



PRINCIPADO DE ASTURIAS

CONSEJERIA DE AGRICULTURA
Y PESCA

2 / 91

INFORMACIÓN TÉCNICA

***ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS
DE LA ELABORACIÓN DE SIDRA NATURAL EN
ASTURIAS***

ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DE LA ELABORACIÓN DE SIDRA NATURAL EN ASTURIAS. (1)

Carmen Cabranes

Javier Moreno

Juan J. Mangas

Centro de Experimentación Agraria. 33300 Villaviciosa. Asturias.

Resumen

A lo largo de dos campañas consecutivas, el equipo de la Unidad de Sidras del Centro de Experimentación Agraria de Villaviciosa ha realizado muestreos periódicos en distintos lagares de la región. Los resultados del trabajo ponen de manifiesto que la calidad de la sidra está estrechamente relacionada con la microbiología del proceso fermentativo y a su vez con la tecnología e higiene invertidas en el proceso de elaboración. Es, por tanto, clara la necesidad de un control microbiológico estricto que permita el seguimiento de aquellos parámetros bioquímicos con repercusión clara en las propiedades organolépticas. En la flora zimológica, [as diferencias más claras entre lagares se encontraron en los mostos, debido a la heterogeneidad de las levaduras poco fermentativas aportadas por la manzana y los utensilios de bodega.

La transformación maloláctica se ha mostrado como un fenómeno extendido en Sidra Natural Asturiana ya que tuvo lugar en todos los casos estudiados. Aunque en principio, el fenómeno parece favorable, no hay que perder de vista a sus responsables, las bacterias lácticas, ya que también son responsables de un gran número de alteraciones como el ahilado o «file»), picado láctico etc.

En todos los lagares se encontró una elevada proporción de flora acética que puede constituir una fuente de problemas para el productor. Finalmente, se ha detectado la existencia de picado láctico y acético en las sidras estudiadas, en especial, en la fase de maduración.

(1) Esta publicación es una versión divulgativa de la aparecida en la revista Alimentaria: abril, 1991. pp. 63-69.

Introducción

La actividad de los distintos grupos de microorganismos presentes en el transcurso de la fabricación de la sidra natural asturiana -levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas resulta hoy día incontrolada y prácticamente desconocida.

En el metabolismo fundamental de las levaduras, es decir, en la transformación de los azocares mayoritarios del mosto (fructosa, glucosa y sacarosa) en alcohol etílico y dióxido de carbono a través de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas, hay que tener en cuenta otros efectos adicionales como son la acumulación de ácido pirúvico que favorece a otros microorganismos, los cuales lo desvían a productos distintos del etanol y dióxido de carbono. Además, las levaduras son capaces de producir por rutas alterativas distintos ácidos orgánicos que van a variar la composición de la sidra. Entre los más destacables se encuentra el ácido málico que en ocasiones aparece en más de un 50% por acción de las levaduras), el láctico (tanto el isómero L(+)-Láctico como el D(-)-Láctico), succínico (la cantidad de ácido succínico producido se incrementa con el pH y con la fuente de nitrógeno), fumárico, derivados del ácido 2-5 hidroxibutírico y mono, di y trigalacturónico, producidos estos tres últimos como consecuencia de la ruptura de las pectinas. En fermentaciones libres se encontró (Beech & Davenport, 1970) que el 90% del incremento de la acidez no volátil se debía a la formación de ácido succínico y el 10% restante a ácido láctico.

La cantidad de alcoholes superiores en sidras varía con la composición de la flora de levaduras, con el tratamiento realizado al mosto y con [as condiciones de fermentación, así, por ejemplo, existe una estrecha relación entre el contenido de los alcoholes superiores, el nitrógeno y el pH; igualmente la presencia de partículas de pulpa en suspensión aumenta la concentración de alcoholes superiores. En cuanto a la temperatura, Beech (1972), sitúa el rango óptimo entre 15-25°C.

Así mismo, la levadura Kloeckera apiculata causa una depresión en la concentración de alcoholes superiores producidos por levaduras fermentativas del género Saccharomyces, e incrementa la concentración final de piruvato.

Las bacterias lácticas están adaptadas a vivir en las condiciones de anaerobiosis de la fermentación. Son microaerófilas, pueden utilizar azocares residuales y parecen ser capaces de establecer una estrecha competencia con las levaduras. Su actividad más relevante en el proceso de elaboración de la sidra natural es la denominada transformación maloláctica que consiste en la descarboxilación del ácido málico a ácido láctico, provocando una reducción de la acidez fija. Las bacterias lácticas heterofermentativas producen varios productos finales a partir de la glucosa, fundamentalmente ácido láctico, dióxido de carbono y alcohol etílico, aunque se puede formar ácido acético en vez de etanol si existe en el medio un aceptor de hidrógeno (picado láctico). La actividad maloláctica puede retardarse por acción de las levaduras y el grado de retardo depende de la levadura.

Ciertas especies de Lactobacillus homo y heterofermentativas y también unas pocas pertenecientes a Leuconostoc pueden metabolizar ácidos fenólicos, químico y siquímico.

Generalmente esto tiene lugar durante el almacenamiento, después de que el ácido málico ha sido transformado a ácido láctico.

