

MEDIDAS Y OBSERVACIONES EN LA FERMENTACIÓN DE UNA SIDRA ECOLÓGICA EN CONDICIONES REALES. APROXIMACIÓN EMPÍRICA DESDE EL LAGAR

*Miguel Ángel Pereda Rodríguez**
mapr54@gmail.com

RESUMEN

Se ha realizado un seguimiento de los principales parámetros físicos y químicos a lo largo de la fermentación de un mosto de manzana ecológico con los recursos propios del lagar y a pequeña escala. Resulta de particular interés la medida del potencial redox, algo no practicado hasta ahora en el ámbito de la sidrería. Se ha constatado que la medida del potencial redox puede ser una muy buena herramienta para el elaborador de sidra ya que junto a otras clásicas medidas, aporta interesante información sobre los fenómenos que ocurren durante la fermentación.

ABSTRACT

There has been a monitoring of the main physical and chemical parameters during the fermentation of organic apple juice with the resources of a cellar and on a small scale. It's notably interesting the measurement of the redox potential, something that had not been practiced so far in the field of cider. It has been found that this measurement of redox potential can be a useful tool for the cidermaking, since along with other classic parameters, provides him with interesting information on the phenomena that occur during fermentation.

Palabras clave: Sidra; fermentación; potencial redox; cider; fermentation; redox potential.

INTRODUCCIÓN

El objetivo del presente trabajo es hacer un seguimiento de diferentes parámetros físicos y químicos a lo largo de una fermentación de una barrica de sidra natural ecológica. Se utilizan recursos tecnológicos de bajo coste, propios del lagar a pequeña escala y en condiciones de trabajo reales. Se hace especial incidencia en la medida del potencial redox y en su interpretación y correlación con las otras medidas.

MATERIAL Y MÉTODOS

MANZANAS

Para este estudio se han utilizado manzanas ecológicas de sidra, variedades asturianas, de cosecha propia. Las variedades utilizadas fueron: Reinetina, Raxao, Blanquina, Regona, Pardina, Anxelón y otras variedades sidreras de nombre desconocido. Agrupadas por bloques tecnológicos la proporción utilizada fue: semiácidas el 59%; ácidas el 30%; amargas el 11% y el resto dulces.

BARRICA

En este estudio se va a utilizar una barrica de acero inoxidable AISI 316 siempre llena y que tiene capacidad variable. El depósito se instala en un local donde las temperaturas pueden oscilar a lo largo del año entre 9° C en los días más fríos y 18° C en los más calurosos.

PICADORA

Se utiliza una picadora con rallador de madera y dientes de acero inoxidable

EL LAGAR Y RECIPIENTES

En la campaña se utiliza un modelo de lagar de acero inoxidable de apriete tradicional y manual y con capacidad para unos 450-470 kg por mayada. Todos los recipientes utilizados para la recogida y manipulación de la sidra son de plástico de calidad alimentaria.

PROCEDIMIENTO

La obtención del jugo de manzana comienza previamente, con una exhaustiva selección de las manzanas. Se tritura la manzana y la pulpa o “magaya” se echa en el lagar. Es costumbre en Asturias dejar la pulpa triturada en el lagar toda la noche macerando antes de apretar. En la campaña de 2014 se procesaron las manzanas el 8 de noviembre por la noche. Al día siguiente, se comienza a apretar la pulpa manualmente. El líquido fluye, se recoge y se añade a la barrica. Se realizaron varios “cortes” según la técnica tradicional empleada en sidrería. El proceso total de extracción duró hasta el día 11. Todo el jugo obtenido se echó en la barrica siempre llena.

MICROORGANISMOS

Toda la micro flora empleada es natural y autóctona tanto en lo referente a levaduras como a bacterias lácticas y acéticas.

MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS

Para la medida de la densidad del mosto a lo largo de la elaboración se utilizó un densímetro calibrado a 15°C, haciéndose las correcciones oportunas cuando la temperatura del mosto no era coincidente con 15°C. Todos los reactivos químicos empleados en los análisis realizados son de calidad analítica: disoluciones NaOH 0,1 M Merck y agua destilada.

Para la determinación de la acidez total, AT, se sigue el habitual procedimiento de valoración ácido base usando como indicador fenolftaleína. Los resultados se expresan en g de sulfúrico/L₍₁₀₎.

