

## ARTÍCULO

### CULTIVOS MIXTOS DE CEPAS AUTÓCTONAS DE *Pichia kudriavzevii* y *Saccharomyces cerevisiae* CON POTENCIAL PARA PRODUCIR SIDRAS A PARTIR DE MANZANAS ÁCIDAS

María Belén Mazzucco<sup>1,2,3\*</sup>; Milena Jovanovich<sup>2</sup>, María Eugenia Rodríguez<sup>1,3</sup>; Juan Martín Oteiza<sup>5</sup>, Christian Ariel Lopes<sup>1,4</sup>.

1- Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas (PROBIEN, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina—Universidad Nacional del Comahue). Neuquén, Argentina.

2- Facultad de Ciencias y Tecnología de los Alimentos, Universidad Nacional del Comahue. Río Negro, Argentina.

3- Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Comahue. Río Negro, Argentina.

4- Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Comahue. Río Negro, Argentina.

5- Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria (CIATI)—CONICET, Argentina.

\*E-mail: [mariabelenmazzucco@gmail.com](mailto:mariabelenmazzucco@gmail.com)

## RESUMEN

El crecimiento de la industria sidrera en los últimos años ha impulsado el estudio de estrategias alternativas de producción para mejorar su complejidad aromática. Una de las aproximaciones más prometedoras es el uso de cultivos mixtos de levaduras. Este trabajo evaluó las cepas patagónicas *Pichia kudriavzevii* NPCC1651 (aislada de sidra natural) y *Saccharomyces cerevisiae* ÑIF8 (aislada de vino natural) en fermentaciones puras y mixtas de mosto de manzana ácida. La fermentación simultánea con iguales inóculos de ambas levaduras (proporción 1:1) fue seleccionada en función de su eficiencia fermentativa, consumo de ácido málico y capacidad para producir sidras con los mayores niveles de alcoholes superiores (como el 2-fenil etanol y el alcohol isoamílico) y ésteres totales (como el acetato de isoamilo y el hexanoato de etilo). Cuando esta estrategia de fermentación se implementó en mosto natural (no estéril) produjo sidras que fueron preferidas frente a aquellas obtenidas mediante la inoculación exclusiva de *S. cerevisiae*. Estos resultados demuestran que el metabolismo de *P. kudriavzevii* contribuye de forma positiva al perfil sensorial de la sidra y contribuyen al desarrollo de sidras con territorialidad y calidad distintiva y controlada.

**Palabras clave:** levadura, sidra, ácido málico, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii*

## 1. INTRODUCCIÓN

La sidra, bebida alcohólica obtenida mediante la fermentación del jugo de manzana, ha experimentado un notable aumento de popularidad en el mercado de bebidas alcohólicas (AICV Cider Trends 2022). En Argentina, su producción se concentra en la región Norpatagónica (provincias de Río Negro y Neuquén). Esta industria se ha convertido en un segmento relevante del sector frutícola, impulsada en parte por la disminución de las exportaciones de manzanas frescas y la consecuente caída en los precios del fruto (MAGyP, 2022). La creciente demanda del mercado por cultivos iniciadores (*starters*) capaces de producir sidras con propiedades

novedosas alcanza a los productores argentinos, quienes utilizan levaduras vínicas importadas debido a la falta de disponibilidad de cultivos específicos para sidra. Una estrategia cada vez más utilizada para aumentar la complejidad aromática de la sidra es el uso de cultivos mixtos, que combinan cepas de la especie altamente fermentativa *Saccharomyces cerevisiae* con levaduras no-Saccharomicéticas (Hu *et. al.*, 2023; Li *et. al.*, 2021).

Entre las especies no-Saccharomicéticas, *Pichia kudriavzevii* ha despertado interés por su capacidad para degradar ácidos orgánicos, liberar hidrolasas y compuestos aromáticos (Chu *et. al.*, 2023). De hecho, cepas de esta especie han demostrado mejorar los perfiles aromáticos de vinos y contribuir con la producción de sidras de

alta calidad en fermentaciones mixtas (Li *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2023).

El ácido L(-)málico es el principal ácido presente en las manzanas. En nuestra región, el cultivar Granny Smith, ampliamente cultivada, presentan un alto contenido de este ácido, influenciado por el clima frío característico de la zona. Las altas concentraciones de ácido málico se asocian con un sabor "fuerte" y una condición microbiológica "inestable" (Blanco Gomis y Mangas Alonso, 2010). Una estrategia para disminuir los niveles de este ácido es la fermentación maloláctica llevada a cabo por la inoculación de bacterias lácticas en la etapa posterior a la fermentación alcohólica. Aunque esta práctica es común en enología, está menos explorada en la industria sidrera. Además, algunos estudios reportan que este proceso es difícil de controlar y puede comprometer la calidad del producto final (Fu *et al.*, 2022). En este contexto, la capacidad de cepas de la especie *P. kudriavzevii* para degradar ácido málico (del Monaco *et al.*, 2013; Vicente *et al.*, 2022) la convierte en una especie prometedora para la producción de sidras a partir de mostos ácidos. En un estudio previo, Mazzucco *et al.* (2024) caracterizaron las cepas *P. kudriavzevii* NPCC1651 y *S. cerevisiae* ÑIF8, aisladas de sidras y vinos naturales de la Patagonia respectivamente, por su capacidad de consumir ácido málico y su destacado consumo de fructosa (azúcar mayoritario de la manzana). En este estudio se llevaron a cabo fermentaciones puras y mixtas utilizando estas dos cepas con el objetivo de determinar la estrategia óptima para producir sidras con baja acidez y perfiles fisicoquímicos y aromáticos diferenciados, atributos clave en la selección de cultivos iniciadores para sidras elaboradas con manzanas ácidas.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Estrategias de fermentación

