



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y COMPORTAMIENTO DE
MICROORGANISMOS ACIDÚRICOS EN UNA BEBIDA ÁCIDA
ENVASADA EN FRÍO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

OBDULIA ESTRADA URBANO

DIRECTOR DE TESIS: DR. JAVIER CASTRO ROSAS

PACHUCA DE SOTO, HGO. MAYO DE 2009

QA
QUÍMICA EN ALIMENTOS



El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo bajo la dirección del Dr. Javier Castro Rosas.

DEDICATORIA

A DIOS

A ti mi DIOS porque siempre me has dado la fortaleza para salir adelante a pesar de todos los obstáculos, y por permitir que mi madre pueda ver convertido en realidad este gran logro.

A MI MADRE

A mi Madre, Catalina Urbano Reyes dedicó este trabajo, quien sin escatimar esfuerzo alguno has sacrificado gran parte de tu vida para formarme y educarme. Quien la ilusión de su vida ha sido convertirme en una persona de provecho. A quien nunca podré pagarle todos sus desvelos ni aún con las riquezas más grandes del mundo. Para quién su forma de luchar fue mi ideal, su sacrificio mi aliento y su esfuerzo constante, la fuerza de mi voluntad. Con amor, admiración y respeto.

*A quien fuera mi padre, Ángel Estrada, a quien como un buen hombre, no sólo me dio de comer un pescado al día sino me enseñó a pescar...
Siempre se lo agradeceré...*

“AGRADECIMIENTOS”

A DIOS por haberme dado el don maravilloso de la vida y por este destino que elegiste para mi señor, que con gusto y dicha lo vivo, por la fuerza de voluntad que has puesto en mí para salir adelante a pesar de todo y lograr culminar mi carrera profesional.

A mi MADRE por tu gran ejemplo de mujer, porque aunque estuviste sola en el camino de formarnos a mi hermano y a mí, siempre me enseñaste a salir adelante, a pesar de nuestras carencias económicas, a luchar frente a las adversidades, me enseñaste que la preparación educativa es una de las mejores formas con la cual se puede anhelar un futuro mejor.

Al Dr. JAVIER por enseñarme el gusto por la microbiología, por su gran apoyo en la realización de esta tesis, por la paciencia en la enseñanza de las técnicas de microbiología y por creer en mí al asignarme la realización de este proyecto.

A mis sinodales por su tiempo, trabajo y esfuerzo en revisar la escritura de la presente tesis.

A mi amiga y compañera Evelyn por su gran amistad incondicional y por compartir momentos buenos y malos a lo largo de nuestra carrera universitaria.

A mis compañeros de laboratorio (Alejandro, Luis Miguel, Alonso, Maribel, Aidé) gracias por compartir y enseñarme parte de sus conocimientos de microbiología, además por su gran compañerismo, gracias...

A mis compañeras y amigas (Luz Yari, Adriana, Delia, Jessica) por compartir esta gran faceta de vida y tantas alegrías como tristezas a lo largo de nuestra carrera universitaria, pero sobre todo por brindarme incondicionalmente su amistad.

A toda mi familia porque con sus consejos y un granito de arena al apoyarme ayudaron a que culminaré un gran sueño.

A mis padrinos (Fernando, Fabiana, Raquel, Rafael) gracias porque a través de sus consejos, logré forjar un camino, guiarme, alentarme ante los obstáculos que se me presentaron para lograr el éxito en mi superación como profesional, por su gran apoyo moral, muchas gracias...

A ti Yobani por estar a mi lado gran parte de mi carrera universitaria, porque me entendiste en esos momentos de desánimo y flaqueza, porque me escuchaste cada uno de esos fines de semana en los que desesperada te platicaba mis tribulaciones, gracias por tu gran amor porque me motivo aun más... mil gracias.

A ti hermano, por compartir esfuerzos en la culminación de nuestras metas.

INDICE

	Pág
Índice de tablas.....	i
Índice de diagramas	i
Índice de figuras.....	ii
I.-INTRODUCCIÓN	1
II.-ANTECEDENTES	3
2.1 Bebidas.....	3
2.2 Tipos de bebidas refrescantes.....	4
2.2.1 Bebidas carbonatadas.....	5
2.2.2 Bebidas refrescantes no carbonatadas.....	6
2.2.3 Bebidas de jugo de fruta.....	7
2.2.3.1 Jugo de fruta.....	8
2.2.4 Bebida de extractos.....	9
2.2.5 Bebida tipo néctar de fruta.....	10
2.2.6 Bebida de hortalizas.....	11
2.2.7 Bebidas deportivas, bebidas enriquecidas y nutracéuticas.....	11
2.2.8 Bebidas bajas en calorías: bebidas Light y bebidas para diabéticos.....	14
2.3 Principios de su formulación.....	15
2.3.1 Agua.....	15
2.3.2 Preparación del jarabe de azúcar.....	17
2.3.3 Aromatización.....	17
2.3.4 Edulcorantes.....	18
2.3.5 Acidulantes.....	20
2.3.6 Colorantes.....	20
2.3.7 Conservadores.....	22
2.3.8 El proceso de envasado en frío.....	24
2.4 Microbiología de las bebidas refrescantes.....	26
2.4.1 Características microbiológicas de bebidas.....	27
2.4.2 Microbiología de las bebidas a base de extractos naturales.....	27
2.4.3 Microbiología de los jugos de fruta y verduras y las bebidas a base de frutas.....	28
2.4.4 Microbiología de los jarabes.....	29
2.4.5 Microbiología de las bebidas dietéticas.....	29
2.4.6 Microflora de las bebidas refrescantes no fermentadas.....	29
2.4.6.1 Microbiología de los agentes típicos de alteración.....	30
2.4.6.2 Características de los microorganismos deterioradores.....	31

2.4.6.3	Microorganismos sin efecto deteriorador.....	31
2.4.7	Alteraciones en las bebidas por efecto de los microorganismos....	32
2.4.7.1	Modificaciones del aspecto.....	32
2.4.7.2	Aumento de la presión de los envases.....	33
2.4.7.3	Modificaciones del aroma.....	33
2.4.8	Control microbiológico de bebidas refrescantes.....	33
2.4.8.1	Prevención de las alteraciones.....	34
2.4.8.2	Reducción de la contaminación.....	34
2.4.8.3	Inhibición de la multiplicación de los microorganismos presentes..	36
2.4.9	Tipo de microorganismos acidófilos.....	38
2.4.10	Tipos de microorganismos acidófilos que se pueden encontrar en bebidas ácidas.....	38
 III.-OBJETIVOS.....		41
3.1	Objetivo general.....	41
3.2	Objetivos específicos.....	41
 IV.-METODOLOGÍA.....		42
4.1	Equipo y Materiales.....	42
4.2	Medios de cultivo.....	42
4.3	Muestras.....	43
4.4	Aislamiento e identificación de microorganismos a partir de la bebida envasada en frío.....	43
4.4.1	Recuento de microorganismos.....	44
4.4.2	Identificación de microorganismos.....	44
4.4.3	Comportamiento de los microorganismos acidúricos en la bebida a diferentes temperaturas: 15°C, 22°C, 32°C, y 35°C.....	46
 V.- RESULTADOS Y DISCUSIONES.....		47
 VI.- CONCLUSIONES.....		61
 VII.-BIBLIOGRAFÍA.....		62

