 1994). La presencia de estas especies se asocia a una aireación y contaminación paralelas al proceso de embotellado (Cabranes, 1994).

Diversos estudios describen también una diversidad microbiana variable según la localización geográfica, las variedades de manzana empleadas y la tecnología usada en la producción. Junto con las especies mencionadas, se ha descrito en Asturias la presencia en mostos de manzana de especies de los géneros *Candida* —*C. tropicalis*, *C. sake*, *C. stellata*, *C. oleophila*— (Coton y col., 2006) y *Pichia* —*P. anomala*, *P. fermentans*, *P. guilliermondii*, *P. nakasei*, *P. membranifaciens*— (Cabranes y col., 1990), además de *Metschnikowia pulcherrima* (Pando y col., 2010), *Lachancea cidri* (Dueñas y col., 1994), *Rhodotorula mucilaginosa*, *Torulaspota delbrueckii* y *S. ludwigii* (Dueñas y col., 1994; Coton y col., 2006), entre otras especies minoritarias.

En todo caso, teniendo presente los datos reflejados en los anteriores estudios, queda claro que la fermentación espontánea de la sidra asturiana está sujeta a unas grandes variaciones microbiológicas que pueden tener un origen diverso y que pueden influir notablemente en las características sensoriales del producto final.



En sidras elaboradas en Francia, Irlanda y Reino Unido se observó una evolución similar de la diversidad microbiana, con un predominio de levaduras apiculadas en la primera fase de la fermentación tales como *Hanseniaspora valbyensis* en sidra francesa (Michel y col., 1998) y *K. apiculata* y *H. uvarum* en sidra británica (Beech, 1993). Al igual que ocurre en la sidra asturiana, las levaduras apiculadas son desplazadas durante la fermentación alcohólica por cepas del género *Saccharomyces*, siendo descrita como principal levadura fermentativa *S. bayanus*. Al final de la fermentación, se describieron especies del género *Dekkera* (Morrisey y col., 2004)

Además de las levaduras descritas con anterioridad, que participan en la fermentación del mosto de manzana y en la síntesis de elementos responsables del aroma y del sabor, también pueden proliferar levaduras alterantes. Al respecto, las especies *Pichia membranifaciens* y *Candida valida*, capaces de vivir en la superficie de sidras embotelladas con una cámara de aire, son responsables, junto con las levaduras apiculadas, de la producción de sidras de bajo contenido alcohólico o baja graduación. Esto se debe a su capacidad oxidativa, mediante la cual degradan el etanol a anhídrido carbónico y agua.

En otros casos puede ocurrir una proliferación indeseable de levaduras una vez embotellado el producto. Esta situación ocurre cuando la sidra se embotella sin haber finalizado la fermentación. Por consiguiente, la fermentación continúa en el interior de la botella, lo cual origina enturbiamientos y posos debido a la proliferación de levaduras.

### 2.3.2. Bacterias lácticas

Las bacterias ácido-lácticas —abreviadas como BAL— o simplemente bacterias lácticas son un grupo heterogéneo de microorganismos Gram positivos, anaerobios estrictos o facultativos, no esporulados y catalasa negativos con capacidad de producir ácido láctico como consecuencia de la fermentación de azúcares. Este grupo de bacterias, ampliamente utilizadas en la industria como consecuencia de su actividad fermentativa y más recientemente como probióticos, incluye especies con características metabólicas y fisiológicas comunes, con géneros representativos como *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Propionibacterium* y *Bifidobacterium* —pertenecientes estos dos últimos géneros al filum *Actinobacteria* y, por lo tanto, no emparentadas filogenéticamente con las verdaderas BAL— además de otros géneros de menor relevancia tecnológica como *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Micrococcus* y *Carnobacterium*.

Varios representantes del grupo están presentes en la elaboración de sidra al ser responsables de la fermentación maloláctica, mediante la cual el ácido L-málico se transforma en ácido L-láctico. Durante este proceso fermentativo, además de producirse una disminución de la acidez, tiene lugar la síntesis de compuestos responsables del

aroma y del sabor de la sidra como glicerina, ácidos succínico y fumárico y diacetilo (Herrero y col., 2006).

De forma semejante a las levaduras, las bacterias lácticas en sidra elaborada por fermentación espontánea tienen su origen en la piel de la manzana y en los equipos y utensilios empleados en la fabricación de sidra, y alcanzan niveles en mosto recién prensado en torno a  $10^5$  y  $10^7$  ufc/mL (Salih y col., 1990). Estos valores favorecen un rápido inicio de la fermentación maloláctica, que discurre paralela a la alcohólica, y están influidos por el estado fitosanitario de la manzana, derivado del sistema de recolección y almacenamiento, y por la tecnología de prensado (Doores, 1983, Salih y col., 1990). Con respecto al sistema de recolección, Beech y Carr (1977) detectaron un aumento en la concentración de bacterias lácticas en fruta recolectada mecánicamente, con valores en torno a  $10^6$  ufc/mL, —frente a la recolectada manualmente, con valores de  $10^4$  ufc/mL.

Del mismo modo en que las levaduras inhiben el crecimiento de las bacterias lácticas durante la fermentación alcohólica, diversos autores señalan que éstas aceleran la muerte de las levaduras (King y Beelman, 1986). Esta disminución poblacional de las levaduras en el medio parece ser causada por la producción de metabolitos inhibitorios como el ácido láctico (Young y col., 1958), así como otros agentes tales como la ornitina, producido por las bacterias al final de la fermentación maloláctica (Kuensch y col., 1974).

La elevada cantidad de bacterias lácticas se mantiene durante la maduración de la sidra y el embotellado, dado que no se suele realizar una estabilización microbiológica, con perfiles de bacterias dominantes que varían según la composición química y la acidez de los mostos y los mecanismos de competencia con otros microorganismos (Wibowo y col., 1985).

Desde el punto de vista microbiológico, diversos estudios basados en criterios fenotípicos y morfológicos han señalado que la sidra natural de Asturias y el País Vasco presenta una microbiota láctica predominantemente heterofermentativa constituida principalmente por *Oenococcus oeni* —antiguamente *Leuconostoc oenos*— y *Lactobacillus brevis*, ambas aisladas a lo largo de las diferentes etapas de producción desde el prensado del mosto hasta el embotellado, pasando por la fermentación alcohólica y la maduración (Salih y col., 1988; Salih y col., 1990; Laplace y col., 1998). Ambas especies representan respectivamente el 86% y el 13% de la población láctica, frente a especies minoritarias y homofermentativas como *Pediococcus parvulus*, *P. damnosus*, *Lactobacillus mali* y *Lactobacillus plantarum*, que suponen el 1% de la microbiota láctica y se asocian a las primeras etapas de la fermentación alcohólica (Salih y col., 1990).

A nivel regional, Cabranes (1994) observó una variación temporal en las poblaciones bacterianas desde el inicio de la fermentación alcohólica hasta el embotellado. Al respecto, observó un predominio de *O. oeni* durante todo el proceso de elaboración de la

sidra asturiana, con una frecuencia media del 73,7% que se eleva hasta el 95,6% en el momento de la transformación maloláctica y disminuye hasta el 58,9% en el momento de la conservación y el embotellado. Por el contrario, especies como *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus collinoides* y *Pediococcus cerevisiae*, presentes al comienzo del proceso fermentativo, disminuyen su frecuencia durante la transformación maloláctica y vuelven a tener una representatividad significativa durante el embotellado (Cabranes, 1994).

En estudios más recientes, basados en la identificación mediante técnicas moleculares, se ha identificado la misma diversidad de géneros, si bien con variación en las especies dominantes. En este sentido, Sánchez y col. encontraron un predominio de *L. collinoides* —42,8%— a lo largo de la fermentación maloláctica, seguido de *O. oeni* —28,6%—, *P. parvulus* —21,4%— y especies minoritarias como *Lactobacillus casei* —6%— y *Pediococcus ethanodurans* —1%— (Sánchez y col., 2010).

Tanto *L. collinoides* como *P. parvulus*, aisladas en el estudio anterior como especies mayoritarias, han sido descritas en la literatura como microorganismos alterantes de la sidra: en el primer caso, *L. collinoides* puede transformar glicerol en acroleína y causar amargor (Claisse y col., 2001); en el segundo caso, *P. parvulus* es, junto con *L. diolivorans*, *L. collinoides* y *L. mesenteroides*, una de las principales especies asociadas al filado, enfermedad de la sidra causada por la síntesis de polisacáridos y elementos mucosos que dan a la sidra un aspecto oleoso una vez embotellada (Werning y col., 2006). Sin embargo, a pesar de la conexión de ambas especies con alteraciones de la sidra, algunos autores consideran necesario el crecimiento de especies de *Pediococcus* y *Lactobacillus* en la fermentación maloláctica para lograr las características típicas deseables en el producto final, siempre y cuando no se produzca un crecimiento excesivo (Davis y col., 1985).

Otra alteración de la sidra causada por bacterias lácticas fermentativas es el picado láctico, consistente en la síntesis de ácidos a partir de los azúcares del mosto por representantes del género *Lactobacillus* como *L. brevis*, *L. hilgardii*, *L. trichodes* y *L. huchneri*. Este fenómeno aumenta el contenido de ácidos volátiles, libera anhídrido carbónico y provoca una turbidez en el producto final acompañada de un aroma desagradable.

### 2.3.3. Bacterias acéticas

Las bacterias acéticas comprenden un grupo de bacilos Gram negativos, aerobios y acidófilos cuyo metabolismo está asociado a la oxidación incompleta de etanol y la producción de compuestos como ácido acético y acetaldehído. Son bacterias ubicuas en la naturaleza y descritas tanto en la piel como en la pulpa de la manzana, por lo que su presencia en sidra viene determinada por el estado fitosanitario del fruto, afectado,

como se ha venido repitiendo, por las técnicas de recolección, transporte y almacenamiento.