Para las cromatografías de papel se emplea papel cromatográfico Whatman número 1 y el eluyente se prepara a base de un 71,4 % de n-butanol, 28,6% de ácido acético glacial al 50% y como indicador 0,5 gramos de azul de bromo fenol por cada 100 mL. En la determinación de la acidez volátil, AV, se utiliza el método de García-Tena. Los resultados se expresan en g de acético/L₍₁₀₎. En la determinación del ácido láctico se utiliza un reflectómetro RQFlex de la casa Merck y tiras indicadoras Reflectoquant específicas para la medida del ácido láctico en el rango de 1,0 a 60,0 mg de láctico/L. Por ello y para la lectura en el rango adecuado de lectura del aparato, en cada caso se hizo la dilución de 1 mL de sidra a 99 mL de agua destilada. Para la lectura del pH se utiliza un pHmetro portátil Checken de Hanna y las disoluciones de calibrado de pH 4,00 y pH 7,00 son Certipur de Merck.

Para la medida del potencial redox se utiliza un electrodo de bajo coste utilizado en las medidas de potenciales redox de acuarios, modelo ORP 169 F, fabricado en China. Tiene una resolución de 1mV y una precisión de $\pm 5\text{mV}$. En la determinación del nitrógeno fácilmente asimilable, NFA, en el mosto se siguió el método de Sørensen⁽¹⁰⁾.

ANÁLISIS DE LOS PRINCIPALES PARÁMETROS DEL MOSTO OBTENIDO

La fermentación del mosto de manzana es un proceso mucho más largo comparado con el del vino, porque el contenido de nitrógeno fácilmente asimilable por las levaduras, NFA, es mucho más bajo en la sidra que en el vino. En este caso, realizado el análisis pertinente, resultó ser extremadamente bajo: 18,6 mg/L. Y en este dato tan bajo puede encontrarse la razón principal de la inusual duración de esta fermentación. En otras temporadas, con manzanas de fincas diferentes, las fermentaciones ya habían concluido dos o tres meses antes. El proceso duró 166 días a lo largo de los cuales se midió la densidad con el densímetro para establecer la curva propia de variación de la densidad y la velocidad semanal de decaimiento de esa densidad durante la fermentación (-^a densidad semanal).

DESARROLLO Y SEGUIMIENTO DE LA FERMENTACIÓN

ESTUDIO DE LA FML

Desde el primer día, 8 de noviembre, hasta el 11 se va completando la adición de las diferentes cantidades de sidra en la barrica hasta dar por finalizado el proceso de prensado y extracción. Se analiza el mosto flor que sale el primer día realizando una valoración ácido-base para determinar la AT, del mismo, resultando: 4,11 g de sulfúrico /L y un pH de 3,3. En este día 11 se completa el llenado de la barrica. En total 214 litros. La densidad final de la barrica siempre llena fue 1047,9 g/L, acidez total 2'55g sulfúrico/L y su pH total es 3,64. Había subido algo respecto al mosto inicial.

Se realiza una cromatografía de papel al mosto desde el primer día con la finalidad de determinar si el proceso de la fermentación maloláctica, FML, ha comenzado y se observa que ésta comienza ya el día 10, incluso antes de acabar el proceso de extracción de todo el jugo.

El día 11 de noviembre comienza a apreciarse los primeros indicios del comienzo de la fermentación alcohólica, FA, con desprendimiento de una espumilla blanca.

Día 18. La cromatografía realizada en este día pone de manifiesto el fin de la FML. Se realiza además una valoración ácido base para medir la AT y se mide el pH. Los resultados fueron: 1,59 g sulfúrico /L y 3,9 respectivamente. Lo que confirma que la FML provocó una caída notoria de la acidez total y una subida del pH. En el día de hoy comienza a apreciarse que la sidra comienza a entrar en la fase de la fermentación alcohólica tumultuosa con una vigorosa expulsión de espuma.

Se ha constatado que la FML comenzó incluso antes de que se observaran indicios del comienzo de la FA y todas las evidencias químicas sugieren que la FML prácticamente desde el día 18, ha llegado a su fin.

Día 21. Hoy se mide el contenido en ácido láctico de la sidra obteniendo un valor de 3,64 g de láctico/L.

Durante los días sucesivos, la sidra estuvo en fermentando en la fase tumultuosa con abundante expulsión de espuma.

Día 25. Se mide la AV (ácido acético principalmente) y se obtuvo 0,32 g acético/L en este temprano estado de la fermentación. La barrica en fermentación se comporta como

un reactor abierto a la atmósfera, sin agitación ni alimentación forzada y en la que se pueden producir turbulencias naturales y en ocasiones, y en este tipo de barricas siempre llenas, en los primeros días, pero también más adelante, si se acumula una bolsa de CO₂ debajo de la tapa o en las propias borras, puede llegar a producirse una expulsión parcial de líquido debido a la presión del gas y ello provoca, además, que la sidra de todo el recipiente se revuelva. El líquido se recoge entonces con un pequeño vaso provisto de un asa. Se echa temporalmente en otro recipiente y luego se vuelve a reintegrar al interior de la barrica ajustando de nuevo la tapa. Esta labor puede ser diaria durante aproximadamente dos semanas hasta que finaliza la etapa de fermentación tumultuosa y sólo ocasionalmente a partir de entonces y hasta el final de la fermentación. La tapa debe de estar siempre flotando sobre el líquido convenientemente hinchada y sin moverla si no es necesario.