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1) Tipo de acidulantes y aplicación en bebidas refrescantes	21
2) Conservadores y aplicación en bebidas refrescantes	23
3) Microorganismos aislados e identificados en las botellas de bebida.	47

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Tabla	Página
1) Elaboración de bebidas refrescantes	16

INDICE DE FIGURAS

Figuras	Página
1) Comportamiento de tres microorganismos acidúricos en la bebida ácida a 15°C.	51
2) Comportamiento de tres microorganismos acidúricos en la bebida ácida a 22 °C.	53
3) Comportamiento de tres microorganismos acidúricos en la bebida ácida a 32°C	55
4) Comportamiento de tres microorganismos acidúricos en la bebida ácida a 35°C	57

I. INTRODUCCIÓN

Los alimentos son la principal fuente de energía del ser humano; sin embargo el deterioro de los tales es un problema importante en todas las sociedades. Esto puede ocurrir en cualquier punto de la cadena de producción, transporte, conservación o preparación de un alimento. El deterioro causado por agentes microbianos es el más frecuente. En los productos de alta acidez el principal agente protector es el pH el cual evita la proliferación microbiana. Sin embargo, fallas en el cierre del envase, empleo de materias primas de mala calidad o contaminación por el equipo, son factores que favorecen la llegada de microorganismos deterioradores favoreciendo así el deterioro de los alimentos.

Actualmente, en el mercado existe una diversidad de presentaciones a las cuales tienen fácil acceso los consumidores. Es posible encontrar en el mercado diferentes tipos de bebidas no alcohólicas, desde botellas solo con agua, bebidas con frutas o verduras, hasta bebidas elaboradas con colorantes y saborizantes artificiales. No obstante, a excepción del agua pura, independientemente, de la composición, todas estas bebidas en algún momento determinado comienzan a deteriorarse hasta llegar a la descomposición.

Es una práctica inadmisibles no contar o no atender con seriedad un programa completo de sanidad de la planta, argumentando que el alimento va a ser objeto de un tratamiento que inactive microorganismos, la pasteurización, por ejemplo. No obstante, no hay que olvidar que para el caso de la pasteurización los parámetros de tiempo-temperatura han sido calculados para una población

microbiana que razonablemente puede ocurrir en el producto, previo a la esterilización. Si tal población excede esos niveles, se incrementa la probabilidad de sobrevivencia. Una situación semejante esta considerada para todos los tratamientos antimicrobianos empleados para conservar los alimentos.

Una empresa productora de bebidas presentó un problema de contaminación de uno de sus productos; tal empresa se acercó a la UAEH para solicitarle apoyo con la finalidad de resolver dicho problema.

En este trabajo se llevó a cabo el aislamiento, identificación, cuantificación y evaluación del comportamiento, de microorganismos acidúricos detectados en bebidas ácidas envasadas en frío producida por una empresa, radicada en el Estado de México; esto con la finalidad de rastrear la fuente recontaminación de tales microorganismos y encontrar alternativas para su prevención y control en la bebida.

II. ANTECEDENTES

2.1 Bebidas

Aunque el agua es esencial para el hombre, el agua corriente no constituye una manera muy popular de consumirla. Beber agua en forma de agua mineral o con hielo puede hacerla más aceptable para algunas personas, pero la gran mayoría de la gente prefieren tomar agua en forma de una bebida con sabor, generalmente una bebida no alcohólica, un jugo de frutas o un refresco. Es muy probable que dichas bebidas sean más apreciadas por su sabor o efecto estimulante, que por su valor nutritivo, a pesar de que la mayor parte de los jugos de fruta constituyen una buena fuente de vitamina C. Las bebidas no alcohólicas proporcionan agua y en general azúcar en forma de una bebida de sabor agradable. Excepto por el azúcar que proveen, su valor nutritivo es nulo (Fox y Cameron, 2006).

Los jugos de frutas tropicales son los recién llegados al mercado de bebidas a base de frutas. A excepción del jugo de piña que comenzó a comercializarse desde 1932, la comercialización de los demás jugos tropicales ha sido mucho más reciente en todo el mundo, pero principalmente en Europa y Norteamérica. La expansión de la demanda fue estimulada, sin duda, por la diversidad de frutas tropicales que pueden conseguirse desde los años 80's. Se les encuentra en los mayores supermercados de Europa y Norteamérica. Este interés da lugar al empleo de métodos de producción más sofisticados, así como de selección y envasado, con lo que se consigue mayor calidad y aspecto más atractivo de fruta fresca lo que, a su vez, aumenta la demanda. El resultado ha sido un mayor conocimiento del público en torno a las frutas tropicales y un creciente interés por

los jugos y bebidas elaboradas a base de dichas frutas, lo que se ha visto fomentado por la propaganda de los principales distribuidores (Ashurst, 1995).

2.2 Tipos de bebidas refrescantes

A las bebidas refrescantes se suelen encontrar bajo diversas clasificaciones, tales como: bebidas refrescantes fermentadas y bebidas refrescantes no fermentadas; bebidas refrescantes carbonatadas y bebidas refrescantes no carbonatadas, esto va a depender de la literatura que se consulte. Para objeto de nuestro estudio se mencionará a mayor profundidad la clasificación de bebidas no carbonatadas, ya que de acuerdo a las características fisicoquímicas de la bebida refrescante que empleamos en este estudio, ésta se define como no carbonatada.

Las bebidas pueden clasificarse de diferentes formas, ya sea por la base principal que las conforma, tales como bebidas lácteas, bebidas alcohólicas, jugos, etc. Un tipo de bebidas refrescantes que recientemente se han introducido al mercado son las conocidas como bebidas refrescantes.

El término bebidas refrescantes está abierto a diversas interpretaciones por lo que es necesaria una cuidadosa definición. En su más amplia aceptación el término engloba a las bebidas sin alcohol (incluyendo a la cerveza y al vino sin alcohol, y al agua), pero en su uso corriente se excluye normalmente al té, café y a las bebidas basadas en la leche. En el Reino Unido esta interpretación está amparada en cierto grado por una definición legal como a continuación se menciona: bebida

refrescante es cualquier líquido destinado a la venta para el consumo humano, ya sea sin diluir o previa dilución, pero quedando excluidos el agua, jugo de fruta, leche y preparados lácteos, té, café, cacao, entre otros; también ovoproductos, extractos cárnicos, extractos de levaduras o de vegetales, sopas, zumos de hortalizas y bebidas alcohólicas (Varnam y Sutherland, 1994).