La concentración de bacterias acéticas en mostos puede oscilar entre  $10^4$  y  $10^6$  ufc/mL, disminuyendo hasta niveles del orden de  $10^2$  y  $10^3$  ufc/mL durante la fermentación y maduración de la sidra debido a las condiciones de anaerobiosis del medio (véase Figura 3). Sin embargo, en situaciones de microaerofilia se puede producir una proliferación indeseable de bacterias acéticas, dada la síntesis de metabolitos como ácido acético y acetaldehído, que dan origen al llamado picado acético y a un empobrecimiento de la calidad de la sidra, y de compuestos cetónicos con capacidad de unirse al  $\text{SO}_2$ , disminuyendo la efectividad del sulfitado (Whiting, 1973). Su proliferación puede evitarse mediante el empleo de buenas prácticas de higiene, el uso de materia prima en condiciones fitosanitarias adecuadas, el sulfitado con  $\text{SO}_2$  y técnicas que limiten la aireación de la sidra como el llenado completo de las barricas o el trasvase mediante bombas positivas.

En la sidra natural asturiana y vasca se ha descrito *Gluconobacter oxydans* como especie acética mayoritaria durante las etapas pre-fermentativas. Su intolerancia al etanol hace que su prevalencia disminuya de forma paralela al aumento de especies del género *Acetobacter*: en sidras del País Vasco se encontró un predominio de *A. hansenii* —actualmente *Gluconacetobacter hansenii*— y *A. pasteurianus* (Fernández y col., 1994), mientras que en sidra asturiana se encontró un predominio de *A. aceti* y otras especies de menor relevancia como *A. liquefaciens* —actualmente *Gluconacetobacter liquefaciens*— y *A. pasteurianus* (Salih y col., 1990).

#### 2.3.4. Otros géneros

Además de las levaduras y las bacterias lácticas y acéticas, la microbiota de la sidra se completa con otros microorganismos minoritarios como las bacterias del género *Zymomonas*. Dentro del género, la especie *Zymomonas mobilis*, un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo y catalasa positivo, es responsable de una alteración denominada afrutado o «framboisé», de mayor incidencia en sidras francesas, en el cual la sidra adquiere un sabor aframbuesado debido a la síntesis de acroleína en el medio favorecida por temperaturas elevadas y fermentaciones ralentizadas (Beech y Carr, 1977).

## 2.4. Técnicas de laboratorio

### 2.4.1. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR —del inglés *Polymerase chain reaction*— es una técnica de biología molecular cuya finalidad es la amplificación de un determinado fragmento de ADN en varios órdenes de magnitud y la consiguiente obtención de un elevado número de copias del fragmento de ADN.

La técnica fue descrita de forma teórica en 1971 por Kjell Kleppe y colaboradores en un artículo de la revista *Journal of Molecular Biology*, en la cual definieron la necesidad de usar dos cebadores para replicar un segmento específico de ADN. No obstante, y a pesar de los antecedentes, la invención de la PCR fue acreditada al bioquímico Karry Mullis, que desarrolló la técnica en 1983 y cuyo trabajo le valió el Premio Nobel de Química en 1993.

La técnica se basa en la capacidad de la enzima ADN polimerasa para replicar de forma natural el ADN celular. Al aplicar calor en presencia de un tampón apropiado, la doble hélice de ADN se desnaturaliza, lo que favorecerá la acción de la enzima en la tercera y última etapa. La técnica requiere el empleo de *primers* o cebadores, una serie de oligonucleótidos sintetizados artificialmente que delimitan la región de ADN a multiplicar. Estos *primers* son complementarios a secuencias colindantes de la región a amplificar, y se unen a una temperatura dependiente de cada par de cebadores e inferior a la de desnaturalización en la etapa de síntesis del proceso.

Una vez unidos los cebadores, se aumenta la temperatura para favorecer la acción de la ADN polimerasa. La enzima más utilizada en PCR es la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, una bacteria termófila descubierta en 1969 en un manantial del Parque Nacional de Yellowstone. La introducción de una ADN polimerasa termorresistente facilitó la técnica al resistir a la temperatura de desnaturalización del ADN en la primera etapa de la PCR.

En la última etapa de la PCR, la ADN polimerasa de *T. aquaticus* —más comúnmente llamada Taq polimerasa— sintetiza la nueva cadena de ADN al unirse al *primer* correspondiente y emparejando los desoxirribonucleótidos trifosfato —dNTPs— presentes en el sustrato con los nucleótidos complementarios en la cadena molde de ADN. Una vez finalizada la síntesis de la hebra complementaria, se repite el proceso *ad libitum*, tantas veces como se requiera para obtener el número necesario de copias.

En general, el proceso requiere los siguientes reactivos:

- ADN molde con la región a amplificar de interés.
- ADN polimerasa.
- Cebadores complementarios a secuencias colindantes de la región a amplificar; generalmente de 18-20 pb de tamaño.
- Cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), cofactor de la reacción.

- Solución tampón para mantener el pH óptimo durante la reacción.

La mezcla se introduce en un termociclador, equipo de laboratorio en el que se programa el número de ciclos y los cambios de temperatura dentro de cada uno de ellos. Cada ciclo consta de las siguientes etapas:

1. Inicio. Se aumenta la temperatura hasta 94-96°C durante 1-9 minutos para desnaturalizar y separar la doble hélice del ADN molde.
2. Fase de ciclado. Se repiten tres etapas:
  - a) Desnaturalización. Se desnaturaliza el ADN de doble cadena a una temperatura dependiente de la proporción G+C —guanina y citosina— presente en la cadena. Generalmente se utilizan temperaturas que oscilan entre 94 y 96 °C, durante un tiempo corto, entre 20 y 30 segundos.
  - b) Anillamiento. Una vez separadas las cadenas de ADN, se hibridan los cebadores a sus secuencias complementarias. La temperatura y el tiempo de anillamiento dependen del par de *primers* utilizados en la reacción.
  - c) Extensión. La ADN polimerasa sintetiza la cadena complementaria a la hebra molde añadiendo dNTPs complementarios en dirección 5' → 3'. Si se utiliza la Taq polimerasa, la temperatura óptima del proceso es de 72°C. El tiempo de extensión depende de la longitud del fragmento a amplificar.
3. Elongación final. Permite completar la extensión de las cadenas incompletas en las etapas anteriores a una temperatura entre 70 y 74°C durante 5-15 minutos tras el último ciclo.
4. Conservación. La muestra se mantiene a 4°C en el termociclador para conservar el producto.

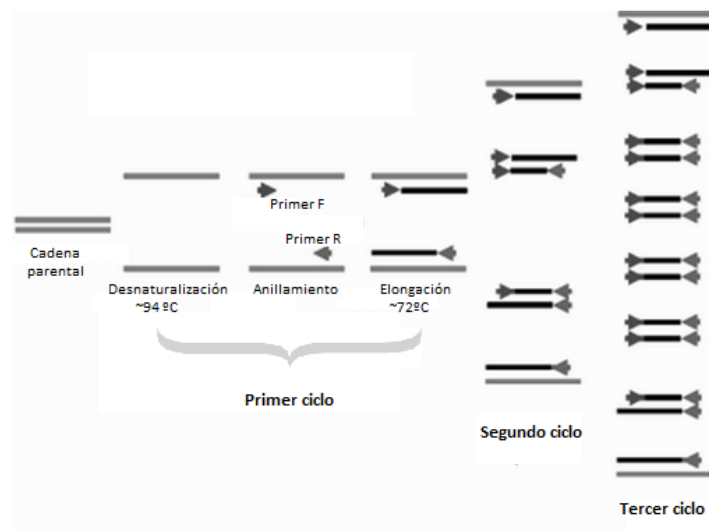


Figura 4: Esquema de las tres etapas cíclicas (desnaturalización, anillamiento y extensión) de una PCR.

#### 2.4.2. DGGE

La electroforesis en gel de gradiente desnaturante o DGGE —del inglés *denaturing gradient gel electrophoresis*— es una técnica molecular basada en una electroforesis que usa un gradiente químico de urea y formamida para desnaturar amplicones de ADN a medida que se mueven en un gel de acrilamida.

La DGGE, desarrollada por el científico Leonard S. Lerman, fue en principio usada para identificar mutaciones puntuales en genes humanos responsables de diferentes enfermedades (Fischer y Lerman, 1983). En años posteriores, su uso se amplió al estudio de comunidades microbianas en Ecología Marina (Lyautey y col., 2004) y con más profundidad en Microbiología de los Alimentos, con la caracterización de poblaciones responsables de la fermentación y/o maduración de productos como el queso siciliano artesanal (Randazzo y col., 2002), el queso azul Stilton (Ercolini y col., 2003), el queso Cabrales (Flórez y Mayo, 2006) y el *kimchi*, un plato tradicional de la gastronomía coreana compuesto por vegetales fermentados (Chang y col., 2008). Gran parte de los estudios se basaron en la variación nucleotídica interespecífica del gen ARNr 16S, que codifica el ARNr de la subunidad menor del ribosoma de los procariotas.

El método requiere la amplificación previa de un gen altamente conservado entre especies como el ARNr 16S mediante una PCR ligeramente modificada, en la que se utiliza un cebador con una pinza G+C —*GC clamp*— de un tamaño de 50 pb. Esta pinza evita que la doble hélice de ADN se disocie por completo cuando el amplicón se mueve en el gel de acrilamida. En general, los fragmentos de ADN amplificados deben tener un tamaño entre 200 y 500 pb, ya que secuencias de mayor tamaño pueden generar artefactos en la DGGE. Para que los resultados finales proporcionen datos fiables de la microbiota de un ecosistema, es necesario realizar una extracción completa y representativa del ADN microbiano total de la muestra.

Al amplificar por PCR el ADN de una comunidad microbiana, el resultado que se obtiene son múltiples copias del gen diana de todos los microorganismos presentes en la comunidad. Por tanto, el amplicón incluye fragmentos del mismo tamaño que difieren únicamente entre sí por su secuencia nucleotídica, variable entre especies. Esta característica confiere a los fragmentos de cada especie distinta movilidad electroforética en un gel de acrilamida con un gradiente desnaturante creciente, de modo que cuando sufren la desnaturación de la doble hélice, el fragmento de ADN frena su migración. En definitiva, la DGGE permite diferenciar fragmentos de igual tamaño, ya que la desnaturación progresiva en el gel depende de la secuencia nucleotídica, a diferencia de una electroforesis convencional, en la que las bandas de ADN que tienen el mismo tamaño migran a la misma posición.