RESULTADOS DE LAS MEDIDAS OBTENIDAS

Desde el comienzo del procesado el día 8 de noviembre, hasta el embotellado de la sidra, además del seguimiento ya comentado de la FML, se han realizado las medidas que se muestran en las gráficas siguientes, siendo de particular interés la medida del potencial redox que se estudiará con detalle. Se observa que el pH inicial del mosto en la barrica era más bajo y debido a la FML se alcanzan valores de 3,97-3,99 que se mantienen prácticamente constantes hasta el embotellado, figura 4.

La temperatura del líquido comenzó siendo alta, 15°C. En los primeros días de la fermentación durante los meses de enero y febrero bajó a 9 y 10°C y en las últimas etapas de la fermentación volvió a subir progresivamente alcanzándose en algunos días de abril los 16°C, figura 5.

En la figura 6 se observa que la AT sufre una bajada inicial provocada por la propia FML y luego remonta hasta un máximo, decae ligeramente y a continuación, en las últimas etapas de la fermentación, aumenta linealmente. En cualquier caso la AT de la sidra que se embotella tiene una acidez total de 2,89 g de sulfúrico/l, notablemente inferior a la del mosto flor: 4,11 g sulfúrico/L. En la gráfica de la figura 7 se aprecian la AT y la AV. La primera medida de AV se realizó a los 18 días y ya se detectó, tan al comienzo de la fermentación, una cantidad notable de AV, 0,32 g de acético/L. Posteriormente la AV decae para ir subiendo progresivamente a lo largo de la fermentación hasta alcanzar 1,04 g de acético/L cuando se embotella. El aumento de la AV en las últimas etapas de la fermentación contribuye también a que aumente la AT. La variación de AV por su importancia en los aspectos organolépticos de la sidra, se estudiará con más detalle en párrafos siguientes.

POTENCIAL REDOX

La sidra, al igual que el vino, es un sustrato en el que coexisten variados equilibrios de redox. Un equilibrio redox se caracteriza porque una sustancia, oxidada, captura electrones para convertirse en otra, reducida: sustancia oxidada + n e⁻ → sustancia reducida. Por ejemplo, un sistema acuoso en el que existan cationes Fe³⁺ y Fe²⁺ el equilibrio redox sería: Fe³⁺ + 1 e⁻ → Fe²⁺. El Fe³⁺ es la especie oxidada y el Fe²⁺ es la especie reducida.

En el equilibrio se ve que la especie oxidada gana electrones para convertirse en una especie reducida. En el equilibrio las velocidades de la reacción en los dos sentidos son iguales. La sustancia reducida y la sustancia oxidada constituyen un par redox. En el ejemplo el Fe³⁺/Fe²⁺ son el par redox.

El potencial redox de un sistema en el que existen especies oxidadas y reducidas en equilibrio, viene dado por la ecuación de Nernst:

Donde E_0 es el potencial redox de la pareja Oxid/Red en condiciones estandar (25°C y 1 Molar de concentración) de las especies redox presentes; R es la constante de los gases; T es la temperatura en grados Kelvin; n es el número de electrones que intercambian ambas especies químicas en el equilibrio; F es la constante de Faraday y y y x son las concentraciones molares de las especies reducidas y oxidadas.

El interés por el potencial redox de los vinos data ya de los años 30 y algunas investigaciones han sido hechas sobre los procesos redox en los vinos. No así en el ámbito de la sidra, donde ninguna investigación de interés se ha realizado en este campo, a pesar de que básicamente la fermentación y los procesos generales de elaboración son semejantes aunque con diferente dilatación temporal.

De acuerdo con Vivas⁽¹⁴⁾ la medida del potencial redox de un vino y por lo tanto de la sidra, representa una fotografía instantánea del estado de oxidación del vino. El potencial redox mide el estado redox del medio extracelular en el que están los diferentes organismos que existen durante la fermentación. Depende del pH, de la temperatura, de las sustancias químicas presentes en el medio, del oxígeno disuelto y fundamentalmente de la actividad microbiana.

La medida del potencial redox es sensible a los parámetros citados pero el pH y temperatura oscilan muy poco durante la fermentación de la sidra, por ello, en condiciones habituales de fermentación, los factores más influyentes en la variación del estado redox va a ser la presencia del oxígeno disuelto y la actividad microbiana a lo largo del proceso de fermentación⁽¹¹⁾.