Se realizaron seis estrategias de fermentación (Tabla 1) utilizando las cepas de levaduras *Pichia kudriavzevii* NPCC1651 (perteneciente a la colección *North Patagonian Culture Collections*) aislada de sidra natural (Gonzalez Flores *et al.*, 2019) y la cepa *Saccharomyces cerevisiae* ÑIF8 aislada de vino natural (del Mónaco *et al.*, 2013). Las estrategias de fermentación fueron: (1) inoculación sólo con la cepa *P. kudriavzevii* NPCC1651 (P); (2) inoculación sólo con la cepa *S. cerevisiae* ÑIF8 (S); (3) inoculación simultánea (Sim) con *S. cerevisiae* ÑIF8 y *P. kudriavzevii* NPCC1651 en una proporción 1:1 (Sim 1:1); (4) inoculación simultánea (Sim) con *S. cerevisiae* ÑIF8 y *P. kudriavzevii* NPCC1651 en una proporción 1:10 (Sim 1:10); (5) inoculación secuencial (Sec) con *S. cerevisiae* ÑIF8 48 horas después de la inoculación con *P. kudriavzevii* NPCC1651 en una proporción de 1:1 (Sec P-S); e (6) inoculación secuencial (Sec) con *P. kudriavzevii* NPCC1651 48 horas después de la inoculación con *S. cerevisiae* ÑIF8 en una proporción de 1:1 (Sec S-P). Las fermentaciones se llevaron a cabo a 20°C en 450 mL de mosto estéril de manzanas Granny Smith cosechadas en 2023 de huertos ubicados en la provincia de Río Negro (12.6 °Brix, 47.0 g/L de glucosa, 92.7 g/L de fructosa, 25 g/L de sacarosa, 9.9 g/L de sorbitol, 7.67 g/L de ácido málico, pH 3.21).

### 2.2. Cinética de la fermentación

#### 2.2.1. Consumo de azúcares reductores totales por medición de °Brix

La evolución de las fermentaciones se siguió midiendo los °Brix con un refractómetro hasta alcanzar valores constantes y luego mediante el método DNS hasta el final de la fermentación (menos de 2 g/L de azúcares reductores totales). Los parámetros cinéticos se calcularon individualmente para cada fermentación. Se probaron dos modelos: i. Función de decaimiento

**Tabla 1.** Estrategias de inoculación en mosto de manzana cv. Granny Smith estéril.

Código	Estrategia de inoculación	Inóculo (cel/mL)	
		<i>S. cerevisiae</i> ÑIF8	<i>P. kudriavzevii</i> NPCC1651
1	P	-	2x10 <sup>6</sup>
2	S	2x10 <sup>6</sup>	-
3	Sim 1:1	1x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>6</sup>
4	Sim 1:10	1x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>7</sup>
5	Sec P-S	1x10 <sup>6</sup> (48 h)	1x10 <sup>6</sup>
6	Sec S-P	1x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>6</sup> (48 h)

exponencial (Arroyo-López *et al.* 2008):  $Y=D+S*e^{-K*t}$ , donde Y es el valor final de °Brix, t es el tiempo (h), D es un valor específico cuando  $t \rightarrow \infty$ , S es el valor estimado de cambio y K es la constante cinética ( $h^{-1}$ ); ii. Función de Gompertz de decaimiento sigmoideo (Lambert y Pearson, 2000):  $Y=A+C*e^{-e^{-(K*(t-M))}}$ , donde Y es el °Brix aún presente en el mosto, t es el tiempo (h), A es la asíntota inferior cuando t tiende a infinito ( $t \rightarrow \infty$ ), K es la constante cinética ( $h^{-1}$ ), C es la distancia entre la asíntota superior e inferior, y M es el tiempo cuando se obtiene el punto de inflexión (50% de la variación total de °Brix). Se probaron ambas ecuaciones mediante el software Statistica y se eligió la función con el  $r^2$  más alto.

### 2.2.2. Consumo de glucosa y fructosa

La concentración de glucosa y fructosa remanente se midió individualmente para cada fermentación en distintos tiempos utilizando un kit comercial. Los datos se ajustaron a los modelos de Gompertz mencionados y se calculó el parámetro cinético k (velocidad de consumo de glucosa o fructosa) como se describió en la sección anterior para los °Brix.