Las bacterias lácticas son igualmente capaces de producir diacetilo, presentando la capacidad de reducirlo a acetoina, especialmente distintas especies de lactobacilos y cocos heterofermentativos, que utilizan el ácido pirúvico y el cítrico como sustratos. El tipo exacto de ácido producido por las bacterias lácticas depende entre otros factores del pH.

Podría parecer que debido al carácter fundamental mente aerobio de las bacterias acéticas, éstas no serían capaces de sobrevivir a las condiciones fuertemente anaerobias de la fermentación. Sin embargo, estos microorganismos se desarrollan antes de comenzar la fermentación y después permanecen hasta el cese de ésta para volver a multiplicarse en cuanto las condiciones lo permiten.

Si se crean las condiciones favorables para que crezcan las bacterias acéticas, éstas pueden convertir el sorbitol (azúcar-alcohol infermentable por levaduras y mayoritario en mosto de manzana), a sorbosa y eventualmente a 5-cetofructosa (Carr y Whiting, 1971). Son capaces de obtener también 5-ceto fructosa de forma cuantitativamente importante a partir del azúcar más abundante del mosto de manzana, la fructosa.

La actividad más conocida, sin embargo, de las bacterias acéticas es la de consumir etanol como fuente de energía produciendo acetaldehído y ácido acético (picado acético).

El objeto de este trabajo ha sido estudiar de un modo simultáneo y comparado determinados parámetros microbiológicos y bioquímicos a lo largo del proceso de fabricación de la Sidra Natural en diversos lagares del Principado de Asturias.

Material Métodos

Se tomaron muestras de tres lagares de la región durante dos campañas consecutivas, realizando el seguimiento de dos toneles de cada lagar. Las muestras se tomaron en ocho momentos que consideramos claves en el proceso de fabricación: 1- mosto al llenar el tonel, 2- después de la defecación, 3- en la fermentación tumultuosa, 4- al inicio de la fermentación lenta, 5- final de la fermentación lenta, 6- transformación maloláctica, 7- maduración, 8- tres meses después de efectuarse el embotellado.

Análisis microbiológico: la valoración cuantitativa de cada uno de los tres microorganismos se realiza mediante diluciones decimales seriadas en agua de peptona y posterior siembra en medios selectivos.

Para los recuentos de levaduras se utiliza el medio de Wickerham (Wickerham, 1951), al que se le añadió 25 ppm de penicilina y 100 ppm de estreptomina. El periodo de incubación de las placas fue de 48-72 horas.

Para las bacterias lácticas se utiliza medio base de zumo de manzana con diversas sales minerales y factores de crecimiento. Se suplementa con 50 ppm de pimaricina. Las placas se incubaron en jarras de anaerobiosis durante 5 días.

En el caso de las bacterias acéticas se emplea medio base de zumo de manzana, extracto de levadura y agar a pH 4.8. A este medio se le suplementa con 50 ppm de pimaricina y 25 ppm de penicilina. Las placas se incubaron de 3-5 días.

En todos los casos la temperatura de incubación fue de 28°C. Los recuentos se realizaron por duplicado en aquellas placas en las que se observa el crecimiento de un n° de UFC/ml estadísticamente aceptable (30-300), multiplicando posteriormente este número por el factor de dilución.

Las levaduras fueron identificadas siguiendo los esquemas y procedimientos de Kreger-Van Rij (Kreger-Van Rij, 1984). Estos se basan en caracteres morfológicos, bioquímicos y reproductivos (reproducción sexual y asexual).

Las bacterias lácticas se identificaron utilizando el método comercial Api 50 CHL para los ensayos de comportamiento frente a distintos compuestos de carbono, así como por sus características morfológicas y su comportamiento homo-heterofermentativo.

Por último, las bacterias acéticas se identificaron empleando los criterios del Bergey's Manual (Ley y col., 1984).

Análisis de parámetros físico-químicos: La determinación del grado alcohólico, la densidad, la acidez total y la acidez volátil se realiza según los métodos oficiales del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (1986).

Las determinaciones de los ácidos acético, málico, L-láctico y D-láctico se llevó a cabo utilizando las pruebas enzimáticas de Boehringer Mannheim (Bergmryer, 1974).

Resultados y discusión

En el primer año (campana 87-88) se tomaron muestras de tres lagares colaboradores, en la campana 88-89 (segundo año) se repitieron los muestreos en los tres lagares del año anterior y se introdujo uno nuevo.

Es lógico observar en las gráficas (figura 1) una estrecha relación entre las curvas de evolución del grado alcohólico y la población de levaduras. El incremento alcohólico más espectacular, es decir, la pendiente más pronunciada, coincide con el tiempo en que las levaduras se encuentran en su fase de crecimiento exponencial. Dependiendo del momento en que se haya realizado el primer muestreo en el lagar esta pendiente se observa más o menos clara en la curva. Posteriormente el incremento alcohólico se ralentiza coincidiendo con la fase estacionaria de las levaduras hasta que la pendiente de la curva llega a ser prácticamente cero (se observa como

es casi paralela al eje de abscisas). La fase estacionaria de la población levaduriforme puede ser provocada tanto por la acumulación de productos inhibitorios (ácido octanoico, hexanoico y dcanoico) como por la deficiencia en sustratos catabolizables; ahora bien, las fuentes de carbono no suelen resultar limitantes en sidra natural.