Además la adición de sulfitos, dado su carácter reductor, modifica las condiciones de la sidra. Pero en este trabajo, como ya ha sido dicho, no se ha añadido ningún sulfito ni aditivo y las condiciones de elaboración son totalmente naturales y ecológicas.

CÓMO SE MIDIERON LAS VARIACIONES REDOX

El potencial redox se mide utilizando un electrodo que puede ser de platino, oro, carbón, acero inoxidable u otro material inerte. Frecuentemente, en los medidores de laboratorio de calidad, se emplean electrodos de platino. Cuando medimos el potencial redox de una disolución, estamos midiendo la diferencia entre el potencial de la disolución y el potencial redox del electrodo de hidrógeno al que se ha asignado el valor de 0 V. Se miden diferencias porque no se pueden medir potenciales redox en términos absolutos. En la práctica, en vez de utilizar como referencia el electrodo de hidrógeno, que es tecnológicamente complicado, se utiliza otros electrodos más manipulables como el electrodo Ag/AgCl (3,5M KCl) que comparado con el del hidrógeno tiene un potencial de 0,205 voltios. Por lo tanto, cuando se hace una medida con el electrodo de platino frente al electrodo de Ag/AgCl habría que tener en cuenta al valor obtenido los 205 mV del electrodo de Ag para referenciarlo al electrodo de hidrógeno.

Este tipo de medidores del potencial redox más manipulables, combinan conjuntamente el electrodo medidor de un metal inerte y el de referencia de Ag, en un dispositivo conjunto y compacto y se utilizan en los campos de medidas de acuarios, controles en depuración de aguas y en variados campos de investigación y de la industria.

Los estudios realizados sobre la medida del potencial redox del vino utilizan electrodos

de trabajo de platino y se han descrito en la literatura científica las dificultades para obtener medidas reproducibles debido a fenómenos de contaminación del electrodo por adsorción de diversas sustancias electroactivas y requiriendo tiempos de espera de hasta dos minutos para obtener medidas estables en vinos blancos y hasta más minutos en vinos tintos⁽¹²⁾. Además, estos medidores deben de ser calibrados con las disoluciones redox adecuadas para tener medidas exactas.

La medida del potencial redox es más difícil que la del pH porque como ya se ha dicho presenta problemas de estabilidad y en ocasiones, sobre todo en vinos tintos, de reproducibilidad, pero si se emplean un buen protocolo de operación esos inconvenientes pueden ser evitados.

En este trabajo se ha sumergido el electrodo en la sidra cada día, casi a la misma hora, siempre a la misma profundidad y en cada medida se ha tomado un tiempo de 15 minutos para lograr suficiente estabilización en la lectura. Después de cada lectura diaria siempre se lavó y aclaró con agua destilada guardándose debidamente en agua destilada hasta el día siguiente. Se ha observado que este medidor en sidra, no presenta ninguno de los problemas de contaminación del electrodo, descritos para el vino. Lógicamente para la lectura del potencial redox no se ha empleado agitación forzada de la sidra. Los valores de mV que se indican en las gráficas son los señalados por el electrodo a los 15 minutos.

CÓMO ACTÚAN LOS MICROORGANISMOS SOBRE EL POTENCIAL REDOX

En las variaciones de potencial redox que se observan en una bodega, a parte del pH y la temperatura, afectan otros factores como la entrada de oxígeno en el recipiente. El oxígeno es un oxidante soluble en el medio líquido en mayor o menor medida y que puede interactuar con los compuestos químicos de la sidra que tengan carácter reductor como los polifenoles⁽⁴⁾, y con los microorganismos presentes⁽²⁾.

Las posibles agitaciones exógenas o endógenas de la sidra en la bodega pueden provocar un incremento del oxígeno disuelto, pero este oxígeno disuelto puede ser consumido por la propia actividad microbiológica de las bacterias y levaduras, llevando al medio hasta una situación anaeróbica⁽⁵⁾. Sin la intervención de los microorganismos nunca se alcanzaría un ambiente anaeróbico en la fermentación.

Las levaduras, tienen un carácter reductor y si se introduce oxígeno en la disolución, y están en su máxima actividad, son capaces de metabolizarlo rápidamente también. Las borras o lías de la sidra que son las acumulaciones de levaduras en el fondo del recipiente, también actúan como reductoras y son capaces también de consumir oxígeno⁽⁵⁾. Para entender la medida redox de la fermentación de la sidra hay que tener en cuenta la habitual gráfica de crecimiento de las levaduras como agentes más influyentes en el proceso de fermentación y que esquemáticamente se muestra en la figura 8.