### 2.3. Recuento de células viables

Los recuentos de células viables de *S. cerevisiae* y *P. kudriavzevii* se determinaron en función de las diferencias morfológicas de sus colonias en placas de agar nutritivo WL. Las muestras de sidra, previamente diluidas, se sembraron sobre las placas WL y se incubaron a 25 °C durante 2 días. Esto permitió la formación de colonias de levadura, que se utilizaron para realizar el recuento de las unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL).

### 2.4. Caracterización fisicoquímica y aromática de las sidras

Las muestras fueron analizadas mediante cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) para determinar las concentraciones de etanol, glicerol, glucosa, fructosa, sorbitol y ácidos orgánicos (cítrico, málico, acético, láctico y succínico), además de metanol. Por su parte, el análisis de alcoholes superiores, ésteres, acetaldehído y terpenos se llevó a cabo mediante cromatografía de gases.

### 2.5. Sidras elaboradas en mosto natural

Las estrategias de fermentación S y Sim 1:1 se implementaron en 10 L de mosto natural (no estéril) de manzana Granny Smith proporcionado por la empresa Pura Frutta. Las sidras obtenidas fueron acondicionadas mediante la adición de 20 g/L de sacarosa y sometidas a un análisis de preferencia realizado con 120 personas de un público no entrenado. La significancia estadística se evaluó utilizando la escala de Roessler *et al.*, (1948).

### 2.6. Análisis estadístico

Los valores obtenidos de compuestos químicos y parámetros cinéticos se promediaron y compararon utilizando ANOVA de una vía ( $p < 0.05$ ) seguido de test de Tukey. El ajuste de los valores de °Brix y de la concentración de glucosa y fructosa para obtener los parámetros cinéticos se realizó mediante el software Statistica 7.0.

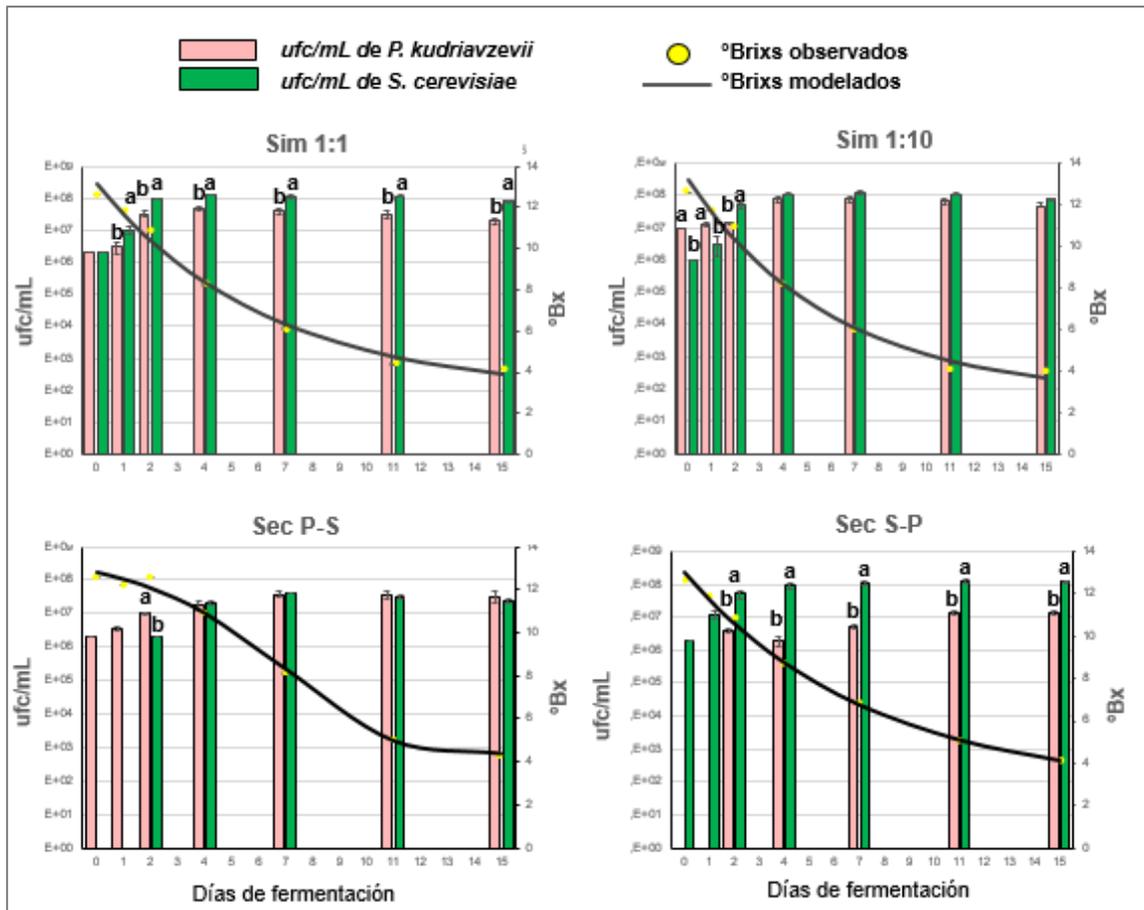
## 3. RESULTADOS

### 3.1. Fermentaciones

#### 3.1.1. Cinética de la fermentación y consumo de glucosa y fructosa

La progresión de las fermentaciones se monitoreó a través de la disminución de los °Brix (Figura 1) y del consumo de glucosa y fructosa (Figura 2). Estos datos se modelaron utilizando las ecuaciones de Gompertz de decaimiento exponencial y sigmoideo, a partir de las cuales se obtuvieron los parámetros cinéticos k, correspondiente a la velocidad de fermentación (en ° Brix) y de consumo de glucosa o fructosa para cada fermentación (Tabla 2).