Históricamente, las bebidas refrescantes derivan de dos fuentes principales, de las aguas minerales con gas y aromatizadas con frutas que estuvieron asociadas con la popularidad de los manantiales europeos, y de las versiones sin alcohol de las cervezas de hierbas elaboradas de un modo casero (Varnam y Sutherland, 1994).

2.2.1 Bebidas carbonatadas

Los refrescos carbonatados se consumen siempre sin diluir e incluyen refrescos que contienen jugo de fruta, los obtenidos por un proceso que conlleva la trituración de cítricos enteros, aquellos que no alcanza el mínimo contenido en fruta exigido y otras bebidas de la última categoría, incluyendo las colas y las bebidas para hacer mezclas (Varnam y Sutherland, 1994).

Dependiendo del tipo de refresco, el primer paso es elaborar un jarabe (materia prima) con jugo y/o pulpa de fruta (o ambos en forma concentrado), y/o sustancias aromatizantes, azúcar, edulcorantes artificiales y ácidos de fruta. La transformación posterior puede realizarse de forma industrial o en establecimientos hosteleros de forma manufacturada. En la transformación

industrial se mezcla el jarabe con agua potable o agua mineral, se añade, si procede, ácido carbónico, que tiene un efecto refrescante y a la vez inhibe la formación de gérmenes y se envasa en botellas de vidrio, plástico o en cartón (Vollmer y col., 1990).

2.2.2 Bebidas refrescantes no carbonatadas

En el pasado, a las bebidas refrescantes no carbonatadas se les reconocía por los nombres de los productos, tales como refresco que contienen jugo de fruta destinado al consumo con o sin dilución previa. Recientemente, el consumo de los refrescos no carbonatados listos para beber se ha estimulado gracias a la aparición de una amplia gama de bebidas a base de frutas tratadas térmicamente y envasadas de forma aséptica. Los ingredientes y la tecnología implicada en la elaboración de los refrescos no carbonatados, son similares a los de los carbonatados, con la lógica excepción de la carbonatación. Los refrescos no carbonatados se basan en jugos de fruta o en triturados, aunque también se puede utilizar un aromatizado artificial. Otros ingredientes, como los conservantes, desempeñan su función sólo durante el almacenamiento y por lo tanto se emplean a las mismas concentraciones que en los refrescos carbónicos. Esto hace que su concentración en el momento del consumo sea menor, lo que permita una adecuada calidad y bajo riesgo al consumidor (Varnam y Sutherland, 1994).

La situación ha cambiado con la aparición de las bebidas basadas en frutas, tratadas térmicamente y envasadas asépticamente, las cuales son estables a temperatura ambiente. Para ello se requiere la inactivación de las ascosporas de *Byssochlamys*. La mezcla de dos o más zumos de fruta con el agua es frecuente,

junto con azúcares o edulcorantes intensos, aromatizantes y acidulantes. Los colorantes se añaden a una minoría de los productos y el ácido ascórbico se emplea para prevenir el pardeamiento actuando como antioxidante, y para enriquecer el producto con vitamina C. Las bebidas de esta clase son una situación intermedia entre los refrescos y los zumos de fruta. Las bebidas de frutas de este tipo se envasan asépticamente tras el tratamiento térmico. Los más frecuentes son los envases Tetra Brik de uso individual. A pesar de la aplicación del tratamiento térmico y del envasado aséptico, una pequeña parte de los productos contienen benzoato como conservante (Varnam y Sutherland, 1994). Las bebidas no carbonatadas (sin gas), si se van a envasar en frío, se deberán someter a filtración previo al envasado para eliminar los microorganismos, o bien se tratan con bactericidas tales como el dimetilcarbonato (Varnam y Sutherland, 1994).

2.2.3 Bebida de jugo de fruta

El nombre “bebida de jugo de fruta” se confunde fácilmente con “jugo de fruta” y promete más de lo que realmente contiene, porque los porcentajes de contenido en frutas son diferentes: las bebidas de jugo de fruta de hueso o de mosto de uva contienen un mínimo del 30% de jugo de fruta, las que contienen jugo de cítricos un mínimo del 6% y las bebidas de las restantes frutas un mínimo del 10%. Debido a que los porcentajes citados no son suficientes un sabor pleno a fruta, se suelen añadir sustancias aromatizantes naturales. Las bebidas de jugo de fruta no contienen ácido carbónico (bebida sin gas) (Vollmer y col., 1990).

2.2.3.1 Jugo de fruta.

Los jugos de fruta son en realidad la parte líquida de la fruta y algo de fibra. Pueden ser de una sola fruta o de una mezcla de varias. Está autorizado añadir pulpa. El jugo elaborado de concentrado presenta pérdidas de aroma frente a los jugos obtenidos directamente. Por ello, tienen que llevar la indicación, por ejemplo, “a base de concentrado de jugo de naranja” junto con la denominación del tipo de jugo. (Al jugo de fruta deshidratado se le ha extraído toda el agua). La pérdida del aroma es tal, que no puede emplearse para la elaboración de jugo de fruta; es apropiado como fruta en helados y productos de pastelería (Vollmer y col., 1990).

Los jugos de fruta se obtienen a partir de frutas frescas por compresión mecánica, o también de concentrados de jugos de fruta por dilución con agua. Tales productos son susceptibles de sufrir una fermentación, pero no están fermentados. Contienen en general 5-20% de extracto seco. Se elaboran en la industria, bien para su consumo directo como tales jugos, o bien como productos intermedios, por ejemplo para la fabricación de jarabes de fruta, jaleas, bebidas refrescantes, licores o productos de confitería (Belitz y Grosch, 1992).

El jugo conocido como polivitamínico es una mezcla de jugo y pulpa de varias frutas y vitaminas. El porcentaje de fruta suele ser de 100%; empleando además pulpa y frutas exóticas como maracuyá, mango, papaya, etc., se obtiene un sabor fuerte y jugoso.

Los jugos “light”, es decir, con menos calorías, o los jugos para diabéticos en teoría no pueden existir, porque no está permitido cambiar el contenido natural del

azúcar de los jugos. Pero a veces se encuentra una marca, que en vez de endulzarse con azúcar está endulzado con edulcorantes artificiales (Vollmer y col., 1990).

Los jugos de fruta fuertemente ácidos en general se edulcoran, si bien la adición de azúcares (sacarosa, glucosa, fructosa) está legalmente reglamentada en la mayor parte de los países. En los jugos destinados a posterior manipulación es normal el uso de algún procedimiento conservante con objeto de prevenir su fermentación. La elaboración de los jugos de fruta comprende las siguientes fases: preparación de la fruta, obtención propiamente dicha del jugo, tratamiento posterior jugo y conservación del mismo (Belitz y Grosch, 1992).