Se aprecian cuatro fases:

I.- De latencia y adaptación al medio, en esta fase las levaduras no crecen.

II.- La siguiente fase es la de crecimiento exponencial en la cual las levaduras crecen y se reproducen fuertemente, es la fase que se denomina de fermentación tumultuosa con fuerte desprendimiento de espuma y gas en la sidra y con fuerte actividad fermentativa por parte de estos microorganismos.

III.- Luego viene una fase de estabilización que ocurre cuando ya no hay una tasa de crecimiento neto. La fermentación continúa pero con una de velocidad más moderada y sin la emisión de tanta espuma y gas.

IV.- Y por último de decadencia y muerte, pudiéndose producir incluso la autólisis de las levaduras en cierto grado. En la literatura científica se cita que la actividad metabólica de las levaduras durante la fermentación en cultivos puros, al principio tiende a bajar el potencial redox y luego, superado un mínimo, tiende a subir. Se puede establecer una correlación entre el crecimiento de las levaduras y el potencial redox^(3, 16). Pero no hay que olvidar que en una fermentación ecológica en bodega no sólo intervienen levaduras de diferentes razas, sino también están presentes bacterias lácticas, BL, y acéticas, BA, que con su actividad metabólica pueden modificar el estado redox de la disolución. De todas formas los microorganismos más determinantes, por decirlo así, son las levaduras. Las BL son también muy importantes en el proceso de elaboración de la sidra. Actúan en los rangos de pH 3,3-4,0 propios de la sidra⁽¹⁾ y también son capaces de modificar el estado redox de la disolución. Cuando actúan provocan una brusca caída del potencial.

A menudo la actividad de las BL pasa desapercibida pero su actuación es fundamental en el estilo de sidra asturiana con la FML casi siempre realizada antes de embotellar. En la figura 9 se observa la gráfica del potencial redox y los valores de densidad a lo largo de toda la fermentación. En general cabe pensar que refleja la acción de las levaduras, pero también cuando se producen bajadas bruscas y repentinas del potencial redox es probable que alguna actividad microbiana importante esté teniendo lugar, por la intervención también de alguno de los otros microorganismos presentes: BL o BA. De la misma forma que en el proceso de fermentación se distinguen cuatro fases en correlación con el número de levaduras, cabría establecer un paralelismo entre estas fases y el potencial redox en cuanto que hay una simultaneidad temporal.

Así en la figura 9, se indica la fase I de latencia, que es muy corta. Luego, ya en la fase II, entre dos puntos azules de la figura 10, se indica el período en el que las BL han realizado la FML que en este caso coincide con los comienzos de la FA que realizan las levaduras. Durante la fase II se aprecia también el desplome del potencial redox por la acción metabólica de las levaduras. Se ha indicado con un punto rojo el término de la fase tumultuosa que comenzó al tercer día y que acabó en el día 18 aproximadamente. En esta fase las levaduras se desarrollan y crecen exponencialmente y su actividad provoca una caída del potencial redox hasta valores muy bajos indicando que en la disolución predominan las especies reducidas. De hecho, en el mínimo se pueden apreciar olores a sulfhídrico, fruto de la acción de las levaduras sobre las proteínas que contienen azufre y que luego desaparecen a medida que el potencial redox vuelve a subir.

Cuando se alcanza un mínimo valor del potencial redox, la velocidad de fermentación en ese tiempo es máxima, 7,8 unidades por semana y la actividad de las levaduras se manifiesta por una gran expulsión de espuma acompañada de un importante desprendimiento de CO₂. En este momento de la fermentación la densidad ha bajado hasta 1037,7 g/L, lo que supone un consumo por parte de las levaduras de unos 23,5 g de azúcares y una formación de alcohol aproximada de 1,5°. La AV en ese punto es ya de 0,32 g acético/L, probablemente por la acción de las BL pero también, en parte menor, por las levaduras, pues ambos tipos de microorganismos son capaces de producir acético^(6, 13).

Superada la fase II, nos encontramos en la fase siguiente, con un incremento general del potencial redox desde la zona A hasta la señalada con la letra D, como se ve en la figura 11.

Las levaduras en esta fase ya no se reproducen exponencialmente, no tienen tanta capacidad reductiva y no pueden compensar la influencia de un oxidante como el oxígeno y el potencial redox, globalmente, tiende a subir.

La máxima actividad de las levaduras ya ha pasado y la velocidad semanal de la fermentación tiende a disminuir, figura 13. Debido a que el medio se está enriqueciendo en sustancias tóxicas para las levaduras, su número acaba manteniéndose bastante estable en cuanto que no son capaces de reproducirse.