Los resultados indican que las fermentaciones conducidas por el cultivo puro P y por la inoculación secuencial Sec P-S se ajustaron al modelo de decaimiento sigmoideo, tanto en la disminución de °Brix como de la concentración de glucosa. Entre estas, la estrategia P presentó la menor velocidad de fermentación. Por otro lado, las fermentaciones restantes se ajustaron al modelo de decaimiento exponencial. En cuanto al consumo de fructosa, todas las estrategias de



Letras distintas indican diferencias significativas de ufc/mL ( $p > 0.05$ ) entre especies en un día determinado. **Referencias:** P: *P. kudriavzevii* NPCC1651; S: *S. cerevisiae* ÑIF8; **Sim 1:1:** Simultaneous fermentation by S:P ratio 1:1; **Sim 1:10:** Simultaneous fermentation by S:P ratio 1:10; **Sec P-S:** Sequential fermentation by *S. cerevisiae* ÑIF8 48 h after *P. kudriavzevii* NPCC1651; **Sec S-P:** Sequential fermentation by *P. kudriavzevii* NPCC1651 48 h after *S. cerevisiae* ÑIF8.

**Figura 1.** Recuento de células viables (ufc/mL) (barras), valores de °Brix observados (puntos amarillos) y valores de °Brix modelados (líneas) en fermentaciones en mosto de manzana estéril cv. Granny Smith.

inoculación se ajustaron al modelo de decaimiento sigmoideo, destacándose que la estrategia P mostró la menor velocidad de consumo. Estos resultados evidencian un retraso en el inicio de las fermentaciones dirigidas por las estrategias P y Sec P-S, posiblemente explicado por el metabolismo de *P. kudriavzevii*, que domina las primeras horas del proceso. De hecho, la estrategia P requirió más tiempo para completar la fermentación en comparación con las demás (23 vs. 15 días).

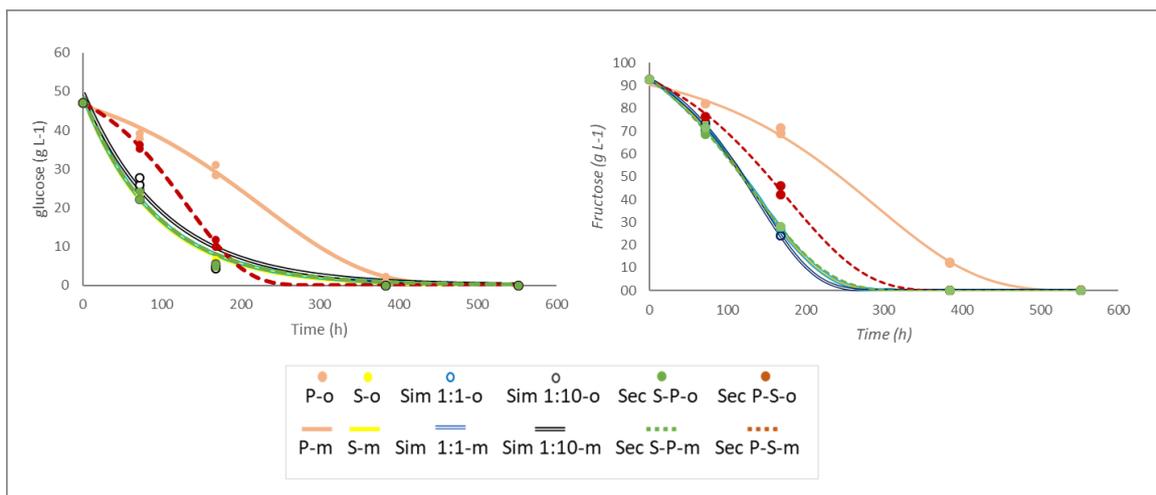
### 3.1.2. Recuento de levaduras viables

Para determinar la cantidad de levaduras de cada especie inoculada, se calcularon las ufc/mL a lo largo de la fermentación mediante la distinción morfológica de las colonias (Figura 1). Se detectó la presencia de células viables de ambas especies hasta el final de la fermentación en

todos los cultivos mixtos. Este resultado sugiere que las sidras obtenidas resultan de la combinación del metabolismo de ambas levaduras.