La elaboración de los jugos de fruta comprende las siguientes fases: preparación de la fruta, obtención propiamente dicha del jugo, tratamiento posterior del jugo y conservación del mismo (Belitz y Grosch, 1992).

2.2.4 Bebida de extractos

El sabor a fruta de este tipo de bebidas proviene de sustancias aromatizantes naturales; como ejemplo, limonadas de cítricos y de cola. Las limonadas de naranja ocupan el mayor segmento del mercado. Se suelen fabricar empleando zumos muy turbios. La adición de zumo es para conseguir un sabor *sui géneris* y pretende otorgar a la bebida mediante el color y la turbidez un aspecto atractivo que recuerde al jugo de fruta (o de la pulpa): también puede proceder de un homogeneizado de frutas o cáscaras molidas. Las bebidas de cola son refrescos que contienen extractos naturales de la nuez de cola, del jengibre, flor de azahar,

algarrobo, cáscaras de limón y otros, cuyas recetas suelen ser un secreto (Vollmer y col., 1990).

2.2.5 Bebida tipo néctar de fruta

La bebida de néctar de fruta es prácticamente un jugo de fruta (con pulpa) y al que se ha añadido agua con azúcar. Debido a que el nombre néctar parece muy atractivo, muchos consumidores creen erróneamente que es más valioso que el jugo de fruta (Vollmer y col., 1990). Los néctares de fruta se obtienen en su mayor parte por homogenización de pulpa de fruta, o bien de frutas entera, con adición de azúcar y agua y, en algunos casos, también de ácido cítrico y ascórbico. La proporción de fruta en el producto final es del 25 al 50%, estando reglamentada ésta en la mayoría de los países, así como el contenido mínimo de ácidos totales. Las frutas a partir de las cuales se elaboran son, fundamentalmente, albaricoques, peras, fresas y melocotones (Belitz y Grosch, 1992).

Los néctares “light” o para diabéticos en vez de con azúcar, están endulzados con edulcorantes artificiales; hay que tener en cuenta el contenido natural de azúcar de la fruta, que por su puesto se mantiene en estos productos. En lo que se refiere al contenido de fruta, el néctar es similar al jarabe de frutas. Contiene un tercio de jugo y dos tercios de azúcar añadido (Vollmer y col., 1990).

2.2.6 Bebida de hortalizas

Las bebidas de hortalizas, al contrario que las bebidas de jugo de fruta, a veces se condimentan y salan. Éstas se pueden clasificar de la siguiente forma:

- Jugo de hortalizas: zumo transparente o turbio natural.
- Jugo de hortalizas fermentado, con ácido láctico.

Estas últimas son muy importantes en las terapias dietéticas. La hortaliza se somete a una fermentación natural que empieza por sí misma o al añadir cultivos puros de bacterias acidolácticas. Los productos fermentados con ácido láctico apenas contienen azúcar, son pobres en calorías y facilitan la digestión, debido precisamente a su contenido en ácido láctico (Vollmer y col., 1990).

Se distinguen también:

- Cóctel de hortalizas: mezcla de zumo de hortalizas; a veces también se añade jugo de frutas.
- Bebida de hortalizas: bebida con un contenido mínimo del 40% de jugo o pulpa de hortalizas. Esta variedad es comparable a los néctares de fruta (Vollmer y col., 1990).

2.2.7 Bebidas deportivas, bebidas enriquecidas y “nutracéuticas”

En los últimos años ha surgido un notable mercado, aunque fragmentado, de bebidas que se consumen con fines específicos y diferentes al de sofocar la sed o al mero placer. Tales bebidas apoyan las “modas” de vida sana o bien se afirma que tienen propiedades para estimular la salud, e incluso medicinales. Existe un considerable traslapamiento entre estos productos y los refrescos convencionales, pero la base lógica de su formulación es completamente diferente (Varnam y Sutherland, 1994). Existen diferentes bebidas que, según los fabricantes, son consideradas nutracéuticas.

A. Bebidas deportivas

Recientemente ha aumentado la disponibilidad de las bebidas deportivas y sus derivados, las bebidas “modernas”. Se dispone de diferentes tipos para cubrir distintas necesidades asociadas con el ejercicio físico. Las más comunes quizá sean las bebidas para reponer fluidos, las cuales se formulan para facilitar la rehidratación tras, o durante, una actividad física intensa. Tales bebidas se conocen también como isotónicas, equilibradoras de los electrolitos y/o reponedoras de electrolitos. Sin embargo, los electrolitos están presentes en la formulación fundamental para facilitar la absorción de agua, ya que la reposición de electrolitos no suele ser una prioridad tras el ejercicio, sino que se consigue mediante alimentación posterior al esfuerzo. La mayoría de las bebidas reponedoras de fluidos se suministran en forma de polvo para ser rehidratadas por el consumidor. También hay una clase en forma de concentrado líquido que se debe consumir con grandes cantidades de agua, mientras que otros se elaboran en la forma lista para beber y se envasan en latas o envases flexibles de papel de aluminio que incorporan una boquilla. El sabor básico que proporcionan los electrolitos no es agradable, por lo que se suele añadir un aroma de fruta (Varnam y Sutherland, 1994).

Existen otros tipos de bebidas deportivas, aunque son menos conocidos que las bebidas para la reposición de fluidos. Las bebidas de pre-competición están pensadas para proporcionar un alto nivel de energía disponible en forma de carbohidratos, normalmente una mezcla de maltodextrinas, fructosa y/o glucosa.

Las vitaminas del complejo B se suelen añadir para favorecer el metabolismo de los carbohidratos y también acostumbran a contener electrolitos (Varnam y Sutherland, 1994).

B. Bebidas enriquecidas y nutracéuticas

Las bebidas enriquecidas se consideran refrescos que se asemejan organolépticamente a sus equivalentes convencionales, pero que contienen cantidades más elevadas de un nutriente o de un grupo de nutrientes. El punto de partida más común son los refrescos de frutas que se enriquecen con una variada gama de nutrientes, incluyendo proteínas, minerales, particularmente calcio, vitaminas y fibra (Varnam y Sutherland, 1994).

“Nutracéuticas” es un término nuevo que, en su más amplia acepción, se puede aplicar a cualquier alimento o sustancia que forma parte de un alimento y que proporciona algún beneficio a la salud o ejerce algún efecto terapéutico. La mayoría de las bebidas denominadas nutracéuticas se formulan para un fin específico más que para mejorar la salud en general, y no tienen un equivalente convencional. Los refrescos nutracéuticos son especialmente populares en Japón, en donde se le atribuyen propiedades medicinales que con toda seguridad no se admitirían ni en Europa ni en Estados Unidos. Su formulación para fines específicos hace que el mercado este muy segmentado. Entre los ejemplos cabe citar una bebida con kiwi destinada a los cantantes y a los que practican karaoke, la cual contiene extractos de ginseng y de *karin* la cual se dice es para suavizar la garganta y mejorar la calidad de la voz (Varnam y Sutherland, 1994).