La base bioquímica de esta separación está en el principio de que concentraciones crecientes de un agente desnaturante separarán la doble hélice de ADN en diferentes dominios internos. Cuando el dominio con la menor temperatura de unión alcanza la

concentración idónea de agente desnaturante en el gel, el ADN se desnatura parcialmente, creando moléculas con aperturas que experimentan menor movilidad (Fischer y Lerman, 1983). El entorno desnaturante se crea con una temperatura de funcionamiento uniforme —entre 50 y 65°C— y un gradiente desnaturante creciente formado por urea y formamida.

En sustitución del ADN, la técnica también permite usar moléculas de ARN mediante transformación previa en ADN complementario o ADNc por acción de una transcriptasa reversa. Esta alternativa permite conocer el estado metabólico de los microorganismos en la comunidad estudiada, ya que la actividad celular será directamente proporcional a la cantidad de ARN total presente en la célula. Una vez finalizada la electroforesis, las bandas resultantes se pueden identificar mediante comparación con bandas generadas por cepas patrón, o bien se puede recortar, aislar y purificar el ADN y someterlo a una reamplificación y secuenciarlo.

El método ofrece ventajas frente a técnicas convencionales como la rapidez, la sencillez, la independencia de cultivo, la capacidad de estudiar muestras heterogéneas y de realizar un seguimiento temporal y espacial de comunidades microbianas en diferentes hábitats. Sin embargo, al igual que cualquier técnica analítica, presenta inconvenientes como una incorrecta identificación ocasional de la especie a la que pertenece una determinada banda. Esto puede deberse tanto a una movilidad electroforética similar para secuencias de diferentes especies como por la observación solo de bandas para las especies dominantes en la muestra. No obstante, bandas que se aprecien tenues pueden recortarse y someterse a una nueva PCR y a otra electroforesis.

Además de los inconvenientes mencionados, la separación electroforética puede ser reducida para amplicones con tamaños superiores a 500 pb, y pueden formarse heterodúplex —híbridos entre secuencias de distintas especies— durante la migración en el gel y que tergiversen los resultados finales. Así mismo, la heterogeneidad de los operones ribosómicos, relativamente frecuente en procariotas y eucariotas, provoca que bandas diferentes puedan pertenecer a una sola especie.

### **2.4.3. Secuenciación de ADN**

La secuenciación es una técnica de análisis molecular que permite determinar la composición y el orden de los nucleótidos que forman un fragmento de ADN. Para determinar la secuencia de un fragmento de ADN, es necesario multiplicar el número de copias de dicha molécula mediante una PCR o usando vectores de clonación.

En el método de Sanger, que debe su nombre al bioquímico Frederick Sanger, la amplificación sigue una reacción similar a una PCR convencional. Al igual que en la PCR descrita, entre los componentes de la reacción se incluye una ADN polimerasa termorresistente, el ADN molde —producto de la amplificación anterior— y los cuatro dNTPs. Sin embargo, la reacción utiliza un único cebador, de modo que solo copia una



de las cadenas, e incluye didesoxinucleótidos —ddNTPs—, semejantes a los dNTPs salvo por la ausencia de un grupo hidroxilo en la desoxirribosa. Esta característica hace que, una vez incorporados a la cadena en crecimiento, la síntesis de la nueva cadena quede interrumpida.

La amplificación da como resultado una mezcla de cadenas complementarias al ADN molde con tamaños que difieren entre sí en un solo nucleótido. Además, cada cadena finaliza en un ddNTP marcado con un fluorocromo, lo que permite identificar el último nucleótido de cada cadena.

La mezcla de fragmentos obtenidos se mueve a continuación en una electroforesis capilar en función de su tamaño: al ser sometidos a un campo eléctrico, los fragmentos de menor tamaño se desplazan más rápido que los de mayor tamaño, de modo que se ordenan de menor a mayor. Al final del circuito, los fluoróforos de los ddNTPs son excitados por un haz de rayos láser, y la medida de la fluorescencia emitida permite su reconocimiento.

Las diferentes longitudes de onda son captadas en orden por un detector, que envía la información a un *software* informático donde se genera un electroferograma. Esta representación incluye los picos correspondientes a los sucesivos fragmentos, utilizando un código de colores que asigna un color a las longitudes de onda emitidas por cada ddNTP, y muestra la secuencia correspondiente al fragmento original. Previo al cotejo con la base de datos, es necesario evaluar el resultado para corregir posibles errores o regiones sin asignar debido a solapamientos entre picos.

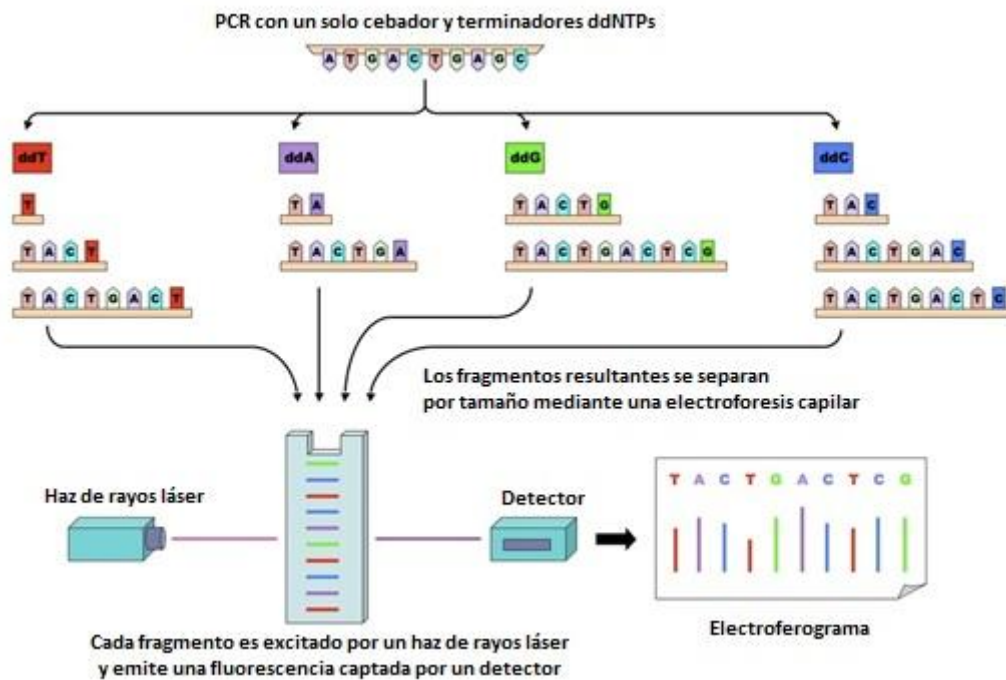


Figura 5: Diagrama de la secuenciación de ADN por el método de Sanger.

Una vez finalizada la secuenciación y obtenida una secuencia de nucleótidos, se puede comparar con secuencias depositadas en las bases de datos disponibles en Internet como GenBank, EMBL —*European Molecular Biology Laboratory*—, RIDOM —*Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms*— y RDP —*Ribosomal Database Project*— entre otras, usando programas informáticos como BLAST. El *software* permite visualizar una lista de secuencias similares a la secuencia problema —*query*—, los alineamientos con respecto a ella y los respectivos porcentajes de homología, asociando finalmente la secuencia problema a una especie en concreto.

Hay que tener presente, sin embargo, que la comparación de secuencias parciales del gen que codifica el ARNr 16S no siempre permite la identificación precisa de una especie microbiana. Desde el punto de vista genético, por ejemplo, la especie bacteriana se define en taxonomía como un conjunto de cepas que comparten una similitud del 70% o más en experimentos de reasociación ADN-ADN. Stackebrandt y Goebel (1994) demostraron que cepas con dicho nivel de relación en los genomas completos presentan una homología del 97% o más entre las secuencias de sus genes ARNr 16S. Por tanto, secuencias de este gen con menos de un 97% de homología en las secuencias de sus ARNr 16S se dice que pertenecen a especies distintas.

### ***3. METODOLOGÍA***

### 3.1. Lixiviado de manzanas

El estudio de la microbiota presente en la piel de la manzana se llevó a cabo con cinco muestras de variedades reconocidas por el Consejo Regulador de la Denominación de Origen Protegida —D.O.P.— «Sidra de Asturias» y pertenecientes a dos bloques tecnológicos según la siguiente tabla:

Bloque tecnológico	Variedad
Ácido	Limón Montés Raxao Xuanina
Acidulado o semiácido	Carrió Solarina

Tabla 3: Bloques tecnológicos de las variedades de manzana estudiadas.

La microbiota total presente en la piel de las manzanas se recogió mediante lixiviado de la piel con agua destilada. El lavado se realizó por inmersión de las manzanas en cinco vasos de precipitados de tres litros de capacidad, uno por cada variedad, con dos litros de agua destilada. Las manzanas se mantuvieron en remojo en los vasos de precipitados durante veinte minutos y se facilitó la separación de la microbiota de la manzana y su transferencia al agua mediante agitación.

A continuación, el contenido de los vasos de precipitados se filtró usando papel de filtro para eliminar tierra y partículas en suspensión. En la siguiente etapa, se crearon dos alícuotas de un litro por cada variedad de manzana —diez en total— y se filtraron usando un sistema de filtración al vacío. El equipo utilizado consistió en un embudo Büchner con filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro acoplado a un kitasato con pinza y sometido a vacío mediante una bomba. Los diez filtros —dos por cada variedad estudiada— con los microorganismos procedentes de las muestras originales se conservaron a una temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2. Extracción de ADN

Una vez recogida la microbiota de las variedades de manzana estudiadas en filtros de 0,45  $\mu\text{m}$ , se extrajo el ADN total de los microorganismos presentes en la muestra. Para ello se utilizó el kit de extracción Tissue DNA Spin —E.Z.N.A.<sup>®</sup>—, válido no solo para extraer ADN de tejidos orgánicos, sino también para extraer ADN de filtros de nitrato de celulosa y cuyo protocolo incluyó las siguientes etapas:

- Lisis celular. Para cada variedad estudiada, se introdujo la mitad de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de buffer TL y 25  $\mu\text{L}$  de proteasa OB y se mantuvo en un baño a  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación durante 90 minutos. A continuación, se centrifugó el contenido a 13,000 x g durante 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a nuevos tubos de microcentrífuga.