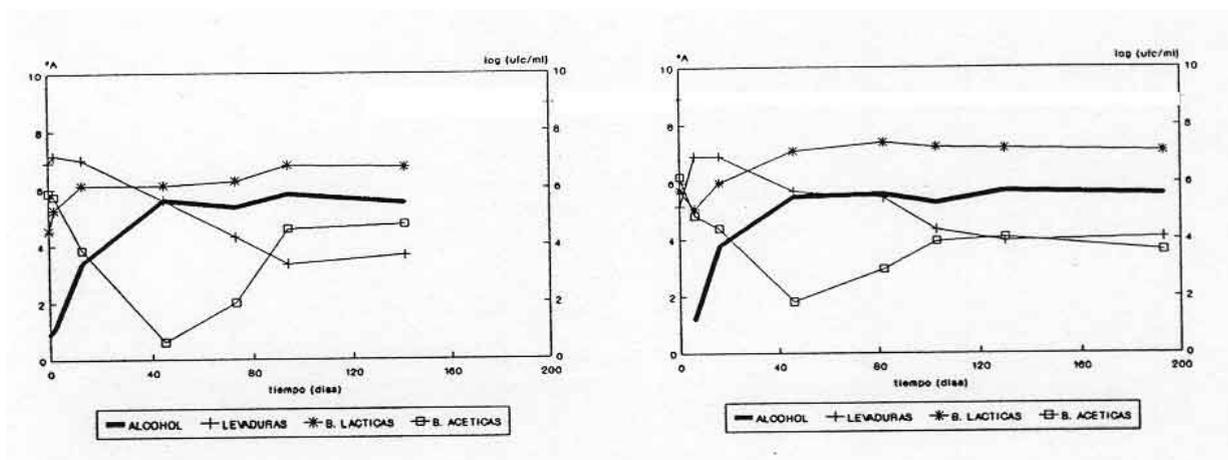


Figura 1. Evolución del grado alcohólico y de las distintas poblaciones de microorganismos a lo largo del proceso de elaboración de Sidra Natural Asturiana.

En la figura 1 observamos una ligera depresión en la curva del grado alcohólico que coincide con una proliferación espectacular de las bacterias acéticas. Podemos explicar esta observación teniendo en cuenta que el metabolismo de estas bacterias, fundamentalmente aerobias, incluye una ruta en la que se consume etanol como fuente de energía, rindiendo acetaldehído y ácido acético. Por lo tanto, con una elevada proliferación de estos microorganismos se puede explicar una disminución del contenido alcohólico, al ser consumido éste en favor de otros

En la figura 2 observamos como la densidad, parámetro que nos sirve como indicador de la concentración de azúcares a lo largo del proceso de fabricación, sufre un descenso paulatino, lo que es lógico, si tenemos en cuenta que los azúcares constituyen la fuente fundamental de carbono para los microorganismos presentes en el mosto. Básicamente son consumidos por las levaduras, pero no hay que desdeñar la actuación de las bacterias lácticas que son capaces de transformar éstos, eliminando azúcares residuales, para dar como producto mayoritario ácido láctico. Por esta razón, la evolución de la densidad, aunque de gran interés tecnológico por darnos una idea del estado global del producto, no nos proporciona un conocimiento detallado de lo que realmente ocurre en los distintos momentos de muestreo.

Cuando la fermentación ha cesado, la sidra está en condiciones de ser almacenada y se dice entonces que está «seca» ya que se supone que no queda azúcar, aunque esto no es estrictamente cierto, ya que existen determinados azúcares y derivados de éstos que no son metabolizados por las levaduras y que permanecen en la sidra. Hay incluso trazas de glucosa y de fructosa que desaparecen durante el almacenamiento debido probablemente a la actividad de las bacterias lácticas durante esta fase. Trazas de azúcares como arabinosa, xilosa, inositol y glicerol pueden actuar como fuente de energía para las bacterias lácticas durante el almacenamiento.

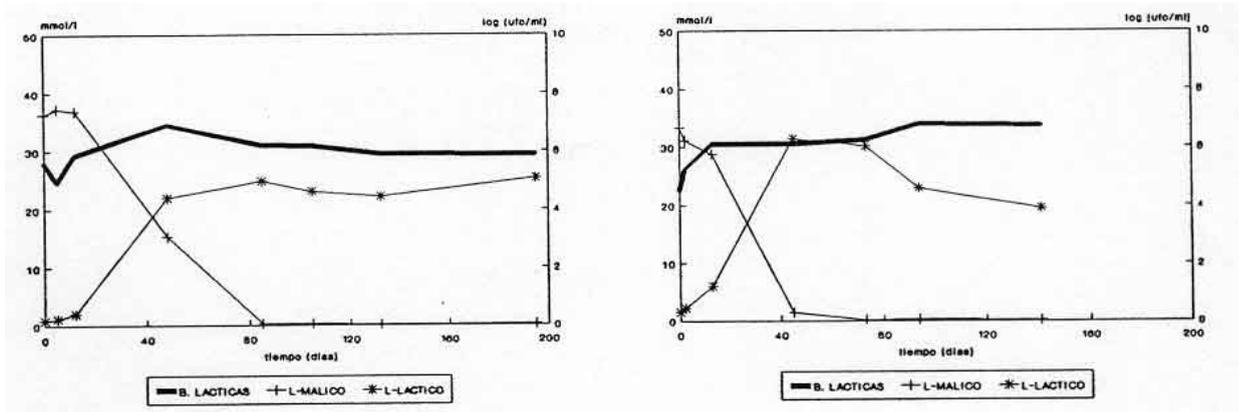


Figura 2. Evolución de la densidad, levaduras y bacterias lácticas en Sidra Natural Asturiana.