2.2.8 Bebidas bajas en calorías: bebidas “light” y bebidas para diabéticos.

En la época actual en la que está de moda la figura atlética y delgada, los fabricantes publicitan bebidas refrescantes bajas en calorías, en las que el azúcar se sustituye por edulcorantes artificiales acalóricos.

La moda se llama “Light” y va unida al “avance social” de los edulcorantes artificiales. La sacarina, por ejemplo, ha pasado de ser un sustitutivo barato del azúcar a ser un alimento dietético respetable para diabéticos y junto con otros edulcorantes a ser una “alternativa saludable” del azúcar. Pero la sacarina no tuvo tanto éxito debido a que a dosis más elevadas su dulzor se torna amargo; por lo que se inicio una búsqueda de alternativas. En 1990 se aprobó la normativa que permiten emplear los edulcorantes artificiales como el ciclamato, aspartame y acelsulfame en los refrescos bajos en calorías (Vollmer y col., 1990).

Las bebidas “Light”, bajas o reducidas en calorías, pueden ayudar a disminuir la ingesta de calorías si se incluyen dentro de una alimentación global sana. No obstante, con ello no deberían olvidarse las bebidas que calman la sed, que son al menos igual de sanas, generalmente más baratas, que han probado su eficacia y cumplen la misma función, como por ejemplo, al igual mineral, solo o mezclada con jugo de frutas (Vollmer y col., 1990).

Los refrescos para diabéticos no contienen azúcar añadido y por ello son pobres en calorías. Se endulzan con los edulcorantes artificiales sacarina y ciclamato; la fructosa, un sustitutivo del azúcar, se añade con frecuencia para obtener un sabor más completo (Vollmer y col., 1990).

2.3 Principios de su formulación

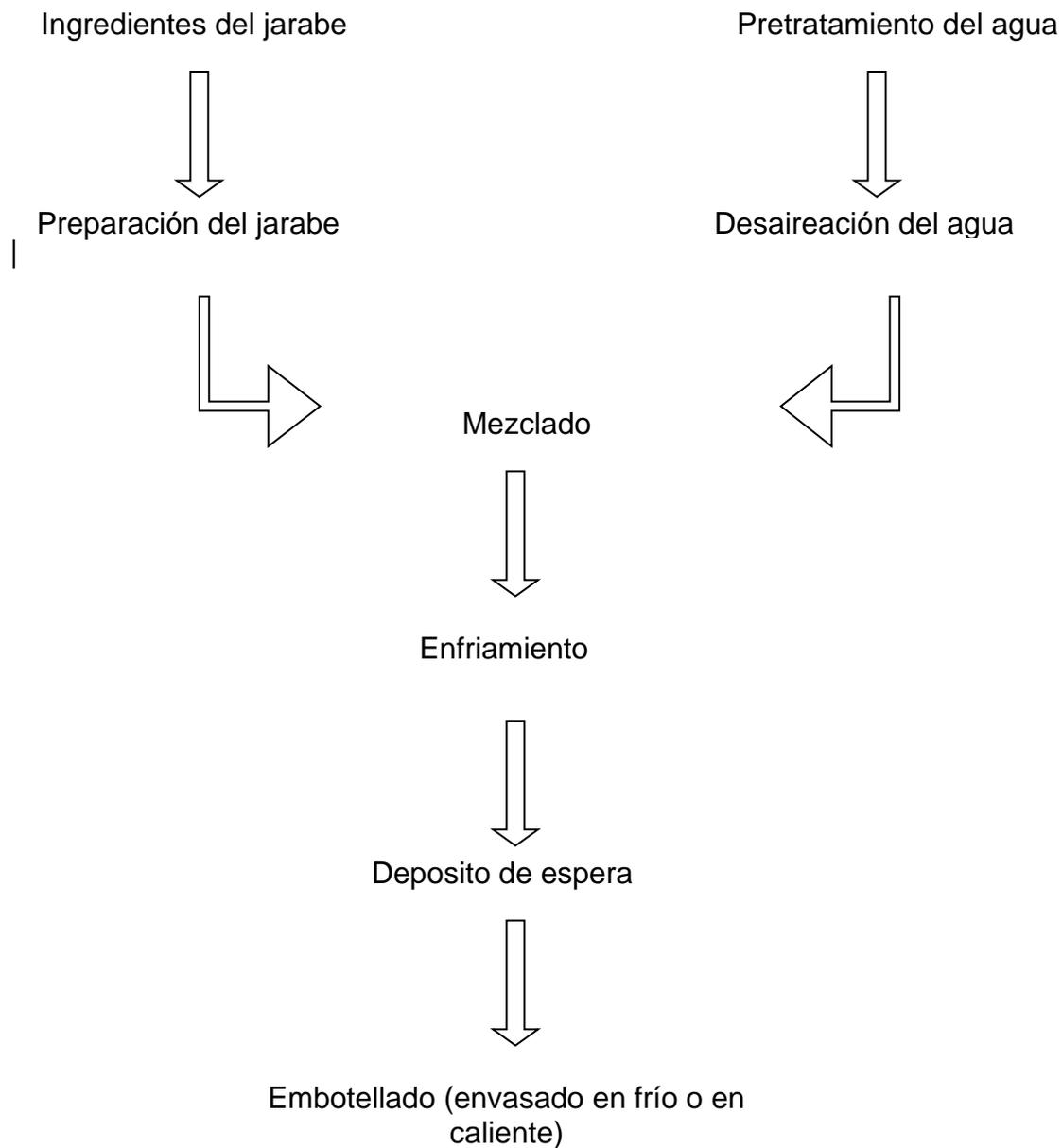
La tecnología de la elaboración de las bebidas refrescantes es relativamente sencilla, en contraste con el desarrollo de la formulación inicial, el cual puede ser muy complicado. De hecho, en muchos casos, la elaboración del jarabe, que es la etapa crucial que determinará las cualidades y la calidad del producto, se lleva a cabo en una planta central de la que se abastece a otras plantas cuya misión principal es el embotellado y la distribución (Figura 1) (Varnam y Sutherland, 1994).