- Inactivación de la proteasa. Se añadieron 200 µL de buffer BL a los tubos de microcentrífuga y se incubó a 70°C durante 10 minutos con el fin de inactivar la actividad de la proteasa OB añadida en la primera etapa.
- Aislamiento del ADN. El ADN presente en el medio líquido se separó del resto de moléculas añadiendo 220 µL de etanol absoluto a la muestra. El contenido se transfirió a una minicolumna HiBind® ADN ensamblada en un tubo de colección de 2 mL y se centrifugó a 10,000 x g durante 1 minuto para unir el ADN a la matriz de la minicolumna.

Las minicolumnas se transfirieron a nuevos tubos de colección. A cada tubo se añadieron 500 µL de buffer HB y se centrifugó nuevamente a 10,000 x g durante 30 segundos. Las minicolumnas se transfirieron nuevamente a otros tubos de colección y se repitió el proceso anterior añadiendo 700 µL del tampón de lavado —DNA Wash Buffer— en dos etapas sucesivas, eliminando el contenido de los tubos de colección tras centrifugar durante 30 segundos a 10,000 x g.

- Elución del ADN. Tras descartar los tubos de colección en la etapa anterior, se introdujeron las minicolumnas en tubos eppendorf de 1,5 mL y se añadieron 100 µL del tampón de elución —Elution Buffer, 10 mM Tris, pH 8,5— a 70°C. El contenido se incubó durante dos minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 10,000 x g durante un minuto para transferir el ADN, hasta ahora ligado a la matriz de la minicolumna, a los tubos eppendorf.

Los cinco tubos eppendorf correspondientes al ADN total extraído de las cinco variedades de manzana a estudiar se conservaron a una temperatura de -20 °C hasta su uso.

### 3.3. PCR

El ADN aislado en la etapa anterior se usó como molde para amplificar mediante PCR dos regiones variables de los operones ribosomales microbianos: la región V3 del gen codificante del ARNr 16S de los procariontes y el dominio D1 del gen codificante del ARNr 28S de los eucariotas.

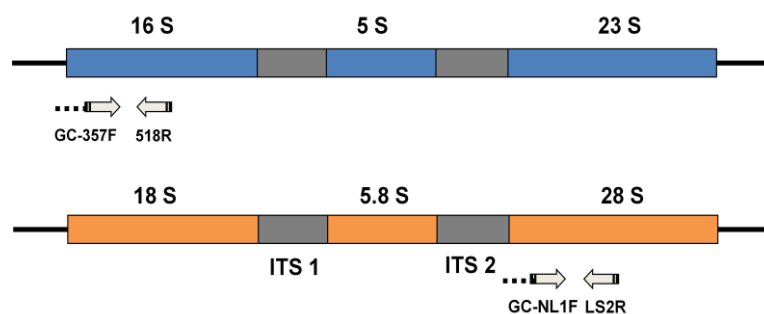


Figura 6: Estructura de los operones ribosomales en bacterias (arriba) y levaduras (abajo), y aproximación de los fragmentos amplificados con los cebadores descritos.

En ambos casos, y en etapas separadas, se utilizaron los siguientes reactivos en las cantidades expresadas en la tabla 4 para cada muestra y con un volumen final de 50  $\mu\text{L}$ :

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Taq 2x Master Mix Red	25
Primer A (10mM)	1
Primer B (10mM)	1
ADN molde	4
Agua bidestilada	19

Tabla 4: Reactivos utilizados en la PCR de bacterias y levaduras.

La Taq DNA Polimerase 2x Master Mix Red —Ampliqon<sup>®</sup>— utilizada en la PCR es una mezcla de reactivos que incluye Taq ADN polimerasa —0,2 unidades/ $\mu\text{L}$ —, dNTPs —0,4 mM—, cloruro de magnesio —4 mM—, Tris-HCl pH 8.5 y un colorante rojo.

Para la amplificación de la región V3 del gen ARNr 16S de bacterias, los cebadores utilizados fueron el oligonucleótido universal F357, con la secuencia 5'-TAC GGG AGG CAG CAG-3', y el R518, con la secuencia 5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3, que originan un amplicón de aproximadamente 217 nucleótidos (Muyzer y col., 1993). Una pinza GC de secuencia 5'-CGC CCG CCG CGC GGC GGG CGG GGC GGG GGCA CGGG GCC-3' se unió al primer cebador para obtener la versión F357-GC, necesario en el posterior análisis mediante DGGE.

En el caso de eucariotas, el dominio D1 del gen codificante del ARNr 26S se amplificó usando los cebadores NL1, con la secuencia 5'-GCC ATA TCA ATA AGC GAG GAA AAG-3', y LS2, con la secuencia 5'-ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3'. El *primer* NL1 incluyó una pinza GC de secuencia idéntica a la descrita para bacterias (Cocolin y col., 2002).

La amplificación se realizó usando un termociclador MyCycler —BioRad<sup>®</sup>— con 35 ciclos en ambas reacciones, aunque empleando temperaturas y tiempos variables en bacterias y levaduras (Tablas 5 y 6):

Fase	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo (min)	Ciclos	
Desnaturalización inicial	95	5:00	1	
Amplificación	Desnaturalización	95	0:30	35
	Anillamiento	56	0:30	35
	Elongación	72	0:40	35
Elongación final	72	10:00	1	

Tabla 5: Procedimiento de PCR para amplificación en bacterias.

Fase		Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial		95	4:00	1
Amplificación	Desnaturalización	95	0:30	35
	Anillamiento	52	1:00	35
	Elongación	72	1:00	35
Elongación final		72	7:00	1

Tabla 6: Procedimiento de PCR para amplificación en levaduras.

### 3.4. Electroforesis en gel de agarosa

El resultado de la amplificación anterior se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa, con el fin de comprobar la correcta amplificación de los fragmentos seleccionados y la ausencia de bandas inespecíficas.

Las electroforesis, una para bacterias y otra para levaduras, se realizaron con un gel de agarosa al 1% (p/v), para lo cual se disolvió un gramo de agarosa en polvo en 100 mL de tampón tris-acetato-EDTA —TAE— 1X. En ambos casos, una vez solidificado el gel e inmerso en la cubeta de electroforesis, se cargaron 5 µL de cada muestra en diferentes pocillos y se añadió 4 µL del marcador GRS Universal Ladder —Grisp®—, y se corrieron a 75 V durante 40 minutos.

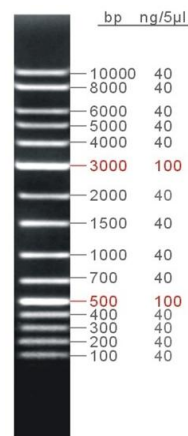


Figura 7: Marcador GRS Universal Ladder

Tras finalizar la electroforesis, los geles se revelaron por inmersión en una solución de bromuro de etidio —BrEt— durante quince minutos. El resultado se visualizó en un transiluminador con luz ultravioleta y se fotografió.

### 3.5. DGGE

La separación de los fragmentos amplificados en función de su secuencia nucleotídica se llevó a cabo mediante geles de gradiente desnaturante en un equipo DCode™ Universal Mutation Detection System —BioRad®—:

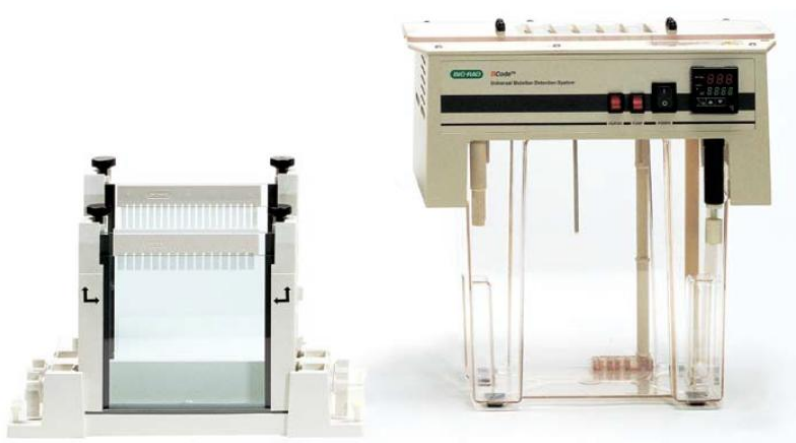


Figura 8: Visión parcial de un equipo DCode Universal Mutation Detection System (BioRad).

Tanto en el caso de bacterias como de levaduras, el material amplificado en la etapa previa de PCR se sometió a electroforesis en sendos geles de poliacrilamida con un rango desnaturante de 40-60%. La elaboración del gradiente se realizó partiendo de dos soluciones 0% y 100% desnaturantes de poliacrilamida al 8% (v/v) con las composiciones descritas en la Tabla 7:

Solución 0% desnaturante (8% PAG)		Solución 100% desnaturante (8% PAG)	
Reactivo	Volumen	Reactivo	Volumen
Acril-bisacrilamida 40% 37.5:1	200 mL	Acril-bisacrilamida 40% 37.5:1	200 mL
Buffer TAE 50x	10 mL	Buffer TAE 50x	10 mL
Agua destilada	790 mL	Formamida	400 mL
		Urea	421.6 gr
		Agua destilada	Hasta 1000 mL

Tabla 7: Composición de las soluciones de acrilamida 0% y 100% desnaturantes.

Una vez montados los cristales y dispuesto el equipo, se prepararon los geles utilizando las soluciones anteriormente descritas. Cada gel estuvo constituido por tres secciones: un *plug* o zona de sellado en la parte inferior, el gel con gradiente químico creciente propiamente dicho —en el caso descrito, un gradiente 40-60%—, y un *sticking* o zona superior sin gradiente y de condiciones similares al *plug*. En ambos casos, las tres partes de los geles incluyen los reactivos descritos en la siguiente tabla:



Reactivo	Volúmenes			
	<i>Plug</i>	Solución 40% desnaturalizante	Solución 60% desnaturalizante	<i>Stucking</i>
<b>Sol. 0% desnaturalizante (8% PAG)</b>	1,5 mL	7,8 mL	5,2 mL	9 mL
<b>Sol. 100% desnaturalizante (8% PAG)</b>	-	5,2 mL	7,8 mL	-
<b>TEMED</b>	4,5 µL	13 µL	13 µL	13 µL
<b>Persulfato amónico (APS) 10% (p/v)</b>	30 µL	50 µL	50 µL	50 µL

Tabla 8: Composición de las partes incluidas en el gel de DGGE.