Las curvas de evolución de la población de bacterias lácticas y de las concentraciones de los ácidos láctico y málico deben estudiarse de forma comparada. Ahora bien, en la figura 3 observamos la forma de las curvas de evolución de los ácido milico y láctico; las dos curvas tienen pendientes opuestas y es fácil comprobar que, como apunta la bibliografía, el segundo se forma a expensas de la degradación del primero. No debemos olvidar que, como señalábamos anteriormente, no todo el L-Láctico detectado por nuestros análisis al final del proceso procederá de esta ruta metabólica, sino que también puede ser consecuencia de la degradación de azúcares o incluso, algunos isómeros de este ácido son producidos por cepas de levaduras o incluso por el metabolismo de las bacterias acéticas.

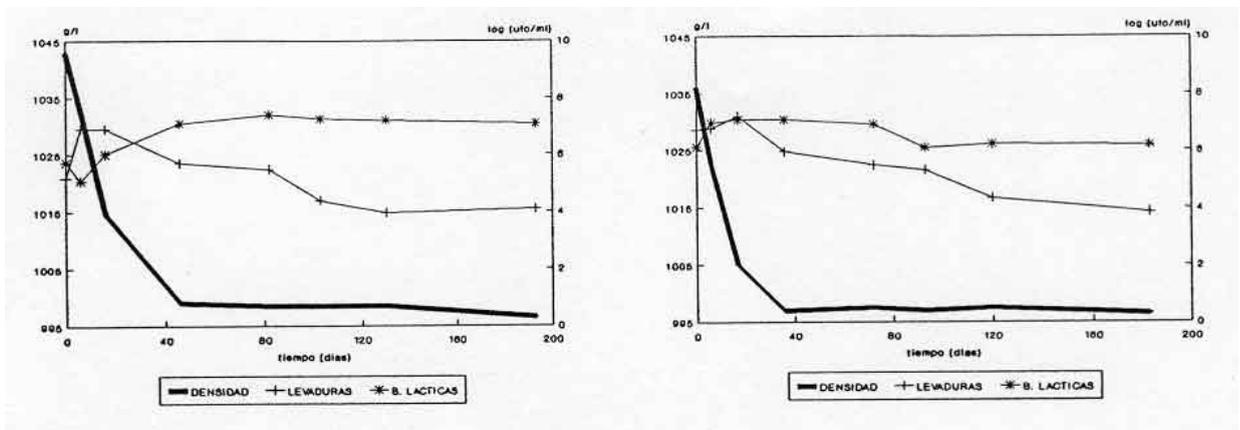


Figura 3. Transformación del ácido málico en ácido láctico por parte de las bacterias lácticas.

Si nos fijamos en la representación de las poblaciones de los tres grupos de microorganismos presentes en la sidra, comprobamos como el crecimiento exponencial de las bacterias lácticas, y por lo tanto, la transformación maloláctica, no tiene lugar en ninguno de los casos estudiados hasta que las levaduras han entrado en fase estacionaria. Los niveles de bacterias lácticas, tal como

observamos en las gráficas, deben situarse sobre 10^6 - 10^7 para que la transformación maloláctica tenga lugar.

Aunque tanto las bacterias lácticas como las levaduras son capaces de vivir en condiciones de anaerobiosis, el metabolismo elevadamente fermentativo de Saccharomyces cerevisiae se impone claramente hasta que han sido consumidas las fuentes de carbono mayoritarias. Existen varios trabajos sobre problemas de inhibición e interacción entre levaduras y bacterias lácticas, de los que cabe citar a Lemaesquier (1987), quien señala que las levaduras pueden inhibir o estimular el crecimiento bacteriano, dependiendo entre otros factores de las concentraciones de determinados sustratos.

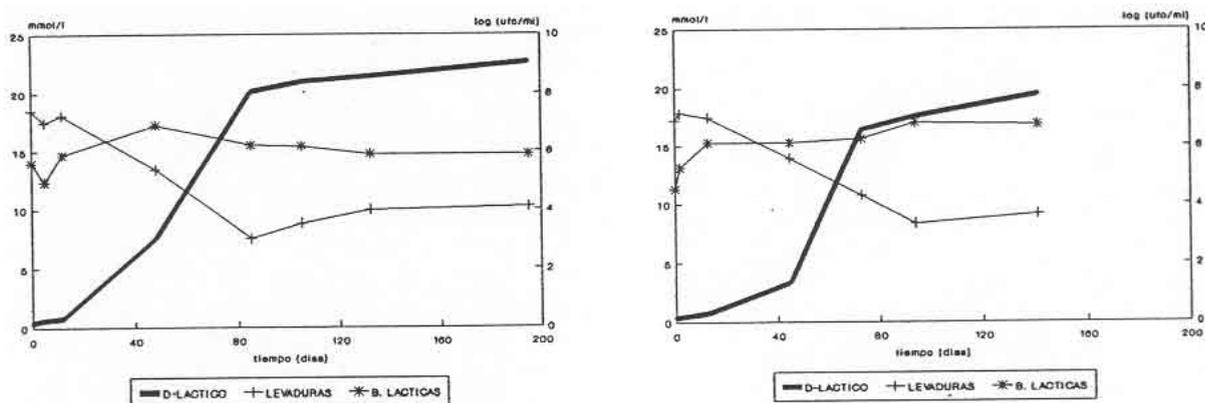


Figura 4. Levaduras y bacterias lácticas frente a concentraciones de D-láctico a lo largo del proceso de elaboración de Sidra Natural en Asturias.