2.3.1 Agua

El agua es el componente mayoritario de las bebidas carbonatadas, suponiendo el 90% total. La calidad del agua empleada en la elaboración tiene una repercusión directa sobre la calidad del producto final, por lo que siempre se necesita someterla a un pretratamiento. La naturaleza de éste varía de acuerdo con la fuente del agua y con su composición química. Cuando el agua del suministro es de baja calidad (elevada carga microbiana, alta concentración de sales, partículas suspendidas, entre otras) puede ser necesario someterla a todos los tratamientos siguientes: eliminación de partículas microscópicas y coloidales mediante coagulación y filtración, reducción de la dureza y ajuste del pH (Varnam y Sutherland, 1994).

La mayoría de las bebidas refrescantes se elaboran bajo el siguiente esquema (ver diagrama 1):

Diagrama 1. Elaboración de bebidas refrescantes



Fuente: Varnam y Sutherland, 1994

2.3.2 Preparación del jarabe de azúcar

Una vez desarrollada una formulación adecuada, la preparación del jarabe es un procedimiento relativamente fácil. Consiste en la mezcla de los ingredientes, que se dosifican manualmente o de forma automática en tanques de acero inoxidable dotados con agitadores impulsados desde la parte superior. Las operaciones deben protegerse de las posibles contaminaciones con microorganismos, por lo que suelen realizarse en una zona limpia y aislada, y con un envasado aséptico lo cual es conseguido en parte con un equipo de filtración de aire el cual mantiene una ligera presión de aire positiva. En la actualidad es una práctica común el tratamiento térmico del jarabe mediante un intercambiador de placas (Varnam y Sutherland, 1994).

2.3.3 Aromatización

Obviamente, el componente aromático del jarabe es el que tiene mayor influencia en el aroma y sabor del producto final, aunque su concentración puede ser de tan sólo el 0.015%. Sin embargo, debe advertirse que el agua, la acidez y los edulcorantes también pueden participar en el aroma y sabor en una magnitud que dependerá de la naturaleza del producto (Varnam y Sutherland, 1994).

La naturaleza del aromatizante varía en función del tipo de producto. La fruta es el más usado. El aroma de fruta se puede añadir directamente por el zumo de frutas o extracto (en el caso de los cítricos) o bien como esencia. El zumo se utiliza normalmente en la forma de concentrado, siendo los más populares los de cítricos y dentro de ellos el concentrado de naranja. A los zumos de cítricos se les

elimina el amargor en caso de ser necesario. También se utilizan cantidades considerables de zumo de piña, así como pequeñas cantidades de zumo de bayas y de manzana (Varnam y Sutherland, 1994).

Las esencias naturales de cítricos se componen mayoritariamente de aceites esenciales obtenidos de la cáscara de la fruta. Los compuestos de la cáscara, sobre todo el limoneno, constituyen más del 90% del aceite, aunque contribuyen poco o nada al aroma, por lo que actúan principalmente como portadores (Varnam y Sutherland, 1994).

2.3.4 Edulcorantes

El dulzor es un aspecto muy importante dentro de las propiedades de las bebidas refrescantes y en muchos países se especifican contenidos mínimos en azúcar. En el Reino Unido, por ejemplo, la cantidad mínima de azúcar añadida a los refrescos que se consume sin diluir es del 4.5% (p/v). En Europa continental, los refrescos tradicionalmente se edulcoran con sacarosa obtenida de la remolacha, mientras que en el Reino Unido también se utiliza sacarosa. La normativa en el Reino Unido también permite el uso de la sacarina, por lo que las bebidas tienden a tener un contenido es sacarosa inferior al de sus equivalentes elaboradas en Europa continental. La sacarosa se puede adicionar en su forma granulada o bien como jarabes acuosos con un contenido del 67% (p/v). El jarabe de glucosa obtenido mediante la hidrólisis ácida y enzimática del almidón puede reemplazar parcial o totalmente a la sacarosa. En el Reino Unido la sacarosa se emplea exclusivamente para edulcorar bebidas “sanas”. Sin embargo, el principal sustituto

de la sacarosa es el jarabe de alto contenido en fructosa que se obtiene a partir del maíz. En los últimos años el alto contenido en azúcar de los refrescos ha llevado a que sean considerados como pocos saludables por las personas conscientes de los problemas relativos a la dieta y a que se hayan desarrollado refrescos bajos en calorías en los que todo o parte del azúcar se ha sustituido por edulcorantes intensivos. Los refrescos bajos en calorías se edulcoran en un principio mediante una mezcla de sacarina y ciclamato, ya que no es adecuado utilizar sólo sacarina. El temor referente a la seguridad del ciclamato hizo que muchos países dejaran de permitirlo, incluyendo a Estados Unidos y al Reino Unido, y que se estimulara el desarrollo de edulcorantes intensos alternativos.

En la actualidad hay cuatro clases de edulcorantes muy extendidos: sacarina, ciclamato, que sigue estando permitido en bastantes países, aspartamo (Nutra Sweet, sanecta) y acesulfame K (Sunnett) (Varnam y Sutherland, 1994).

Los edulcorantes intensos no pueden sustituir por completo a los azúcares sin una pérdida de las características del producto y de la calidad, por lo que en muchos casos se requiere rediseñar la formulación. Algunos edulcorantes intensos como el aspartame, no son estables a bajo pH por lo que en la formulación hay que reducir la acidez e incluir el uso de tampones (Varnam y Sutherland, 1994).

2.3.5 Acidulantes

Los acidulantes tienen una importancia considerable para determinar la calidad sensorial de las bebidas refrescantes por lo que se debe cuidar la formulación para conseguir un adecuado balance azúcar-ácidos (Varnam y Sutherland, 1994). Algunos acidulantes y sus propiedades se resumen en la tabla 1.

2.3.6 Colorantes

Los colorantes tienen un efecto directo sobre las propiedades sensoriales de los refrescos, pero la coloración adicional se utiliza cuando se permite para reforzar el sabor que percibe el consumidor. En algunos casos, el color tiene mayor importancia que el gusto en la impresión general que se causa al consumidor: el rojo se asocia con frutas de baya como la grosella y la frambuesa, el naranja y el amarillo se asocia con los sabores cítricos, los verdes y azules se asocian con la menta y con los aromas a hierbas (Varnam y Sutherland, 1994).

Tabla 1. Tipo de acidulantes y aplicación en bebidas refrescantes.

Acidulante	Propiedades y limitaciones
Ácido ascórbico	Sus propiedades antioxidantes pueden ser de gran importancia. Puede iniciar un pardeamiento tras un tratamiento térmico y desestabiliza algunos colorantes
Ácido cítrico	Suave carácter frutal que es muy apreciado en los refrescos de frutas. Es el acidulante más empleado
Ácido málico	Algo más fuerte que el ácido cítrico con un sabor y aroma frutal más acusado. Al contrario que el ácido tartárico, puede utilizarse sin problemas en aguas duras.
Ácido láctico	Aroma suave en comparación con otros ácidos.
Ácido tartárico	Aroma mucho más brusco que el ácido cítrico, y se emplea a concentraciones más bajas. Las sales cálcicas y magnésicas son pocos solubles, por lo que el uso de este ácido no es adecuado en zonas de aguas duras.