A excepción de los sellados superior e inferior, que se realizaron manualmente usando una pipeta, el gradiente desnaturalizante fue elaborado por un gradientador automático SG30 —Hoefer®— unido a una bomba peristáltica P-1 —GE Healthcare®— al que se añadieron las soluciones 40% y 60% desnaturalizantes. Una vez solidificados los geles, se cargaron las muestras —7 µL de ADN y 3 µL de tampón de carga 6X— y se introdujeron en la cubeta de electroforesis, llena con ocho litros de tampón TAE 1X —160 mL TAE 50X y 7840 mL de agua destilada— y precalentada a una temperatura de 60 °C.

Además de las muestras, en la DGGE de bacterias se añadieron 10 µL de dos marcadores preparados en el IPLA con ADN de cepas aisladas e identificadas, según se indica en la tabla siguiente:

<b>Marcador A</b>	<b>Marcador B</b>
<i>Lactococcus garvieae</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>Staphylococcus parauberis</i>	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Lactobacillus paracasei</i>

Tabla 9: Marcadores utilizados en la DGGE de bacterias.

Tanto en la DGGE de bacterias como de levaduras, la electroforesis se mantuvo durante 16 horas a 75 V (Muyzer, 1993). Una vez finalizado el proceso, el revelado se realizó por inmersión de los geles en una solución de bromuro de etidio —0,5 µg/ml— durante 10 minutos. A continuación se lavaron los geles con agua destilada durante otros 10 minutos y se visualizaron y fotografiaron en un transiluminador con luz ultravioleta.

### 3.6. Reamplificación y purificación de bandas

Las bandas presentes en los geles de poliacrilamida —un total de ocho en bacterias y seis en levaduras— se identificaron mediante aislamiento, reamplificación y secuenciación en los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Oviedo. Tras recortar las bandas con cuchillas, se introdujeron en tubos eppendorf de 1,5 mL a los que se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada. El ADN se dejó difundir del gel al agua durante dos días, conservando los tubos a 4°C.

Las soluciones obtenidas se utilizaron como molde para una etapa de reamplificación mediante dos reacciones de PCR, usando versiones sin pinza GC de los cebadores F357 y NL1 en bacterias y levaduras respectivamente. Los reactivos y cantidades utilizadas en sendas reacciones para bandas de bacterias y de levaduras, con un volumen total por reacción de 40  $\mu\text{L}$ , se expresan en la siguiente tabla:

Reactivo	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
Taq polimerasa (5 U/ $\mu\text{L}$ )	0,6
Primer A (10 mM)	2
Primer B (10 mM)	2
Buffer	4
MgCl <sub>2</sub>	2
dNTPs (2,5 $\mu\text{M}$ )	4
ADN muestra	5
Agua destilada	20,4

Tabla 10: Reactivos utilizados en la reamplificación de bandas aisladas de DGGE.

La amplificación se realizó usando un termociclador Applied Biosystems® —Invitrogen— con ciclos idénticos a los descritos en las Tablas 5 y 6 para bacterias y levaduras respectivamente. A continuación se realizaron dos electroforesis en geles de agarosa al 1%, para amplicones de bacterias y levaduras respectivamente, en las que se cargaron mezclas de 20  $\mu\text{L}$  de muestra de ADN y 3  $\mu\text{L}$  de tampón de carga —0,25% (p/v) azul de bromofenol y 40% (p/v) sacarosa en H<sub>2</sub>O—, además de 2  $\mu\text{L}$  del marcador Low DNA Mass Ladder® —Invitrogen—, compuesto por una mezcla de seis fragmentos entre 100 y 2000 pb que incluyen, de mayor a menor contenido, 200, 120, 80, 40, 20 y 10 ng de ADN respectivamente (Figura 7).

Los geles se corrieron a 90 V durante 40 minutos y se revelaron por inmersión en solución de bromuro de etidio durante quince minutos. El resultado se visualizó y fotografió en un transiluminador con luz ultravioleta.

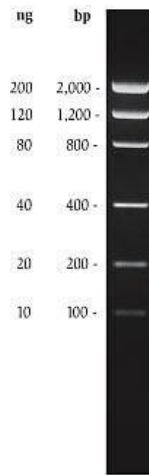


Figura 9: Marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).

A continuación, las bandas resultantes de la reamplificación se recortaron en los geles de agarosa, se aislaron en respectivos tubos eppendorf de 1,5 mL y se pesaron, obteniendo los resultados en la siguiente tabla:

<b>Muestra (bacterias)</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>	<b>d</b>	<b>e</b>	<b>f</b>	<b>g</b>	<b>h</b>
<b>Peso (g)</b>	0.12	0.05	0.12	0.09	0.06	0.02	0.08	0.12
<b>Muestra (levaduras)</b>	<b>i</b>	<b>j</b>	<b>k</b>	<b>l</b>	<b>m</b>	<b>n</b>		
<b>Peso (g)</b>	0,08	0,1	0,12	0,11	0,09	0,08		

Tabla 11: Peso en gramos de las bandas observadas en la reamplificación.

Una vez conocido el peso, se usó el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System — Promega— para extraer y purificar el ADN presente en los fragmentos de agarosa, correspondientes a las bandas recortadas previamente en los geles de DGGE. La purificación en esta etapa permite la eliminación de subproductos, *primers* y elementos contaminantes que limiten un correcto desarrollo de la secuenciación posterior. El kit incluyó cuatro etapas:

- Disolución del gel. Se añadieron 10 µl de la solución Membrane Binding por cada 10 mg de gel recortados a los tubos eppendorf de 1,5 mL. Los tubos se incubaron a 65°C durante 20 minutos hasta observar la correcta disolución del gel.
- Unión del ADN a membrana. Se transfirió la mezcla de gel disuelto y de ADN a un complejo formado por una minicolumna dentro de un tubo de recogida: la minicolumna incluye una membrana que facilita la unión del ADN. Los tubos se incubaron durante un minuto a temperatura ambiente y se centrifugaron a 13.000 x g durante un minuto. El exceso de líquido en los tubos de recogida se desechó y se reinsertaron las minicolumnas en los tubos correspondientes.

- Lavado. Se añadieron 700 µl por tubo de una solución de lavado con etanol y se centrifugaron a 13.000 x g durante un minuto. El líquido recogido en los tubos se eliminó y se repitió el mismo paso con 500 µl de la misma solución. Finalmente, el tubo de recogida se desechó y se transfirieron las minicolumnas a tubos eppendorf limpios.
- Elución. Se añadieron 50 µl de agua libre de nucleasa por minicolumna, se incubaron a temperatura ambiente durante un minuto y se centrifugaron a 13.000 x g durante otro minuto. Las minicolumnas se desecharon y el ADN, recogido en los tubos eppendorf, se conservó a 4°C.

El correcto desarrollo de la purificación de ADN se verificó con una nueva electroforesis en gel de agarosa al 1%, usando las mismas condiciones especificadas anteriormente. La masa de las bandas resultantes, obtenidas tras 40 minutos de electroforesis a 90 V, se estimó comparando la intensidad de las bandas con las del marcador Low DNA Mass® Ladder —Invitrogen— y utilizando la siguiente tabla aportada en el protocolo del marcador:

Tamaño del fragmento	Volumen del marcador Low DNA Mass Ladder		
	2 µL	4 µL	8 µL
2000 pb	100 ng	200 ng	400 ng
1000 pb	60 ng	120 ng	240 ng
800 pb	40 ng	80 ng	160 ng
400 pb	20 ng	40 ng	80 ng
200 pb	10 ng	20 ng	40 ng
100 pb	5 ng	10 ng	20 ng

Tabla 12: Cantidad de ADN presente en cada fragmento en función del volumen del marcador pipeteado.

Teniendo presente que en la electroforesis en gel de agarosa se añadieron 8 µL de cada muestra de ADN, y observando los datos de la tabla anterior, se estimaron las siguientes concentraciones para cada muestra:

Muestra (bacterias)	a	b	c	d	e	f	g	h
Peso (ng/ µl)	2.5	2.5	1.25	1.25	0.625	2.5	1.25	2.5
Muestra (levaduras)	i	j	k	l	m	n		
Peso (ng/ µl)	5	5	5	1.25	5	2.5		

Tabla 13: Estimación de la concentración de ADN en las muestras de bacterias y de levaduras.

Conocer el peso de las muestras es necesario para la etapa posterior de secuenciación, ya que se requiere un mínimo de 50 ng en 10 µL. Dada la baja concentración de ADN en las muestras, es necesaria una etapa de secado previa a la secuenciación para concentrar las muestras.

### Secuenciación

Una vez aisladas, reamplificadas y purificadas las bandas recortadas de los geles de DGGE, se sometieron a secuenciación para obtener la secuencia nucleotídica. La secuenciación se realizó utilizando un equipo ABI PRISM 3130xl —Applied Biosystems—, cuya química se basa en el marcaje del nuevo ADN sintetizado utilizando ddNTPs con fluorocromos y en la posterior separación del ADN marcado mediante electroforesis capilar, empleando los *primers* F357 y NL1 para muestras de bacterias y levaduras, respectivamente.

Las secuencias resultantes fueron editadas y comparadas con las depositadas en la base de datos GenBank —<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>— utilizando el programa BLAST. Siguiendo las recomendaciones de la literatura (Stackebrandt y Goebel, 1994), las secuencias con un porcentaje de homología igual o superior al 97% fueron consideradas como pertenecientes a la misma especie.