De los análisis realizados en los distintos lagares de la región durante dos campañas consecutivas podemos concluir que la transformación maloláctica es un fenómeno extendido en sidras asturianas y que tuvo lugar en todos los casos estudiados por nuestro equipo.

Aunque discutido, el fenómeno de la transformación maloláctica es considerado como positivo para las cualidades organolépticas del producto ya que el ácido láctico es considerablemente más débil que el ácido málico, con la consiguiente reducción de la acidez total. No obstante, y debido al gran número de alteraciones sidricolas del que son origen este grupo bacteriano (picado láctico, ahilado o file, olores desagradables...) su papel en la manufactura sidrícola es muy controvertido.

La acidez volátil de una sidra es debida fundamentalmente al ácido acético y, este se debe en parte, al metabolismo de las bacterias acéticas aunque también es producido por las bacterias lácticas denominadas heterofermentativas, por ejemplo Leuconostoc y determinadas especies de Lactobacillus. En las figuras 4 y 5 se puede observar como el incremento de la acidez volátil, en algunos de los lagares estudiados, se produce paralelamente al aumento del contenido de D (-) lactato, (figura 5), y además la acumulación de éste es concomitante con la mayor concentración detectada a lo largo de la fermentación de las bacterias lácticas, (figura 4), lo cual indica que en este caso parte de la acidez volátil acumulada es debida a un picado láctico. Por otro lado, parte

del D (-) lactato acumulado puede ser el resultado del metabolismo de algunas cepas de levaduras. Los valores más elevados de Ácido acético se comprueban al final de la curva, ya que su efecto es acumulativo, aunque puede ser degradado nuevamente en pequeña proporción por las bacterias acéticas (Figura 5).

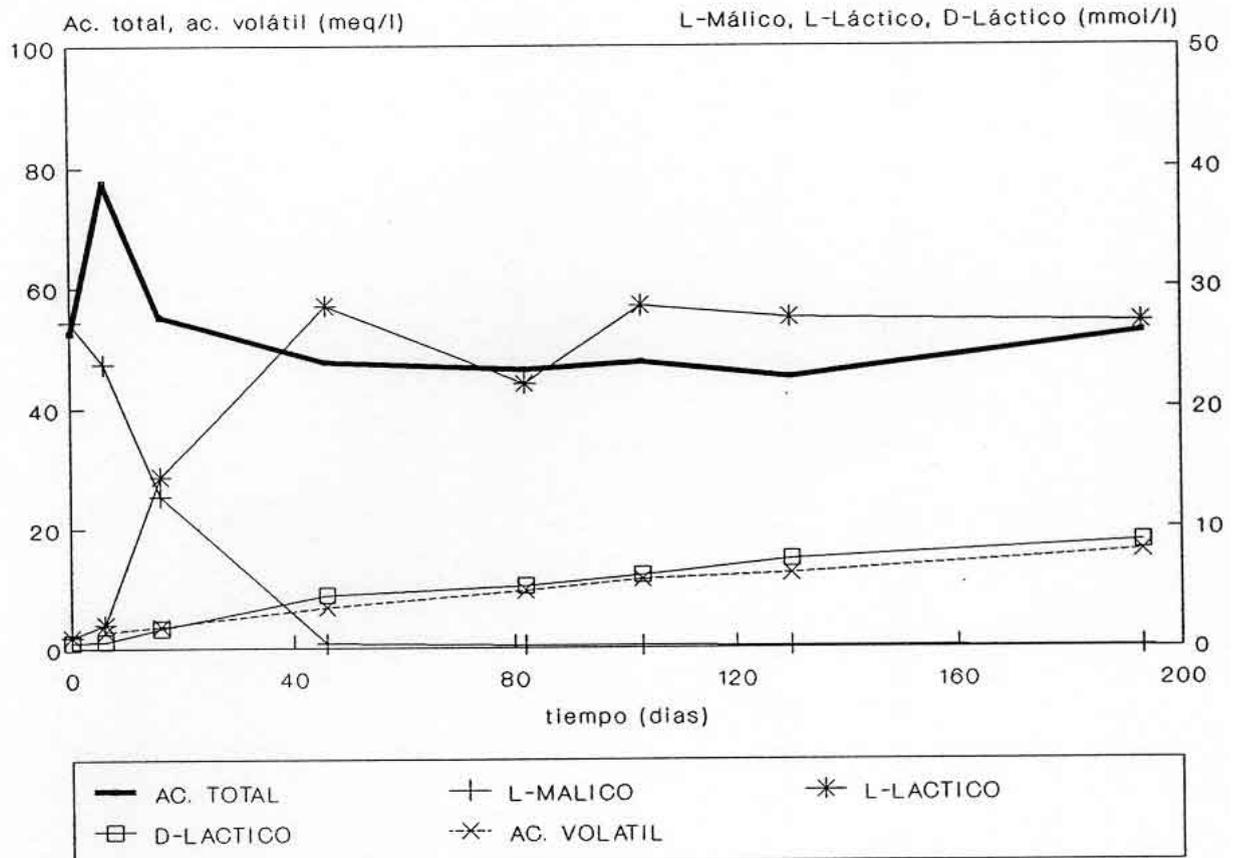


Figura 5. Valores de acidez en distintos momentos del proceso de elaboración de Sidra Natural.