Para interpretar las fluctuaciones que se observan en el potencial redox, hay que tener en cuenta que las levaduras no sólo son capaces de transformar azúcares en alcohol y CO₂, sino que también pueden producir otros metabolitos.

La fluctuación que se observan en la zona B, pueden atribuirse al hecho de que después de la fase tumultuosa, de carácter muy reductivo, las levaduras han expulsado al medio cierta cantidad de ácido acético para mantener su balance redox dentro del citoplasma⁽⁸⁾. Ese ácido acético es luego parcialmente reabsorbido. De hecho en la zona B, la AV de esta sidra bajó 0,25 g acético/L, mientras que en el extremo inferior mínimo de la fase tumultuosa, A, la AV era 0,32 g acético/L, lo que parece confirmar que el fenómeno de expulsión y reabsorción parcial de acético se produce en la sidra y en esta fase temprana de la fermentación.

En la zona señalada con la letra C, se observa una brusca y repentina caída del potencial redox de intensidad considerable y no atribuible a variaciones de temperatura o presión que podrían revolver la sidra. En el punto C la AV ha aumentado hasta el valor de 0,47 g de acético/L. El pH ha subido hasta 3,93, la AT ha bajado a valores de 2,16 g de sulfúrico /L y el contenido en ácido láctico ha bajado desde la última medida 3,64 g/l al valor actual de 2,75 g láctico/L. Todas estas variaciones en los parámetros químicos, cuantificables en el lagar, parecen sugerir algún tipo de actividad microbiana que provoca esta caída del potencial.

G.C. Whiting⁽¹⁵⁾, afirma que una de las causas de aumento de ácido acético puede ser un ataque al ácido quínico y sus ésteres después de que se haya completado la FML, produciendo una reducción a hidroxiquimato y el agente donante del hidrógeno para la reducción, es el ácido láctico, el cual se oxida a ácido acético. Esta explicación, basada en la acción de las BL sobre el ácido quínico y sus ésteres parece concordar con las variaciones de los parámetros medidos: la bajada del contenido en ácido láctico, figura 12, a la vez que el simultáneo aumento de la AV, figura 14, y podría ser la causa de esa bajada de potencial en C. En este sentido Herrero y colaboradores⁽⁷⁾ han comprobado también bajadas del ácido láctico y quínico en fermentaciones controladas e inoculadas simultáneamente con levaduras y bacterias lácticas.

La fermentación prosigue en los días sucesivos y la subida del potencial continúa de hasta llegar a la zona marcada con la letra D en la que se produce un máximo.

Observando la gráfica AV/Potencial redox, figura 14, se aprecia que el aumento de la AV todo a lo largo de la fermentación es más acusado al final de la región IV en la que las levaduras ya no tienen tanta capacidad fermentativa, la velocidad de la fermentación es más baja, figura 13 y su protagonismo en el proceso es menor.

En esta situación declinante de las levaduras, las bacterias acéticas adquieren ahora más influencia, y su actividad se traduce en un incremento de la AV al final de la fermentación. Algo que es bien conocido por los elaboradores de sidra. El avinagramiento se da principalmente al final de la fase fermentativa. En la gráfica de la figura 14 se aprecia esto con bastante claridad.

También se observa una buena correlación entre caídas bruscas del potencial con incrementos en la AV. Lo cual sugiere que la medida del potencial redox durante la fermentación sería capaz de detectar la actividad de las bacterias acéticas.

En esta fase IV, que comienza con una densidad de 1015 g/L, un cierto número levaduras van muriendo y la velocidad de la fermentación se ralentiza hasta llegar a una densidad próxima a 1000 g/L, momento en el que se suele embotellar la sidra.

En la figura 15 se aprecia que la tendencia global del potencial redox en esta fase es a disminuir hacia valores de potencial cada vez más negativos, probablemente por la continua acumulación del etanol⁽⁹⁾.

Los 30 primeros días de esta fase se corresponden, en general, con tiempo frío y estable propio de la situación anticiclónica del invierno. Se observa al principio de esta fase que el potencial redox permanece bastante estable, con las fluctuaciones propias de un sistema abierto a la atmósfera, sin agitación constante, sometido a ligeras variaciones de temperatura y a cambios en la presión atmosférica, que pueden provocar que la sidra se revuelva. Pero a partir del día 80 y 81, zona E, fuertes vientos y subidas ligeras de temperatura provocan que la sidra se revuelva notablemente, lo que genera una mayor presencia de levaduras en suspensión, y provoca una caída continua del potencia redox durante esos días. Cuando los fuertes vientos se moderan y las temperaturas enfrían algo, el sistema tiene de nuevo a aposentarse y el estado oxidativo del mismo aumenta, como vemos en la misma gráfica. Este es un buen ejemplo de cómo el potencial redox es un parámetro sensible a diversas alteraciones del medio, incluido la agitación del mismo, pero que superada la causa de la agitación el potencial redox tiende de nuevo a recuperarse.