### 3.2. Caracterización de las sidras

Las sidras fueron analizadas según su perfil fisicoquímico y aromático (Tabla 3). Al comparar las dos estrategias de inoculación simultánea, la estrategia Sim 1:1 presentó mayores niveles de glicerol, un compuesto deseado por su impacto positivo en la textura y el equilibrio sensorial de la sidra. En cuanto al perfil de ácidos, la sidra Sim 1:1 mostró concentraciones más altas de ácidos láctico y succínico. El ácido succínico contribuye



**Referencias:** P: *P. kudriavzevii* NPCC1651; S: *S. cerevisiae* ÑIF8; **Sim 1:1:** Simultaneous fermentation by S:P ratio 1:1; **Sim 1:10:** Simultaneous fermentation by S:P ratio 1:10; **Sec P-S:** Sequential fermentation by *S. cerevisiae* ÑIF8 48 h after *P. kudriavzevii* NPCC1651; **Sec S-P:** Sequential fermentation by *P. kudriavzevii* NPCC1651 48 h after *S. cerevisiae* ÑIF8.

**Figura 2.** Consumo de glucosa y fructosa en fermentaciones en mosto de manzana estéril cv. Granny Smith. -o: valores remanentes observados, -m: valores remanentes modelados.

**Tabla 2.** Parámetros cinéticos de la fermentación obtenidos a partir de fermentaciones puras y mixtas de mosto de manzana cv. Granny Smith con *P. kudriavzevii* NPCC1651 y *S. cerevisiae* ÑIF8.

Disminución de °Brix							
	P	Sec P-S		S	Sim 1:1	Sim 1:10	Sec S-P
<i>Modelo</i>			<i>Modelo</i>				
<i>sigmoideo</i>			<i>exponencial</i>				
<i>K</i> (°Brix.h <sup>-1</sup> )	0,008 ± 0,0012 b	0,012 ± 0,0001 a	<i>K</i> (°Brix.h <sup>-1</sup> )	0,0060 ± 3x10 <sup>-4</sup> b	0,0066 ± 9x10 <sup>-5</sup> a	0,0069 ± 6x10 <sup>-5</sup> a	0,0056 ± 2x10 <sup>-4</sup> b
Consumo de glucosa							
	P	Sec P-S		S	Sim 1:1	Sim 1:10	Sec S-P
<i>Modelo</i>			<i>Modelo</i>				
<i>sigmoideo</i>			<i>exponencial</i>				
<i>K</i> (g/L.h <sup>-1</sup> )	0,007 ± 3x10 <sup>-4</sup> c	0,014 ± 2x10 <sup>-4</sup> a	<i>K</i> (g/L.h <sup>-1</sup> )	0,0110 ± 1x10 <sup>-5</sup> a	0,0108 ± 6x10 <sup>-4</sup> a	0,0097 ± 1x10 <sup>-4</sup> b	0,0107 ± 7x10 <sup>-4</sup> a
Consumo de fructosa							
	P	S	Sim 1:1	Sim 1:10	Sec P-S	Sec S-P	
<i>Modelo</i>							
<i>sigmoideo</i>							
<i>K</i> (g/L.h <sup>-1</sup> )	0,008 ± 7x10 <sup>-4</sup> c	0,012 ± 9x10 <sup>-4</sup> ab	0,012 ± 9x10 <sup>-4</sup> b	0,014 ± 1x10 <sup>-3</sup> a	0,01 ± 5x10 <sup>-4</sup> b	0,010 ± 1x10 <sup>-3</sup> b	

Letras distintas indican diferencias significativas (p>0.05) entre estrategias de fermentación (sólo comparable dentro de un mismo modelo). **Referencias:** P: *P. kudriavzevii* NPCC1651; S: *S. cerevisiae* ÑIF8; **Sim 1:1:** Simultaneous fermentation by S:P ratio 1:1; **Sim 1:10:** Simultaneous fermentation by S:P ratio 1:10; **Sec P-S:** Sequential fermentation by *S. cerevisiae* ÑIF8 48 h after *P. kudriavzevii* NPCC1651; **Sec S-P:** Sequential fermentation by *P. kudriavzevii* NPCC1651 48 h after *S. cerevisiae* ÑIF8.

con notas *umami* y redondez al sabor, mientras que el ácido láctico, al ser más suave que el málico (debido a la falta de un grupo carboxilo), aporta una acidez más agradable. Respecto al perfil aromático, la sidra elaborada con la estrategia Sim 1:1 presentó mayores niveles de alcoholes superiores, destacándose el 2-fenil etanol y el alcohol isoamílico, ambos

reconocidos por su contribución a notas florales y afrutadas. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el contenido de ésteres totales entre las estrategias de inoculación simultánea. En función de estos resultados, y considerando también que el uso de un inóculo 10 veces mayor de *P. kudriavzevii* en la estrategia Sim 1:10 implica un gasto de producción

**Tabla 3.** Perfil fisicoquímico y aromático de sidras producidas por fermentación pura y mixta con *P. kudriavzevii* NPCC1651 y *S. cerevisiae* ÑIF8.