Fuente: Varnam y Sutherland, 1994

Los colorantes artificiales, mayoritariamente los colorantes azoicos, son los más empleados y los más adecuados desde el punto de vista tecnológico debido a su estabilidad en el producto final y a su alta capacidad cromática. No obstante, la seguridad de algunos colorantes artificiales se ha puesto en tela de juicio durante muchos años, y el número de colorantes usados en la actualidad ha disminuido tanto por imposiciones legales como por parte de los productores sensibilizados por la alarma causada por colorantes como la tartracina (Varnam y Sutherland, 1994).

2.3.7 Conservadores

Los refrescos carbonatados permiten el crecimiento de un limitado número de microorganismos, no obstante, se requiere el uso de conservantes para prevenir la aparición de alteraciones en los periodos prolongados de almacenamiento a temperatura ambiente. Debe apreciarse que además de las sustancias como los benzoatos, que se añaden por función específicamente conservante, los acidulantes (incluyendo el ácido carbónico) también tiene un efecto antimicrobiano en su forma no disociada. El grado de ésta inhibición depende de la naturaleza del acidulante y se produce de un modo diferente, pero interrelacionado, con el descenso del pH. Sin embargo, el papel inhibidor de los acidulantes debe considerarse como una protección adicional y no como una barrera primaria contra el crecimiento de los microorganismos (Varnam y Sutherland, 1994). Algunos de los conservadores comúnmente utilizados en bebidas refrescantes se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Conservadores y aplicación en bebidas refrescantes.

Conservadores	Propiedades y limitaciones
Ácido benzoico y benzoatos	Normalmente se emplea la sal sódica soluble. Máxima actividad a valores de pH inferiores a 3. Eficaz frente a un amplio rango de microorganismos. Sinérgico con el SO ₂ . El ácido libre puede precipitar si no se mezcla bien. Alergénico.
Parabenos	Más eficaz que el ácido benzoico a valores de pH superiores a 3. La actividad antimicrobiana aumenta con la longitud de la cadena (metil-propil) aunque disminuye la solubilidad. Alergénicos.
Ácido sórbico y sorbatos	Se usa normalmente como sal sódica, potásica o cálcica. Más eficaz a valores bajos de pH, pero mantiene su actividad a pH de 6-6.5. El ácido libre puede precipitar sino se mezcla bien. Alergénico, no admitido como sustancia GRAS en Estados Unidos y sólo se permite su uso en bebidas que se consumen tras su dilución en el Reino Unido.
Dióxido de azufre	Normalmente empleado en forma de sal, como el metabisulfito sódico. Más efectivo a pH inferior a 4 y frente a las levaduras, mohos y bacterias Gram-negativas. Pérdida de actividad por unión a componentes de frutas para formar

sulfitos.

Fuente: Varnam y Sutherland, 1994

2.3.8 El proceso de envasado en frío

La sensibilidad microbiológica del producto determina cuán seguro debe ser el método de envasado. El envasado aséptico en frío puede definirse como el envasado en condiciones asépticas. Esto significa que el producto una vez que ha sido pasteurizado es envasado en botellas esterilizadas y tapado con tapones esterilizados. El envasado aséptico en frío se dirige en especial a las botellas no retornables de PET, ya que éstas responden absolutamente a los requisitos de comodidad del consumidor. El envasado aséptico en frío conserva el sabor natural y el aroma, así como el color (Madrid y col., 2003).

En el procedimiento casero de “envasado en frío”, el alimento no se somete a calentamiento antes de colocarlo en el frasco de vidrio o en cualquier otro tipo de envase, en contraposición a lo que se hace en el procedimiento de “envasado en caliente” en el que el alimento se precocina, está caliente cuando se introduce en el envase, e inmediatamente se somete a tratamiento térmico. Como es natural, un alimento que ha sido envasado en frío, una vez introducido en el envase, necesitará un tratamiento térmico de mayor intensidad que uno que haya sido envasado en caliente (Frazier y Westhoff, 1994).

En el envasado en frío, tras su sellado, el envase se enfría en un baño de agua a 2-4°C y después se seca mediante una corriente de aire. A veces, se espolvorea un poco de nieve carbónica sobre el envase para mantener la temperatura del

mismo durante su transporte hasta la cámara de almacenamiento refrigerado a $2\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Kimball, 2002).

El llenado en frío como un sistema de envasado da un producto para distribución y venta con refrigeración a $0-5^{\circ}\text{C}$, con vida útil de 4 a 6 semanas, que retiene las características olfato-gustativas del zumo fresco, si se hace a partir de fruta exprimida o de un concentrado al que se añade pulpa y aroma. La distribución a baja temperatura minimiza la pérdida de aromas y vitaminas, exige almacenes refrigerados y ciertas condiciones en la distribución y la venta con cabinas refrigeradas para exposición, por lo que este sistema es más apropiado para productos de marca, de alto precio y muy solicitados. Los envases para estos productos son del tipo "pure-pack" en cartón o plástico de 0.25, 1 y 2 litros de capacidad o recipientes de distintos tamaños desde 0.18 a 5 litros (Ashurst, 1995).

Ventajas del llenado en frío para zumos:

- I. el proceso está bien desarrollado, así como la tecnología del llenado
- II. economía en las inversiones y los costes de fabricación
- III. gran calidad del producto, que justifica los altos precios
- IV. bien considerados en la venta al por menor (la zona refrigerada tiene mucha renovación de existencias).

Desventajas:

- I. requiere equipamiento para la distribución y almacenado con refrigeración (que son caros para un solo producto)
- II. han de distribuirse con frecuencia.

(Ashurst, 1995).

2.4 Microbiología de las bebidas refrescantes

Debido a su bajo contenido de nutrientes las bebidas refrescantes no fermentadas son productos cuyas características, exceptuando las de los jugos de frutas, les hace poco favorables para el desarrollo de los microorganismos de interés sanitario. No obstante, conociendo las exigencias cada día mayores de los consumidores respecto a la calidad, el carácter innovador de este sector industrial y la importancia comercial y económica de estos productos, su conservación trae consigo problemas microbiológicos notables (Bourgeois y col., 1994).

Como en el caso de otros productos, la alteración de origen microbiano implica por una parte que el producto sufra una contaminación y por otra parte que las condiciones de conservación permitan la multiplicación microbiana. Los factores que están implicados en la contaminación y desarrollo microbiano son:

- La composición y las características físico-químicas del producto,
- Las distintas etapas de la fabricación en las que se puede modificar la composición de la microflora contaminante,
- Las características físico-químicas del ambiente donde se conservan.