Los lagareros saben muy bien que los días de viento y, por consiguiente, de bajas presiones, la sidra se revuelve, y en esos días no deben de realizarse ni trasiegos ni embotellados, so pena de obtener un producto más turbio. La misma situación de bajas presiones y tiempo borrascoso se reproduce alrededor del día 97, zona F, en el que de nuevo el potencial redox baja como consecuencia de la agitación provocada por las bajas presiones. En este día se ha observado que la sidra extraída para medir la densidad estaba más turbia que en días anteriores, lo que confirma que existe una correlación positiva entre la agitación y la bajada del potencial redox en esta etapa de la fermentación. Se observa que las fluctuaciones en forma de pico provocadas por la agitación de la sidra contribuyen a un incremento ligero en la AV en estos momentos de la fermentación. A partir de este punto y hasta el final de la fermentación no volvió a producirse una agitación espontánea significativa de la sidra. También resulta destacable que en esta IV etapa de la fermentación, a pesar de que cuando la sidra se revuelve puede haber más levaduras en suspensión, este hecho no se traduce en un incremento en la velocidad de fermentación como se puede apreciar en la figura 16. Quizás porque en esta etapa las levaduras tienen ya poco poder fermentativo debido a la escasez de nutrientes o a la presencia de tóxicos para ellas en el medio de fermentación. Esto se pudo comprobar en la zona G, cuando la fermentación estaba a 1007 g/L de densidad, su velocidad semanal era baja 1,1. Se decidió entonces intentar aumentar esta velocidad de fermentación agitando la sidra a en profundidad, esta técnica en el mundo del vino se llama “bazuqueo” o “batonaje”. El objetivo era poner más levaduras en suspensión con la esperanza de que la velocidad de fermentación aumentase. Con una bomba se trasladó la sidra a otra barrica de acero inoxidable y se volvió a reincorporara otra vez a la siemprellena conservando todas las borras del fondo del depósito. Esto originó básicamente dos cosas: una oxigenación notable del líquido y una pérdida del gas carbónico.

La velocidad de fermentación no aumento prácticamente nada e incluso bajó a las dos semanas, figura 16. Sin embargo la agitación tuvo un efecto de bajada en el potencial redox, zona G, y un aumento en la AV que paso de 0,67 a 0,77 g acético/L.

Probablemente por la acción de las BA que ante la debilidad fermentativa de las levaduras comienzan ya a actuar notablemente.

Después de la zona G, figura 15, la densidad es ya baja, 1003g/L aproximadamente y se

observan en la gráfica del potencial redox una serie de picos hacia valores muy negativos señalados con las letras H e I.

En estas zonas no hubo agitaciones ni espontáneas ni provocadas, por lo que esas bruscas bajadas de potencial pueden atribuirse a fuertes actividades microbianas. Sin duda ahora y ante la debilidad de las levaduras, las BA comienzan a actuar. En la zona H la densidad es 1002,5 aproximadamente y se han observado hilos mucilaginosos en la rosca de la válvula en la tapa de la barrica, signo inequívoco de su incremento metabólico.

A partir de esa zona H, la AV comienza a subir hasta desde 0,77 hasta 0,92, figura 14. Todos estos son indicios claros de que las BA están actuando, transformando el alcohol de la disolución en ácido acético, es decir, incrementando la AV.

En la zona I, la densidad apenas baja, la velocidad semanal de fermentación es de 0,5 puntos semanales, realmente muy baja, y nuevamente se observan las mismas bruscas bajadas de potencial e incrementos en la AV, figura 14, casi con seguridad atribuibles a la acción de las BA.

La fermentación continúa lenta e incrementándose la AV hasta que se llega a 1001,5 de densidad, momento en que se decide embotellar la sidra para evitar que la AV aumente más allá del último valor medido de 1,04 g de acético/L. En la botella y en ausencia de oxígeno, la sidra adquirirá algo de gas y estará más protegida de la acción de las BA que incrementan la AV. Se hace un examen organoléptico y se procede a embotellar por gravedad. Los parámetros finales de la sidra fueron: densidad 1001,5 g/L; AT = 2,89 g sulfúrico/L; AV = 1,04 g acético/L; pH = 3,99; láctico = 2,53 g láctico/L.

CONCLUSIONES

* Se ha llevado a cabo una elaboración de sidra natural ecológica en recipiente de acero inoxidable del tipo siemprelleno utilizando manzanas de sidra y sin la adición de ningún tipo de aditivos y con microbiota natural autóctona.