	Cultivos puros		Cultivos simultáneos		Cultivos secuenciales	
	P	S	Sim 1:1	Sim 1:10	Sec P-S	Sec S-P
<b>Compuestos generales</b>						
Glucosa (g L <sup>-1</sup> )	0.20 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.02
Fructosa (g L <sup>-1</sup> )	0.16 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.28 ± 0.02
Glicerol (g L <sup>-1</sup> )	3,54 ± 0,31 a	3,16 ± 0,01 abc	2,81 ± 0,02 c	2,23 ± 0,05 d	2,93 ± 0,02 bc	3,28 ± 0,03 ab
Sorbitol (g L <sup>-1</sup> )	6,03 ± 0,34 a	5,50 ± 0,03 b	5,41 ± 0,00 b	5,24 ± 0,12 b	5,50 ± 0,03 b	5,42 ± 0,03 b
Etanol (% v/v)	5,65 ± 0,22 ab	5,62 ± 0,12 ab	5,79 ± 0,05 a	5,63 ± 0,02 ab	5,62 ± 0,03 ab	5,42 ± 0,04 b
Metanol (% v/v)	0,05 ± 0,01	ND	ND	ND	ND	ND
pH	3.31 ± 0.015 c	3.33 ± 0.005 c	3.35 ± 0.005 b	3.39 ± 0.005 a	3.36 ± 0.005 b	3.35 ± 0.005 b
<b>Ácidos orgánicos (g L<sup>-1</sup>)</b>						
Ácido cítrico	0,20 ± 0,01 a	0,09 ± 0,01 b	0,19 ± 0,01 a	0,19 ± 0,02 a	0,21 ± 0,03 a	0,19 ± 0,02 a
Ácido málico	5.55 ± 0.19 a	5.43 ± 0.08 ab	5.13 ± 0.05 cd	5.10 ± 0.21 cd	5.28 ± 0.11 bc	5.05 ± 0.05 d
Ácido acético	0,40 ± 0,05 a	0,07 ± 0,02 d	0,17 ± 0,05 bc	0,26 ± 0,03 b	0,40 ± 0,01 a	0,16 ± 0,00 cd
Ácido láctico	0,55 ± 0,09 c	0,95 ± 0,01 ab	0,81 ± 0,06 b	0,49 ± 0,04 c	0,54 ± 0,10 c	1,00 ± 0,03 a
Ácido succínico	0,43 ± 0,05 b	0,66 ± 0,01 a	0,62 ± 0,01 a	0,43 ± 0,02 b	0,42 ± 0,00 b	0,68 ± 0,01 a
Ácido totales	7.13 ± 0.22 ab	7.21 ± 0.08 a	6.93 ± 0.1 ab	6.47 ± 0.01 c	6.85 ± 0.07 b	7.06 ± 0.04 ab
<b>Alcoholes superiores (mg/L)</b>						
1-propanol	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1-octanol	< DL = 0.08	< DL = 0.08	< DL = 0.08	< DL = 0.08	< DL = 0.08	< DL = 0.08
1-butanol	< DL = 1.0	< DL = 1.0	< DL = 1.0	< DL = 1.0	< DL = 1.0	< DL = 1.0
2-feniletanol	7.65 ± 1.35 b	11.75 ± 2.25 a	5.85 ± 0.05 b	< DL c	< DL c	6.40 ± 0.50 b
Alcohol bencílico	< DL = 0.07	< DL = 0.07	< DL = 0.07	< DL = 0.07	< DL = 0.07	< DL = 0.07
Alcohol isoamílico	225 ± 15 b	250 ± 3 a	235 ± 5 ab	150 ± 4 c	125 ± 5 d	245 ± 5 a
Alcohol isobutilico	64.5 ± 5.5 a	37.0 ± 1.5 b	38.0 ± 2 b	29.0 ± 0.8 b	34.5 ± 1.5 b	34.0 ± 6.0 b
Alcoholes totales	297 ± 19.1 a	299 ± 2.2 a	279 ± 5.0 a	179 ± 1.2 b	160 ± 6.5 b	285 ± 11.5 a
<b>Esteres (mg/L)</b>						
Etil acetato	485 ± 75 a	220 ± 20 b	110 ± 1 c	160 ± 2 bc	240 ± 30 b	84.5 ± 0.5 c
2-fenil etil acetato	0.079 ± 0.014 ab	0.089 ± 0.005 a	0.071 ± 0.002 ab	0.068 ± 0.006 ab	< DL = 0.05 c	0.067 ± 0.001 b
Acetato de bencilo	0.555 ± 0.145 a	0.275 ± 0.045 b	0.185 ± 0.015 bc	0.130 ± 0.010 bc	0.115 ± 0.005 bc	0.101 ± 0.019 c
Acetato de isoamilo	2.05 ± 0.25 c	2.02 ± 0.21 c	3.23 ± 0.12 a	2.85 ± 0.15 ab	1.75 ± 0.05 c	2.75 ± 0.15 b
Acetate de isobutilo	0.077 ± 0.006 a	0.035 ± 0.002 b	0.040 ± 0.005 b	0.039 ± 0.004 b	0.045 ± 0.005 b	0.039 ± 0.004 b
Butirato de etilo	0.0735 ± 0.017 b	0.0905 ± 0.008 b	0.0895 ± 0.021 b	0.13 ± 5x10 <sup>-4</sup> a	0.08 ± 4x10 <sup>-4</sup> b	0.09 ± 5x10 <sup>-4</sup> ab
Decanoato de etilo	< DL = 0.60	< DL = 0.60	< DL = 0.60	< DL = 0.60	< DL = 0.60	< DL = 0.60
Hexanoato de etilo	< DL = 0.80	2 ± 0.01 b	2.15 ± 0.05 b	2.45 ± 0.15 a	1.05 ± 0.05 c	2.1 ± 0.1 b
Lactato de etilo	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Octanoato de etilo	0.15 ± 0.03 d	3.0 ± 1.7 abc	4.1 ± 1.4 ab	4.85 ± 0.45 a	2.15 ± 0.05 bcd	1.5 ± 0.2 cd
Ésteres totales	488.5 ± 74.9 a	224.4 ± 20.2 b	115.7 ± 5 c	165.6 ± 1.3 bc	243 ± 30 b	89 ± 1 c
Ésteres totales *	3.53 ± 0.07 d	4.48 ± 0.25 c	5.74 ± 0.01 a	5.66 ± 0.32 ab	3.09 ± 0.01 d	5.15 ± 0.23 b