## ***4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN***

#### 4.1. Perfiles de DGGE

Dado que ésta es la primera aproximación a la microbiología de la manzana y existen muy pocos estudios sobre el tema en la literatura, pensamos que la técnica de la DGGE puede ser de gran utilidad, dado que de una forma rápida genera información sobre las poblaciones microbianas mayoritarias de un ecosistema. A tal fin, tras el aislamiento del ADN total de los microorganismos presentes en la piel de la manzana, se han utilizado de manera independiente parejas de cebadores universales para bacterias (357F y 518R) y para organismos eucariotas (NL1 y LS2).

Los amplicones obtenidos con los cebadores de bacterias y hongos descritos se separaron posteriormente mediante electroforesis en un gel de poliacridamida con un gradiente desnaturante de formamida y urea, según lo descrito en el apartado anterior. Los resultados que se obtengan pueden servir, por un lado, para analizar la composición y la diversidad microbiana en este nicho ecológico, y por otro, para tratar de vincular, en la medida posible, la microbiota que se detecte con los procesos de fermentación espontánea presentes en la elaboración tradicional de sidra y con la seguridad y calidad del producto fermentado.

Las figuras 10 y 11 muestran los perfiles DGGE de los amplicones pertenecientes, respectivamente, a la región V3 del gen codificante del ARNr 16S en bacterias y a la región D1 del gen codificante del ARNr 26S en levaduras. En el perfil bacteriano (Figura 10) se puede observar una mayor diversidad en comparación con el perfil de los amplicones de mohos y levaduras, dada la presencia de más de una decena de bandas por calle frente a las siete visibles en el perfil eucariota. A pesar de la mayor importancia tecnológica de las levaduras en la elaboración de sidra tradicional, la elevada diversidad bacteriana observada en las variedades de manzana estudiadas está en sintonía con lo que ocurre en la mayoría de los ambientes naturales. Al respecto, también hay que tener presente que las bacterias asociadas a la piel de la manzana pueden tener un origen diverso: aire, agua, suelo, animales, ser humano... y que su presencia no tiene por qué estar directamente relacionada con la elaboración de sidra; es decir, no todos los tipos presentes van a poder desarrollarse *a posteriori* en el mosto debido a sus características.

En el perfil de DGGE de las muestras se pueden identificar entre 15 y 20 bandas distintas, muchas de las cuales están presentes en todas las muestras, lo que es indicativo de una gran diversidad bacteriana también descrita en muchos ecosistemas de alimentos no procesados. De todas las bandas, la más intensa —banda f— está presente en casi todas las variedades de manzana, al igual que una de las bandas subdominantes —banda c—. Además, dentro del perfil de bacterias, también se puede observar cierta heterogeneidad entre las distintas calles: algunas bandas están presentes en las cinco variedades de manzana —bandas c, d, e, f y g—; sin embargo, también se observan bandas que no se localizan en todas las muestras, como las bandas a, b y h, además de otras que no se identificaron en este trabajo, dada la limitación temporal que hemos tenido. En tres de las cinco calles —correspondientes a las variedades Carrió, Solanina

y Limón Montés—, la banda más intensa presenta una migración electroforética similar a la banda patrón de *Escherichia coli*. Sin embargo, para una correcta identificación definitiva se requiere someter a la banda a una etapa posterior de secuenciación, puesto que existe la posibilidad de que una banda de ADN de otra especie presente una migración muy parecida y/o idéntica a la de esta especie, tal y como se reconoce en la literatura (von Vincengerode y col., 1997; Becker y col., 2000).

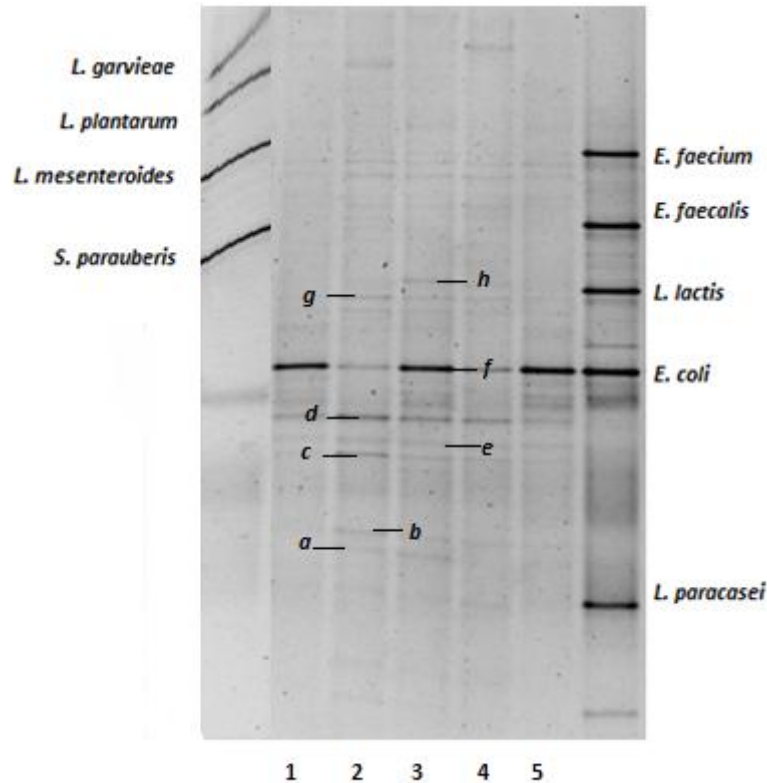


Figura 10: Perfil DGGE de amplicones de la región V3 del gen ARNr 16S en bacterias. De izquierda a derecha: Carrió (1), Xuanina (2), Solanina (3), Raxao (4) y Limón Montés (5). Las bandas asociadas a letras (a-h) fueron recortadas, aisladas y sometidas a secuenciación.

No obstante, estos resultados preliminares no pueden descartar tampoco posibles contaminaciones de las muestras con bacterias y/o con ADN exógeno durante el proceso de aislamiento de los microorganismos o en el aislamiento y purificación posterior del ADN total de éstos, dada la presencia de bandas con idéntica migración en algunas reacciones de control. Las contaminaciones podrían proceder del agua de lavado, de los reactivos de amplificación —polimerasas, cebadores y *buffers*— o de otras fuentes no identificadas.

Por otra parte, en el perfil de levaduras (Figura 11) se puede observar también una cierta homogeneidad entre las bandas presentes en las distintas muestras, con la presencia de siete bandas de intensidades más o menos idénticas en cuatro de las cinco variedades estudiadas: Carrió, Xuanina, Solanina y Raxao. Dos de éstas —bandas i y j— aparecen como dominantes en todas ellas. La quinta variedad, correspondiente a Limón Montés, mostró sin embargo un perfil distinto caracterizado por la ausencia de las bandas



citadas, con una mayor intensidad de las bandas m y n. A diferencia de lo observado en el perfil electroforético de las bacterias, la ausencia de cepas patrón impide la identificación, aunque tan solo sea tentativa, de las bandas resultantes por simple comparación visual.

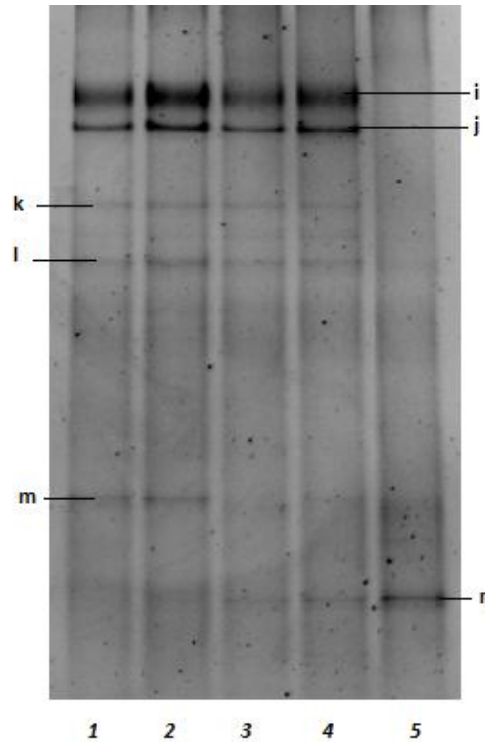


Figura 11: DGGE de amplicones de la región D1 del gen ARNr 26S en levaduras. De izquierda a derecha: Carrió (1), Xuanina (2), Solanina (3), Raxao (4) y Limón Montés (5). Las bandas asociadas a letras (i-n) fueron recortadas, aisladas y sometidas a secuenciación posterior.

#### 4.2. Resultados de la secuenciación

Tras observar el resultado de ambas electroforesis, las bandas identificadas con letras — ocho correspondientes al perfil de bacterias y seis al perfil de levaduras— se recortaron, reamplificaron y se identificaron mediante secuenciación y comparación de secuencias. En el caso de los procariotas, se pudieron identificar las bandas e, f, g y h, que corresponden a representantes de la familia *Enterobacteriaceae*. En los cuatro casos, la comparación de las secuencias con las depositadas en las bases de datos reveló una homología superior a 97% con especies de los géneros *Shigella* y *Escherichia*. Esta homología con especies de ambos géneros no es del todo extraña si se tiene presente que diversos autores proponen una taxonomía distinta, con la introducción de las cuatro especies de *Shigella* en el género *Escherichia* dada su proximidad filogenética y una dotación genética prácticamente indistinguible (Lan y Reeves, 2002).

Además, la dificultad para identificar unidades taxonómicas próximas es también una limitación de la técnica estudiada, puesto que se examina un fragmento pequeño del ADN que codifica el ARNr 16S, altamente conservado desde el punto de vista evolutivo (von Vincengerode y col., 1997; Becker y col., 2000). Para el análisis por DGGE de

poblaciones bacterianas emparentadas se puede utilizar la amplificación y separación de otros genes universales con mayor variabilidad interespecífica, como los que codifican subunidades de la ADN polimerasa, factores de elongación y topoisomerasas, entre otros (Kisand y Wikner, 2003).