* Se han realizado seguimientos de los parámetros: temperatura, pH, AT, AV, ácido láctico y potencial redox a lo largo de todo el proceso fermentativo.

* Se ha verificado que en esta elaboración, la FML se ha desarrollado en los primeros días del proceso extractivo y de la elaboración de la sidra, algo que no siempre ocurre.

* Se ha constatado que el potencial redox es, principalmente, sensible a la actividad microbiana y a las agitaciones endógenas y exógenas del sistema.

* Se ha comprobado que la agitación de la sidra, sobre todo en la fase final de fermentación, no es un recurso tecnológico adecuado, en cuanto que no aumenta la velocidad de fermentación, hace que la sidra pierda gas y provoca subidas de la acidez volátil.

* Se ha observado un aumento de la acidez volátil por la acción de las bacterias acéticas en el declinar de las levaduras, cuando la velocidad de fermentación es muy baja y al término del proceso fermentativo.

* Se ha observado que la medida protocolizada del potencial redox puede ser un útil instrumento para extraer información en la fermentación de la sidra, junto con las medidas analíticas clásicas, pudiendo establecerse correlación con ellas. La medida de este parámetro puede ser de interés en el lagar, en cuanto que proporciona información suplementaria al elaborador sobre el estado de la sidra en fermentación, advirtiéndole de los momentos en los que se producen cambios significativos en el proceso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) Beech, F.; Carr, J.G. Cider and perry. Alcoholic Beverages. (1977). Ed: Rose A.H.

Academic Press. London.

- (2) Blouin, J.; Peynaud, E. *Enología práctica*. Ed: Mundi-Prensa. (2003).
- (3) Chen-Guang, L.; Cguang, X.; Yen-Han, L.; Feng-Wu, B. Redox potencial control and applications in micro aerobic and anaerobic fermentations. *Biotechnology Advances* 31 (2013) 257-265.
- (4) Danilewicz, J Review of Oxidative Processes in Wine and Value of Reduction Potentials in Enology. *American Journal of Enology and Viticulture*. March. (2012). Vol 63 no. 1-10.
- (5) Fernández, M.; Luis Otaño, L.; Gerland, C.; Gómez, J. Estudios electroquímicos en mostos y vinos: Su medida en continuo en bodega. *Revista de Enología*. Nº 6 nov-dic (2008).
- (6) Gomis, D. B.; Gutiérrez, M.D.; Moran, M.J.; Moreno, J.; Dapena, E.; Cabranes, C.; Alonso, J.M. Analytical control of cider production by two technological methods. *J. Inst. BreW*. November- december, (1991), Vol. 97, pp. 453-456.
- (7) Herrero, M.; García, L.; Díaz M. Organic Acids in Cider with Simultaneous Inoculation of Yeasts and Malolactic Bacteria: Effect of Fermentation Temperature. Department of Chemical Engineering and Environmental Technology, University of Oviedo, Spain. *Journal of The Institute of Brewing*. Vol 105, No. 4, (1999).
- (8) Jackson, R.S. *Wine Science: Principles and Applications*. Ed: AP. (2014).
- (9) Moreno, J.; Peinado, R, *Enological Chemistry* Ed: Academic Press, (2012).
- (10) Pereda Rodríguez, M.A. *Elaboración de sidra natural ecológica. Guía básica para aficionados*. Ed: Mundi-Prensa. (2011).
- (11) R & D Laboratory, New Brunswick Scientific. *Using Redox Measurements to Control an Anaerobic Yeast Fermentation*. PO Box 4005, 44 Talmadge Road, Edison, NJ 08818-4005 USA.
- (12) Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. *Handbook of Enology: The Chemistry of Wine*. Ed: John Wiley and Sons Ltd. (2006).
- (13) Suárez, B.; Pando, R.; Fernández, N.; Querol, A.; Rodríguez, R. Yeasts species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiology* 34 (2007) 25.31. 16
- (14) Vivas, N.; Vivas de Gaulejac, N.; Khan, N. y Nonier, M. F. Principes et utilité de la mesure du potentiel d'oxydoréduction dans les vins. *Revista de enología científica y profesional* (2010).
- (15) Whiting, G.C. *Acetification in cides and perries*. University of Bristol. Long Ashton Research Station. Bristol BS18 9AF . (1973).
- (16) Yen-Han, L.; Wan-Shan C.; Kow-Jen, D. Correlations between reduction-oxidation potential profiles and growth patterns of *Saccharomyces cerevisiae* during very-high-gravity fermentation *Process Biochemistry*. Volume 45, Issue 5, May (2010), Pages 765-770.