Letras distintas indican diferencias significativas (p>0.05) dentro de cada fila. ND: no detectado. \*: excluyendo el acetato de etilo. **Referencias:** **P:** *P. kudriavzevii* NPCC1651; **S:** *S. cerevisiae* ÑIF8; **Sim 1:1:** Simultaneous fermentation by S:P ratio 1:1; **Sim 1:10:** Simultaneous fermentation by S:P ratio 1:10; **Sec P-S:** Sequential fermentation by *S. cerevisiae* ÑIF8 48 h after *P. kudriavzevii* NPCC1651; **Sec S-P:** Sequential fermentation by *P. kudriavzevii* NPCC1651 48 h after *S. cerevisiae* ÑIF8.

adicional, seleccionamos la estrategia Sim 1:1 para ser implementada en mosto natural. Al comparar las estrategias de inoculación secuenciales, se observó que la estrategia con inoculación inicial de *P. kudriavzevii* (Sec P-S) produjo sidras con mayores niveles de ácido acético y su éster, el acetato de etilo. Ambos compuestos son considerados no deseados debido a su asociación con aromas similares a solventes. Además, esta estrategia presentó menores concentraciones de ácidos láctico y

succínico. En cambio, la estrategia Sec S-P mostró atributos favorables, incluyendo mayores niveles de alcoholes totales, principalmente 2-fenil etanol y alcohol isoamílico, y una mayor cantidad de ésteres como 2-fenil etil acetato, isoamílico acetato y etil acetato, compuestos asociado a aromas florales y frutales. Asimismo, se observó un leve mayor consumo de ácido málico en la Sec S-P (37%). En base en estos resultados, la estrategia Sec S-P se selecciona para futuras inoculaciones en mostos naturales.

En cuanto a las inoculaciones puras, los resultados obtenidos con la fermentación con P no fueron prometedores, ya que presentó un mayor tiempo de fermentación, además de altos niveles de ácido acético y su éster, acetato de etilo, compuestos no deseados. Por otro lado, el cultivo puro S produjo sidras con niveles de alcoholes totales, comparables a los obtenidos con las estrategias Sim 1:1 y Sec S-P, además de una mayor cantidad de ésteres totales. En función de estos resultados, y considerando la mayor simplicidad operativa de la estrategia Sim 1:1 frente a las secuenciales, se seleccionaron las estrategias Sim 1:1 y S para pruebas en mostos naturales (no estériles) a escala de 10 L.

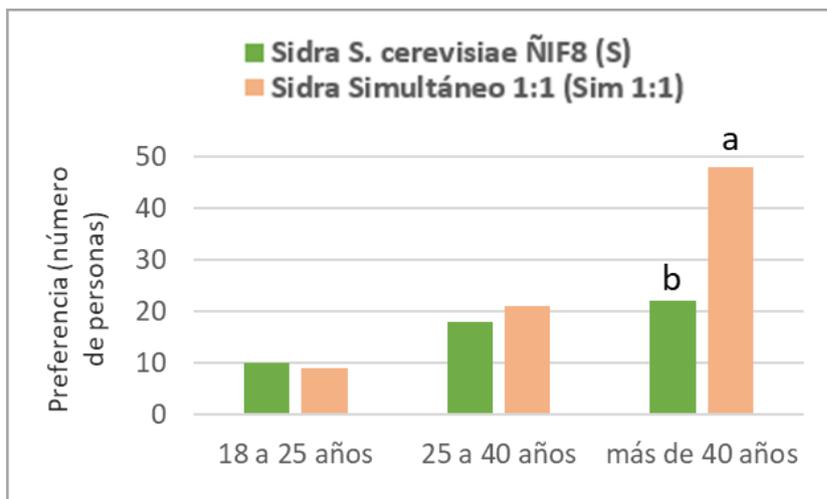
### 3.3. Análisis de preferencia en consumidores de sidras elaboradas en mosto natural

Las estrategias Sim 1:1 y S fueron implementadas en 10 L de mosto de manzana de variedad Granny Smith natural (no estéril). Las sidras obtenidas se acondicionaron con la adición de 20 g/L de sacarosa, y se realizó un análisis de preferencia con 120 consumidores no entrenados (Figura 3). El gráfico muestra el número de preferencias según los grupos etarios. La estrategia Sim 1:1 fue la más elegida, especialmente en el grupo de más de 40 años, donde la diferencia fue estadísticamente significativa. Cabe destacar que todas las personas que eligieron la sidra mixta mencionaron que les resultó agradable y percibieron diferencias sensoriales claras en comparación con la otra muestra de sidra.