Por su parte, la presencia de enterobacterias —o directamente coliformes— en frutas y hortalizas es común, dada su ubicuidad en la naturaleza, no solamente en el intestino de animales homeotermos, sino también de forma natural en aguas, suelos y vegetales. A pesar de la existencia de coliformes de vida libre, no vinculados a un hábitat gastrointestinal, su presencia en vegetales suele asociarse al uso de aguas de riego con contaminación fecal. Estos coliformes fecales son uno de los grupos más estudiados en el ámbito de la Salud Pública, dada su posible patogenicidad en humanos, y suelen usarse como indicadores de contaminación de aguas y alimentos a nivel industrial para evitar riesgos sanitarios. A modo de detalle, se han descrito varios brotes epidémicos causados por la cepa enterohemorrágica O157:H7 de *E. coli* en Estados Unidos y Canadá por el consumo de lo que en Norteamérica denominan *cider*; sin embargo, este término, tal y como se comentó en el apartado de consideraciones teóricas, se reserva en estos países para el zumo de manzana. En nuestro conocimiento, no hay descritos brotes epidémicos asociados al consumo de sidra fermentada natural.

A pesar de la presencia de los coliformes en la piel de las manzanas, no son microorganismos que participan en los procesos fermentativos de la sidra, de lo que se deduce que o bien son eliminados mediante la utilización de buenas prácticas de manipulación o durante la etapa de lavado anterior al triturado; o bien, en caso de persistir en el mosto de manzana, son desplazados por las levaduras y las bacterias lácticas responsables de la doble fermentación debido a las especiales características físico-químicas del zumo.

La identificación de las cuatro bandas restantes en el perfil de procariotas —bandas a, b, c y d— no fue posible, debido a que las secuencias obtenidas fueron de poca calidad y no pudieron utilizarse para la búsqueda en las bases de datos. Esta situación puede deberse a la comigración en las bandas aisladas de ADN de más de un tipo microbiano que, inevitablemente, se amplificaría en los pasos subsiguientes. Sin embargo, aunque esta comigración es posible y está descrita en la literatura, no suele ser tan frecuente, por lo que también se puede atribuir la falta de identificación a un procesado deficiente de las bandas: presencia de los cebadores utilizados en la primera amplificación, contaminación del ADN tras la electroforesis con sustancias de la agarosa que actúan como inhibidores de la amplificación de la secuenciación... Estas circunstancias se pueden subsanar también mediante estrategias más laboriosas como la clonación directa del ADN de las bandas en un vector y la purificación y secuenciación posterior del ADN de los clones.

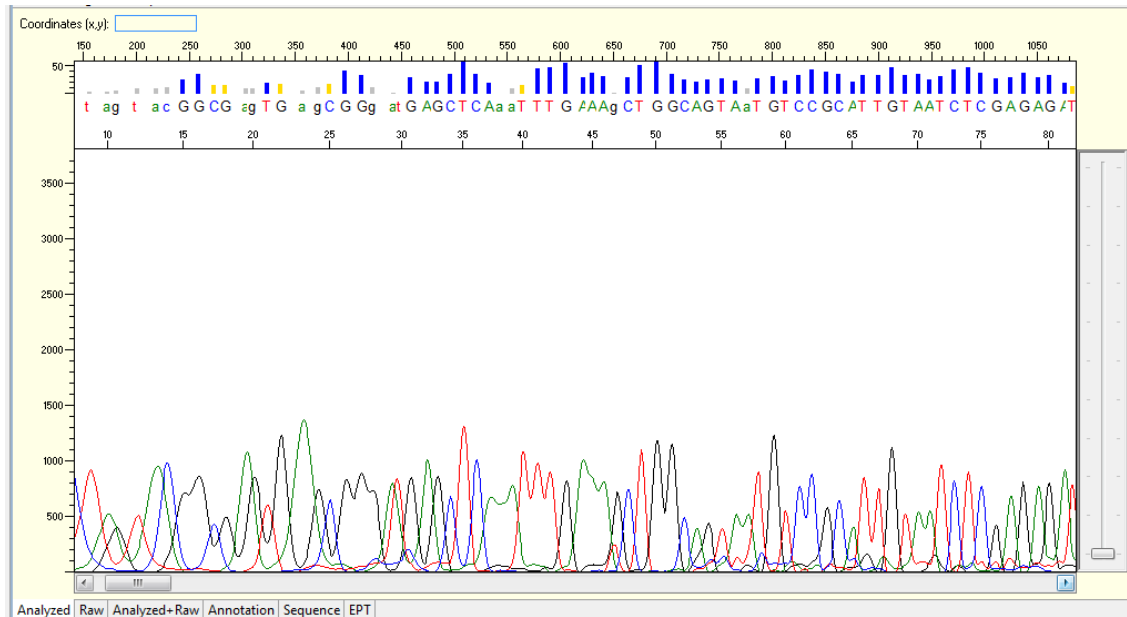


Figura 11: Porción de la secuencia nucleotídica correspondiente a la banda i de levaduras.

En el caso de levaduras, la secuenciación de las bandas i y j reveló una homología superior al 97% con *Exobasidium* sp. Aunque no se ha descrito ningún vínculo entre especies de *Exobasidium* y los procesos tecnológicos de elaboración de sidra natural, sí existen referencias sobre la patogenicidad de especies de *Exobasidium* en miembros de la familia de las Ericáceas, así como en plantas hortícolas y silvestres, dentro del territorio español, según el Ministerio de Medio Ambiente. Al respecto, *Exobasidium japonicum* es responsable de la formación de agallas en flores y hojas, mientras que *Exobasidium rhododendri* puede producir malformaciones en el tejido foliar. Es decir, son mohos frecuentes en plantas y frutos.

Además, la distinta migración de bandas correspondientes a una misma especie, tal y como ocurre con las bandas i y j de levaduras, puede explicarse por la presencia de heterogeneidad en los operones ribosómicos, mucho más frecuente y posible en las levaduras que en las bacterias: mientras las bacterias tienen entre una y quince copias de los operones ribosomales, las levaduras y los hongos pueden presentar más de 200, siendo más factible la presencia de genes con distinta secuencia (Klappenbach, Dunbar y Smichdt, 2000). La distinta migración electroforética en el gel se puede atribuir a que estas copias no son idénticas y presentan una secuencia nucleotídica ligeramente variable, de modo que la desnaturalización en el gel de ambas copias es diferente y frenan su movimiento en distinta posición.

Por otra parte, la secuenciación de la última banda —banda n— reveló una homología superior al 97% con varios representantes de ascomicetos del orden Capnodiales, incluyendo especies de la familia *Mycosphaerellaceae* —*Mycosphaerella communis* y *Mycosphaerella lateralis*— y especies de géneros adscritos a la familia *Dissoconiaceae* —*Dissoconium dekkeri*, *Dissoconium commune*, *Uwebraunia musae*, *Uwebraunia dekkeri* y *Uwebraunia commune*—. Diversos autores han descrito los representantes mencionados de ambas familias como hongos epicuticulares que causan las llamadas

«manchas de hollín» —*sooty blotch* en inglés— y las «cagadas de mosca» —del inglés *flyspeck*— en manzanas y peras durante los meses de verano (Zhang y col., 2007; Crous y col., 2008; Li y col., 2010), de manera que su presencia en nuestras muestras parece ciertamente posible y normal. Aunque se hayan definido como patógenos, estos hongos epífitos pueden causar daño únicamente cuando se les proporciona una vía de entrada al interior de la pulpa tras procesos de rotura mecánica o el ataque de insectos.

Al igual que ocurrió en la secuenciación de bacterias, la contrastación de las secuencias obtenidas con las bandas k, l y m en las bases de datos no dio ningún resultado. Esto se puede atribuir nuevamente a la comigración de bandas de distintas especies a la misma posición del gel, o a un procesado deficiente que se tratará de corregir en el futuro.

## ***5. CONCLUSIONES***

A la vista de los resultados experimentales obtenidos y de la consiguiente discusión realizada en el apartado anterior, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- La DGGE es una técnica analítica molecular independiente de cultivo con gran aplicación en la Microbiología de los Alimentos para conocer de una forma rápida las poblaciones microbianas mayoritarias de un ecosistema alimentario. Mediante esta técnica, hemos llevado a cabo una primera aproximación a la microbiología de la piel de la manzana.
- Atendiendo al número de bandas de los perfiles de DGGE, la microbiota de las manzanas analizadas parece ser muy parecida en las distintas variedades. Una única especie de enterobacteria parece ser dominante entre los procariotas, seguida de varias especies subdominantes. Los eucariotas mayoritarios están representados por hongos del género *Exobasidium*.
- Los microorganismos detectados en la superficie de la manzana no se corresponden con las levaduras y las bacterias dominantes en los procesos fermentativos de la sidra, de lo que se puede inferir su desplazamiento por los microorganismos fermentadores durante el procesado. Estos microorganismos podrían estar en bajos niveles en la piel de las manzanas o acceder al mosto como contaminantes procedentes de los utensilios, las cubas de fermentación u otros elementos de los *llagares*.
- A pesar de estas ventajas, y al igual que cualquier técnica analítica, la DGGE puede presentar inconvenientes como la posible co-migración de bandas de distintas especies a la misma posición del gel. Esto, asociado a problemas metodológicos en el ulterior procesado, impidió identificar varias de las bandas aisladas en el gel.

## ***6. REFERENCIAS***

Alegría, A., Álvarez-Martín, P., Sacristán, N., Fernández, E., Delgado, S., y Mayo, B. (2009). Diversity and evolution of majority microbial populations during manufacturing and ripening of Casín, a Spanish traditional, starter-free cheese made of raw cow's milk. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 44-51.

Batzer, J.C., Mercedes Díaz, M., Harrington, T.C., Gleason, M.L., Groenewald, J.Z. y Crous, P.W. (2008). Four species of *Zygophiala* (*Schizothyriaceae*, *Capnoidiales*) are associated with the sooty blotch and flyspeck complex on apple. *Mycologia*, 100, 232-244.

Becker, S., Böger, P., Oehlmann, R. y Ernst, A. (2000). PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative Taq nuclease assays in analysis of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4945-4953.

Beech, F.W. y Davenport, R.R. (1970). The role of yeasts in cidermaking. En *The Yeasts*, Rose, A.H. y Harrison, J.S. (eds.) pp. 73-146. Academic Press, Londres.

Beech, F.W. (1972). Cider making and cider research: A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 78, 477-491.