En cuanto a la acidez total, ésta puede ser incrementada por el metabolismo de prácticamente todos los microorganismos, incluso de [as levaduras, que entre otros pueden producir cantidades relativamente importantes de Ácido succínico.

Respecto a la evolución de la flora zoológica y bacteriana, los niveles de partida de las levaduras oscilan entre 10^1 - 10^6 los valores de estos microorganismos se elevan paulatinamente hasta llegar a incrementarse en una o dos unidades decimales en la fermentación tumultuosa, momento álgido para las levaduras. Posteriormente, a medida que consumen la glucosa y la fructosa presente en el mosto y aumentan las concentraciones de compuestos inhibitorios, las levaduras comienzan a dividirse con una tasa inferior llegando a descender su población hasta niveles que oscilan en la fase de almacenamiento de 10^1 - 10^3 , en cuyo momento la actividad de las levaduras es prácticamente de latencia. Respecto a aspectos cualitativos hemos de destacar que en todos los lagares se ha aislado una levadura característica de la primera fase y ampliamente

citada por la bibliografía: Kloeckera apiculata, discutida por los distintos autores (Schanderl, 1957 por su polémica influencia en las características organolépticas, fundamentalmente en lo que se refiere a la producción de esteres de gran

importancia para las características organolépticas de la sidra, entre los que cabe destacar el butirato de etilo que se produce en gran cantidad y el acetato de etilo que alcanza concentraciones menores. Consecuentemente, su control y estudio parece de gran interés. El estudio perfecto (esporulado) de esta levadura (Hanseniaspora uvarum) se caracteriza por producir acetato de etilo en grandes cantidades, lo que proporciona a la sidra aroma de sidra acetificada sin aumentar los valores de acidez volátil.

Como era esperable también encontramos en todos los lagares la levadura fermentativa Saccharomyces cerevisae aunque existen diferencias en cuanto a las razas identificadas según los criterios de Kreger- Van Rij (Figura 6).

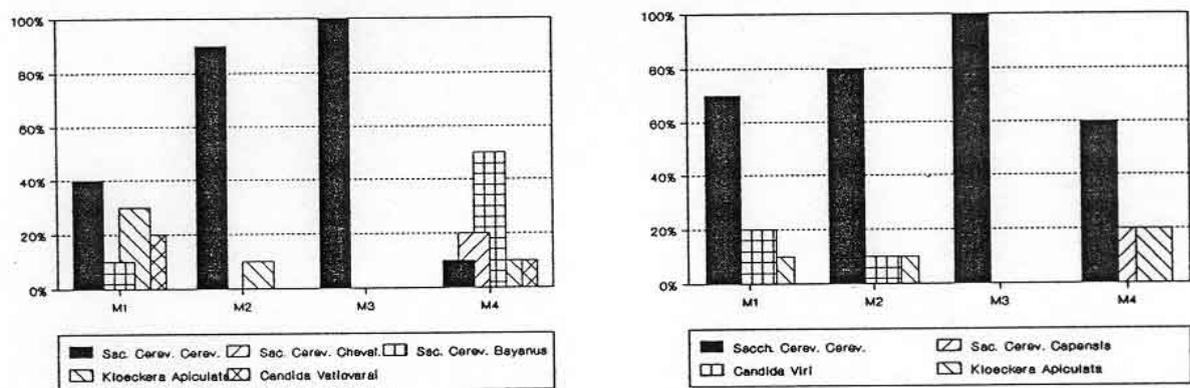


Figura 6. Diferencias en la representación específica de levaduras en dos lagares asturianos. M1-Mosto; M2-fermentación tumultuosa; M3-Transformación maloláctica; M4-Maduración.

Los productos fundamentales del metabolismo de las levaduras del género Saccharomyces son el etanol y el dióxido de carbono. Se encontró que producía los valores más altos de etanol y el menor incremento de acidez volátil. Según los últimos criterios taxonómicos (Kreger- Van Rij, 1984) se agrupan mayoritariamente en la especie Saccharomyces cerevisae, ahora bien en esta especie se distinguen distintas razas: cerevisae, bayanus, steineri, uvarum, carlbergensis ...todas ellas presentan diferencias respecto a la fermentación de distintos azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa, lactosa, rafinosa...) y presentan también un comportamiento distinto respecto a la producción de compuestos volátiles (fundamentales para el olor, aroma y sabor de la sidra), no sólo entre las distintas razas, si no incluso entre distintas cepas de la misma raza, lo que explica que la sidra de cada productor sea diferente dependiendo de la cepa o cepas que dominen la fermentación y que son específicas de la bodega, actuando de forma espontánea e incontrolada. Algunas cepas de Saccharomyces producen sulfhídrico como producto de su metabolismo. Este producto es altamente objetable desde el punto de vista de calidad sidrícola. Otras en cambio pueden producir dióxido de azufre que presenta poder antiséptico.