Si bien resta caracterizar el perfil fisicoquímico y aromático de las sidras en mosto natural, así como evaluar el nivel de implantación de las levaduras inoculadas, los resultados obtenidos hasta ahora sugieren que el metabolismo de *P. kudriavzevii* influye positivamente en el perfil sensorial de la sidra, determinando su aceptación y preferencia por parte de los consumidores.

## 4. CONCLUSIONES

Las estrategias de inoculación S, Sim 1:1 y Sec S-P mostraron una buena cinética de



Letras distintas indican diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

**Figura 3.** Estudio de preferencia de consumidores entre sidras elaboradas con las estrategias Sim 1:1 y S en mosto natural.

fermentación, un consumo promedio de ácido málico y la producción de sidras con perfiles aromáticos caracterizados por altos niveles de alcoholes superiores y ésteres. Entre estas, las estrategias S y Sim 1:1 fueron probadas en mostos naturales, destacándose la sidra producida con la estrategia Sim 1:1 por su alto porcentaje de aceptación en el análisis de preferencia. Esto sugiere que el metabolismo de *P. kudriavzevii* influye positivamente en el perfil sensorial de la sidra.

Estos resultados aportan al desarrollo de sidras con identidad territorial y calidad distintiva y controlada. Además, el acondicionamiento de las sidras se realizó con la adición de solo 20 g/L de azúcar, un valor significativamente menor al de la mayoría de las sidras comerciales. Este menor contenido de azúcar no solo favorece la salud del consumidor, sino que también reduce los costos de producción, haciendo el producto más competitivo.

## 5. REFERENCIAS

- AICV. Cider Trends. 2022. Disponible en: <https://aicv.org/en/publications>
- Arroyo-López FN, Querol A, Barrio E. Application of a substrate inhibition model to estimate the effect of fructose concentration on the growth of diverse *Saccharomyces cerevisiae* strains. *J Ind Microbiol Biotechnol*.
- Blanco Gomis, D., Mangas Alonso, J.J. La manzana y la sidra: bioprocesos, tecnologías de elaboración y control. Asturias: Publicaciones Serida 8. 2010.
- Chu Y, Li M, Jin J, Dong X, Xu K, Jin L, *et al.* Advances in the application of the non-conventional yeast *Pichia kudriavzevii* in food and biotechnology industries. 2023.

- del Mónaco S, Barda NB, Rubio NC, *et al.* Selection and characterization of a Patagonian *Pichia kudriavzevii* for wine deacidification. *J Appl Microbiol.* 2013.
- Fu J, Wang L, Sun J, *et al.* Malolactic fermentation: new approaches to old problems. *Microorganisms.* 2022.
- González Flores M, Rodríguez M, Origone A *et al.* *Saccharomyces uvarum* isolated from patagonian ciders shows excellent fermentative performance for low temperature cidermaking. *Food Res Int.* 2019.
- Hu L, Chen X, Lin R, *et al.* Quality improvement in apple ciders during simultaneous co-fermentation through triple mixed-cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kudriavzevii*, and *Lactiplantibacillus plantarum*. *Foods.* 2023.
- Lambert RJW, Pearson J. Susceptibility testing: Accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *J Appl Microbiol.* 2000.
- Liu W, Ji R, Aimaier A, *et al.* Adjustment of impact phenolic compounds, antioxidant activity, and aroma profile in Cabernet Sauvignon wine by mixed fermentation of *Pichia kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem.* 2023.
- Li Y, Nguyen TTH, Jin J, *et al.* Brewing of glucuronic acid-enriched apple cider with enhanced antioxidant activities through the co-fermentation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii*) and bacteria (*Lactobacillus plantarum*). *Food Sci Biotechnol.* 2021.
- Mazzucco MB, Rodríguez ME, Caballero AC, Lopes CA. Differential consumption of malic acid and fructose in apple musts by *Pichia kudriavzevii* strains. *J Appl Microbiol.* 2024.
- MAGyP. Informe sobre la cadena de valor de la sidra en Argentina.2022. Disponible en: [https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/cadenas\\_agroalimentarias-febrero2020.pdf](https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/cadenas_agroalimentarias-febrero2020.pdf)
- Vicente J, Baran Y, Navascués E, *et al.* Biological management of acidity in wine industry: a review. *Int J Food Microbiol.* 2022.
- Roessler EB, Warren J, Guymon JF. Significance in triangular taste tests. *Food Res.* 1948.