Beech, F.W. y Carr, J.G. (1977). Cider and Perry. En *The Yeasts*, Rose, A.H. y Harrison, J.S. (eds.) pp. 139-313. Academic Press, Londres.

Beech, F.W. (1993). Yeasts in cider-making. En *The Yeasts*, Rose, A.H. y Harrison, J.S. (eds.), pp. 169-213. Academic Press, Londres.

Beelman, R.B., Keen, R.M., Banner, M.J. y King, S.W. (1982). Interactions between wine yeast and malolactic bacteria under wine conditions. *Developments in Industrial Microbiology*, 23, 107-121.

Bizeau, C., Moreau, C., Michel, P. y Ponchjat, P. (1990). Microflore fongique de la carposphère de pommes a cidre. *Cryptogamie Mycologie*, 11(1), 1-2.

Blake, D. y Boyle, S. (1992). The demand for cider in the United Kingdom. *Oxford Bulletin of Economics and Statistics*. 54, 73-86.

Blanco, D. y Mangas, J.J. (2010). La manzana y la sidra: bioprocesos, tecnologías de elaboración y control. Villaviciosa: SERIDA.

Cabranes, C., Moreno, J. y Mangas, J.J. (1990). Dynamics of yeast population during cider fermentation in the Asturian region of Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 381-384.

Cabranes, C., Moreno, J., Mangas, J.J. (1991). Aspectos microbiológicos y bioquímicos de la elaboración de sidra natural en lagares asturianos. *Alimentaria*, 4, 63-69.

Cabranes, C. (1994). Fermentaciones espontáneas e inducidas en sidra natural asturiana. Tesis doctoral, Universidad de Oviedo.



Cabranes, C., Mangas, J.J. y Blanco, D. (1997). Selection, biochemical, characterization of *Saccharomyces* and *Kloeckera apiculata* strains isolated from Spanish cider. *Journal of the Institute of Brewing*, 103, 165-169.

Chang, H.W., Kim, K.H., Nam, Y.D., Roh, S.W., Kim, M.S., Jeon, C.O. y col. (2008). Analysis of yeast and archaeal population dynamics in kimchi using denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 159,166.

Claisse, O. y Lonvaud-Funel, A. (2001). Primers and a specific DNA probe for detecting lactic acid bacteria producing 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol in spoiled ciders. *Food Protection*, 64, 833-837.

Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantoni, C. y Comi, G. (2002). An application off PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *International Dairy Journal*, 12, 407-411.

Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casagerola, S. y Sohier, D. (2006). Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 130-135.

Crous, P.W., Summerell, B.A., Mostert, L. y Groenewald, J.Z. (2008). Host specificity and speciation of *Mycosphaerella* and *Teratosphaeria* species associated with leaf spots of *Proteaceae*. *Persoonia*, 20, 59-86.

Davis, C.R., Wibowo, D., Eschenbruch, R., Lee, T.H. y Fleet, G.H. (1985). Practical implications of maloláctica fermentation: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 290-301.

Doores, S. (1983). The microbiology of apples and apples products. *CRC Critical Reviews Food Science Nutrition*, 19, 133-149.

Dueñas, M.T., Irastorza, A., Fernández, c., Bilbao, A., Huerta, A. (1994). Microbial populations and malolactic fermentation of apple cider using traditional and modified methods. *Journal of Food Science*, 59, 1060-1064.

Ercolini, D., Hill, P.J. y Dood, C.E.R. (2003). Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3540-3548.

Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 297-314.

Fernández, K., Irastorza, A., Dueñas, M. y Bilbao, A. (1994). Evolution of acetic acid bacteria during cider making in the Basque country (Spain). *Sciences des Aliments*, 14, 235-241.

Fischer, S.G., y Lerman, L.S. (1979). Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell*, 16, 191-200.

Fischer, S.G. y Lerman, L.S. (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: Correspondence with melting theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 80, 1579-1583.

Flórez, A. B., y Mayo, B. (2006). Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *International Journal of Food Microbiology*, 110, 165-171.

González Torre, B., González, P. y Díaz, B.A. (2002). Análisis del sector de la sidra: retos actuales y perspectivas de futuro. *Revista Española de Estudios Agrosociales y Pesqueros*, 194, 169-188.

Herrero, M., Quirós, C., García, L.A., Díaz, M. (2006). Use of flow cytometry to follow the physiological status of microorganisms in cider fermentation processes. *Applied Environmental Microbiology*, 72, 6725-6733.

Kisand, V. y Wikner, J. (2003). Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences. *Journal of Microbiology Methods*, 54, 1183-1191.

King, S.W. y Beelman, R.B. (1986). Metabolic interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Leuconostoc oenos* in a model grape juice/wine system. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 23-25.

Kitsock, G. (1998). Cider: The next revolution? *The New Brewer*, 15, 68-73.

Klappenbach, J.A., Dunbar, J.M. y Schmidt, T.M. (2000). rRNA operon copy number reflects ecological strategies of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1328-1333.

Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I. y Khorana, H.G. (1971). Studies on polynucleotides. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology*, 56, 341-361.

Kuensch, V.A., Tempereli, A. y Meyer, K. (1974). Conversion of arginine to ornithine during malolactic fermentation in red Swiss wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 25, 191-193.

Lan, R. y Reeves, P.R. (2002). *Escherichia coli* in disguise: molecular origins of Shigella. *Microbes and Infection*, 4, 1125-1132.

Laplace, J-M., Apery, S., Frere, F. y Auffray, Y. (1998). Incidence of indigenous microbial flora from utensils and surrounding air in traditional French cider making. *Journal of Institute of Brewing*, 104, 71-74.

Li, H.Y., Sun, G.Y., Zhai, X.R., Batzer, J.C., Mayfield, .A., Crous, P.W. y Gleason, M.L. (2012). *Dissoconiaceae* associated with sooty blotch and flyspeck on fruits in China and the United States. *Persoonia*, 28, 113-125.

Lyautey, E., Lacoste, B., Ten-Hage, L., Rols, J.L. y Garabetian, F. (2004). Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16s rDNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprints interpretation. *Water-Research*, 39, 380-388.

Mangas Alonso, J.J. (1992). Maduración de la manzana y tecnología de elaboración de zumos y sidras. Tesis doctoral, Universidad de Oviedo.

Mangas Alonso, J.J., Fernández, N., Rodríguez, R., Moreno, J. y Cabranes, C. (1996). Influencia de la clarificación prefermentativa en la fermentación del mosto de manzana extraído en prensa continua de bandas. *Revista de tecnología e higiene de los alimentos*, 277, 77-82.

Melgarejo, P., García-Jiménez, J., Jordá, M.C., López, M.M., Andrés, M.F. y Durán-Vila, N. (2010). Patógenos de plantas descritos en España (2ª ed.) *Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente*, pp. 448-449.

Michel, A., Bizeau, C., Drilleau, J.F. (1988). Flore levurienne presente dans les cidreries de l'ouest de la France. *Sciences des Aliments*, 8, 359-368.

Morrissey, W.F., Davenport, B., Querol, A., y Dobson, A.D.W. (2004). The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 647-655.

Muyzer, G., De Wall, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993). Prolifing of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 695-700.

Pando, R.M., Querol, A. y Suárez, B. (2010). Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. *Food Microbiology*, 27, 503-508.

Pando, R.M. (2010). Selección y caracterización de levaduras autóctonas de sidra. Tesis doctoral, Universidad de Oviedo.

Rosini, G., Federici, F. y Martini, A. (1982). Yeast flora of grape berries during ripening. *Microbial Ecology*, 8, 83-89.

Salih, A.G., Drilleau, J.F., Cavin, F.F., Divies, C. y Bourgeois, C.M. (1988). A survey of microbiological aspects of cider making. *Journal of the Institute of Brewing*, 94, 5-8.

Salih, A.G., Le Quéré, J.M., Drilleau, J.F., Moreno Fernández, J. (1990). Lactic acid bacteria and malolactic fermentation in the manufacture of Spanish cider. *Journal of the Institute of Brewing*, 96(6), 369-372.

Sánchez, A., Rodríguez, R., Monika C., Coton, E., Herrero, M., García, L.A. y Díaz, M. (2010). Population dynamics of lactic acid bacteria during spontaneous malolactic fermentation in industrial cider. *Food Research International*, 43, 2101-2107.

Schreir, P., Drawert, F., Steiger, G. y Mick, W. (1978). Effect of enzyme treatment of apple pulp with a commercial pectinase and cellulose on the volatiles of juice. *Journal of Food Science*, 43, 1797-1800.

Stackenbrandt, E. y Boebel, B.M. (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44, 846-849.

Stackenbrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A., Kampfer, P., Maiden, M.C. y col. (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1043-1047.

Suárez, B., Pando, R., Fernández, N., Querol, A. y Rodríguez, R. (2007a). Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiology*, 24, 25-31.

Suárez, B., Pando, R., González, A., Querol, A. (2007b). A molecular genetic study of natural strains of *Saccharomyces* isolated from Asturian cider fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 778-786.

Torres-Machorro, A.L., Hernández, R., Cevallos, A.M. y López-Villaseñor, I. (2009). Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms: witnesses of phylogeny? *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 59-86.

Von Wintzingerode, F., Göbel, U.B. y Stackebrandt, E. (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, 21, 213-229.

Werning, M.L., Ibarburu, I., Dueñas, M.T., Irastorza, A., Navas, J. y López, P. (2006). *Pediococcus parvulus* gtf gene encoding the Gtf glucosyltransferase and its application for specific PCR detection of  $\beta$ -D-glucan producing bacteria in food and beverages. *Journal of Food Protection*, 69, 161-169.

Whiting, G.C. (1973). Acetification in ciders and perries. *Journal of Institute of Brewing*, 79, 218-226.

Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, C.R., Fleet, G.H. y Lee, T.H. (1985). Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36(4), 302-313.

Young, G.A., Krasner, R.I., Yudkkofsky, P.L. (1958). Interactions of strains of *Candida albicans* and lactobacilli. *Journal of Bacteriology*, 75, 525-529.

Zhang, R., Zhang, Z., Zhang, M., Sun, G.C. y Gleason, M.L. (2007). A new species of *Dissoconium* from China colonizing apples. *Mycotaxon*, 101, 165-172.