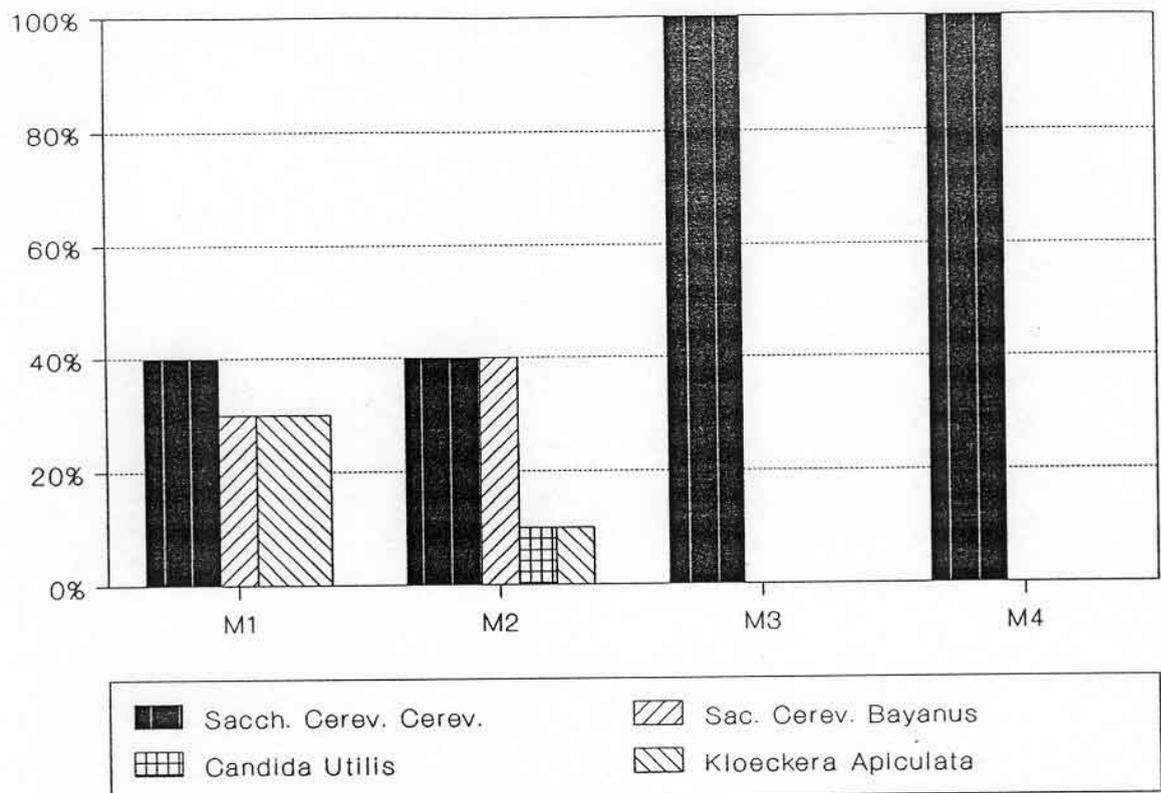


Figura 7. Composición de la flora zimológica en distintos momentos de la elaboración de Sidra Natural.

Las mayores diferencias entre lagares se refieren a la composición de los mostos (Figuras 6 y 7), ya que las levaduras de carácter poco fermentativo u oxidativa son distintas para cada lagar. Así, en esta primera etapa encontramos especies de la levadura oxidativa Candida: Candida vinni, Candida vartiovarai, Brettanomyces naardenensis y Pichia membranaefaciens.

Debido a que la especie Saccharomyces cerevisae es aportada fundamentalmente por los utensilios de bodega (prensa, molino, etc.) la fermentación tumultuosa resulta paradójicamente más violenta en los lagares que en plantas piloto con un régimen de limpieza más estricto, estos resultados ya habían sido señalados anteriormente en sidras inglesas (Beech, 1972). Pero también esta misma falta de higiene supone un elevado riesgo de contaminación no deseada que puede echar a perder el contenido de una pipa.

Una especie concreta, Schizosaccharomyces pombe, es capaz de realizar la transformación maloalcohólica, que consiste en degradar el ácido málico (mayoritario en la composición del mosto) para rendir etanol y dióxido de carbono. Esta especie, de interesantes perspectivas tecnológicas, no ha sido aislada hasta el momento en Sidras Naturales de Asturias.

Es también reseñable la ausencia en los lagares asturianos de una levadura señalada por algunos autores como importante contaminante de bodega. (Beech y Carr, 1977): Saccharomyces

ludwigii; otro tanto ocurre con otra especie de características parecidas, Saccharomyces acidifaciens, ninguna de las cuales se encontró en la totalidad de los aislamientos realizados.

Por lo que se refiere a las bacterias lácticas, sus niveles de población en el mosto son en todos los lagares de dos unidades decimales inferiores a los valores de la población de levaduras, sus niveles se incrementan paulatinamente y observamos que, como habíamos señalado anteriormente, no alcanzan sus valores máximos hasta que la población de levaduras entra en su fase estacionaria. La especie más frecuentemente identificada fue Leuconostoc oenos, seguida de Lactobacillus brevis con una representación marginal del género Pediococcus. En la actualidad aun no está claro cual de estas especies es fundamentalmente responsable de la transformación maloláctica o si bien todas ellas tienen una capacidad equivalente para realizarla.

En cuanto a las bacterias acéticas sus niveles en el mosto oscilan entre 10^1 - 10^6 , en este momento se ve favorecido su crecimiento por las condiciones de aireación del medio, aunque posteriormente, cuando la atmósfera adquiere características más reductoras, se mantienen. Ha sido señalado por distintos autores su posible crecimiento en condiciones anaerobias, para sufrir en ocasiones, según observamos en las curvas, un posterior aumento en el momento del embotellado ya que éste puede implicar un cierto grado de aireación.

En las primeras etapas, el género que se aísla mayoritariamente es Gluconobacter, en las últimas etapas, por el contrario, es Acetobacter el género que se aísla de forma mayoritaria.

La explicación de esta distribución temporal de los géneros se encuentra con facilidad si tenemos en cuenta la especial habilidad de Gluconobacter para degradar la glucosa que, como es lógico, se encuentra en concentraciones más elevadas en las primeras etapas.

Conclusiones

1- El control de los parámetros bioquímicos que tienen repercusión en las cualidades organolépticas de la sidra pasa por un seguimiento directo de la flora microbiológica espontánea de mostos y sidras.

2- En el caso de las levaduras, habría que conseguir la eliminación, o al menos, una reducción de la población de levaduras oxidativas, ya que juegan un polémico papel en el proceso fermentativo, pudiendo constituir un importante foco de infección.

3- Esta reducción implica una cuidada manipulación del fruto, eliminando las manzanas dañadas y lavando cuidadosamente el resto, con el objeto de eliminar la flora salvaje superficial que se encuentra en la epidermis.

4- Por el contrario, es interesante potenciar el crecimiento de las cepas más fermentativas de Saccharomyces cerevisiae. En este sentido se está llevando a cabo una selección, mediante fermentaciones controladas en nuestros laboratorios, para su posterior uso en fermentaciones a mayor escala.

5- Las mismas condiciones de higiene que se han apuntado para el control de las levaduras oxidativas, surtirán efecto sobre las bacterias acéticas, cuya población se demostró demasiado elevada en varios de los lagares estudiados.

6- La transformación maloláctica tuvo lugar en todas las sidras analizadas. Este fenómeno repercute, sin duda, en la suavidad del producto. Hay que tener cuidado, sin embargo, ya que el mismo grupo de agentes responsables de esta transformación puede causar importantes alteraciones como el ahilado o «file», picado láctico, etc.

7- Hay que destacar como fenómenos frecuentes durante la maduración el picado láctico y acético. Ambas alteraciones van en detrimento de la calidad del producto, y como consecuencia, del rendimiento económico para el productor.

Bibliografía

BEECH, F.W.1972. Cider making and cider research: a review. J.Inst. Brew. 78:477-491.

BEECH,F.W. and CARR,J.G.,1977. Cider and perry p.179-183. In A.H.Rose (ed.), Economic microbiology, vol.1. Academic Press. London.

BERGENMEYER,H.V., 1974. Methoden der enzymatischen analyse. Tomo 3 pp1127-1131.

CARR, J.G.1958. Antonie Van Leeuwenhoek. 24:63.

CARR, J.G.; DAVIES, P.A.1970. Homofermentative lactobacilli of cider including Lactobacillus mali. J.Applied Bacteriology. 33:768.

CARR, J.G.; WHITING, G.C. 1971. Microbial aspects of production and spoilage of cider. J.Applied Bacteriology. 34:181-193.

CARR, J.G.; DAVIES, P.A. 1972. Journal of Applied Bacteriology. 35:463.

CARR, J.G. 1983. Microbes I have Known: a study of those associated with fermented products. J. Appl. Bacteriology. 55:383-401.

DE LEY, J.; GILLIS, M.; SWING, J. 1984. Acetobacteraceae. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins. Baltimore.

FOURNIER,H.; CHARBONNEAU,R.; GAGNON, M.; DUBOIS, G. 1981. L'effect desacidifiant de Schizosaccharomyces aombe sur le cidre du Quebec. Sciences des Aliments.1:19-25.

KREGER- VAN RIJ. 1984. The Yeast: a taxonomyc study. Elsevier Science Publisher. B.V.Amsterdam.

LEMARESQUIER,H. 1987. Interactions levures-bacterias. R.F.O.E. 109.

MAPA.1986. Métodos oficiales del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.

SCHANDERL, 1957. In Yeast. W. Roman. pp.: 127-139.

TAILLANDIER, P.; RIBA, J.P. 1988. Malate utilization by Schizosaccharomyces pombe. Biotechnology letters 10:469-472.

THOUKIS,G.; UEDA,M.; WRIGHT,D. 1965. Am. J. Enol. Vitic. 16:1-8.

WHITING, G.C.; COGGINS, R.A. 1960. Nature. 185:843-844.

WHITING, G.C. 1973. Journal of the Institute of Brewing, 79:218.

WICKERHAM, 1951. Taxonomy of yeasts. Tech. Bull. 1029 U.S. Dept. Agric. Washington.

ZYL, [J.A. van. 1962. Tech. Serv. Sci. Bull](#) 381. Vitic 1:44.

ZYL, J.A. van.; VRIES, M.J.; ZEEMAN, A.S. 1963. S. Afr. J. Agric. Sci. 6:165-180.