Los microorganismos deterioradores que van a ser la causa de la alteración o constituir una asociación alterante, serán aquellos que por sus características intrínsecas mejor se adapten y multipliquen en las condiciones globales mencionadas (Mossel, 1971).

2.4.1 Características microbiológicas de bebidas

Las bebidas refrescantes no fermentadas constituyen un conjunto muy heterogéneo en el que se distinguen, sin entrar en una nomenclatura compleja, dos tipos de productos cuyas características microbiológicas son muy diferentes:

- Bebidas a base de extractos naturales de frutas o de otros vegetales;
- Los jugos de mezcla de frutas y de verduras y las bebidas a base de zumos de frutas.

Hay que mencionar también los jarabes, que no son bebidas propiamente dichas pero si una de los componentes básicos para su fabricación, se prepara a partir de zumos y de extractos aromáticos y se caracterizan por su poco contenido en agua (Bourgeois y col., 1994).

2.4.2 Microbiología de las bebidas a base de extractos naturales

Comprenden (Barbesier, 1971):

- La limonada, la más antigua de las bebidas gaseosa, preparada a partir de extractos de limón o de otras frutas del grupo de las hesperídeas acidificados con ácido cítrico, tartárico o láctico y adicionados de azúcar
- Las sodas y los bitters, bebidas gaseosas a base de extractos naturales diversos,
- Las “colas” a base de extractos de nuez de cola, caramelo, ácido ortofosfórico y cafeína y las tónicas que contienen extractos amargos y quinina.

A título de ejemplo, la composición de las sodas y limonadas es la siguiente (Sand,1976): agua (80-98%); azúcar (0.5-15%); nitrógeno orgánico (5×10^{-4} a

1×10^{-1} %); sales minerales (5×10^{-3} a 1×10^{-1} %); vitamina B (de trazas a 1×10^{-4} %); pH (2.5-4.0); CO_2 (0 a 7 g/l) (PCO_2 : 0 a 3.5 kg/cm²); O_2 (< 1 a >8 mg/l).

Lo que caracteriza a estos productos es:

- Su bajo pH
- Su concentración en anhídrido carbónico particularmente selectiva (Mrozek, 1973)
- Su débil concentración en oxígeno
- Su elevada concentración en azúcar
- Su débil concentración en nitrógeno asimilable, especialmente en aminoácidos (con algunas excepciones, como el bitter sin alcohol) y en vitaminas.

Estos caracteres reducen considerablemente el número de especies susceptibles a multiplicarse: lo normal es que se multipliquen solamente las levaduras (Bourgeois y col., 1994).

2.4.3 Microbiología de los jugos de frutas y verduras y las bebidas a base de frutas

Estos productos se distinguen de los precedentes por su gran riqueza en aminoácidos y en vitaminas, particularmente del grupo B, que permiten el crecimiento además de las levaduras, de diversas bacterias ácido-tolerantes especialmente bacterias lácticas. En las bebidas a base de frutas no gaseadas, la ausencia de CO_2 reduce igualmente la selectividad (Bourgeois y col., 1994).

2.4.4 Microbiología de jarabes

En los jarabes, que se caracterizan por su baja a_w , sólo las levaduras osmotolerantes como el *Saccharomyces bailii* pueden multiplicarse (Philippot, 1981).

2.4.5 Microbiología de bebidas dietéticas

Son bebidas en las que se sustituye la sacarosa por cualquier otro edulcorante sintético. Esta sustitución cambia la naturaleza de las bebidas y las hace menos sensibles al ataque microbiano ya que estos edulcorantes no son utilizados por todos los microorganismos como fuente de energía (Svorcova, 1977 a y b).

2.4.6 Microflora de las bebidas refrescantes no fermentadas

La microflora de las bebidas recién preparadas es bastante variada. Posteriormente desaparecen numerosas especies bajo el efecto de los agentes selectivos del medio, principalmente el pH bajo y la gran concentración de CO_2 . Los microorganismos que se han detectado en las materias primas, en los materiales o en el producto algunos días después del envasado, se incluyen dentro de tres grupos dentro de una clasificación que no es estrictamente válida más que para las bebidas gaseadas (Sand, 1977):

- Un primer grupo que incluye a los agentes alterantes típicos.
- Un segundo grupo que comprende microorganismos alterantes pero sólo en condiciones específicas.
- Un tercer grupo de microorganismos normalmente no alterantes.

2.4.6.1 Microbiología de agentes típicos de alteración

Entre las levaduras, principalmente agentes alterantes de las bebidas, que provocan su fermentación, se distinguen (Sand, 1977):

Levaduras que provocan una fermentación rápida (relacionada en orden decreciente en importancia):

- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Saccharomyces uvarum*
- *Saccharomyces microellipsodes*
- *Saccharomyces florentinus*

Levaduras que provocan una fermentación lenta:

- *Brettanomyces naardenensis*
- *Saccharomyces intermedius*
- *Saccharomyces bailii*
- *Saccharomyces bisporus*
- *Torulopsis stellata*
- *Saccharomyces montanus*
- *Candida parapsilopsis*

Las dos primeras especies citadas el *S. cerevisiae*, *S. uvarum*, son particularmente importantes. Entre las bacterias, los principales agentes de alteración son las bacterias acidolácticas, Gram +, catalasa – del género *Leuconostoc* que, como las levaduras, soportan bien las condiciones selectivas reinantes en estas bebidas pero cuyas exigencias en nitrógeno orgánico y en vitaminas son muy elevadas (Bourgeois y col., 1994).

2.4.6.2 Características de microorganismos deterioradores

Son esencialmente microorganismos aerobios que se desarrollan preferentemente en bebidas no gaseosas o en bebidas gaseosas conteniendo una dosis anormal de oxígeno (Bourgeois y col., 1994).

Levaduras como *Hansenula* o *Pichia*, bacterias como *Gluconobacter* o *Lactobacillus* y diversos mohos, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Oospora* son algunos de los más importantes.

Gluconobacter, una bacteria Gram -, catalasa +, antiguamente conocida como *Acetomonas*, aerobia estricta y que se multiplica generalmente en las bebidas no gaseosas especialmente en las conservadas en envases plásticos; no provoca sino modificaciones del gusto poco pronunciadas. En el jugo de tomate pueden multiplicarse bacterias del género *Clostridium* (Sand, 1976).

2.4.6.3 Microorganismos sin efecto deteriorador

Algunos microorganismos pueden sobrevivir en las bebidas sin provocar en ellos cambios macroscópicos evidentes. Este es el caso de las levaduras aerobias como *Rhodotorula* y bacterias aerobias como las del género *Bacillus* o *Acetobacter*. A esto hay que añadir algunos microorganismos de interés higiénico tales como *Escherichia coli* y otros coliformes, *Streptococcus* del grupo D, e incluso patógenos, como *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* o *Clostridium* que pueden sobrevivir un cierto tiempo en las bebidas. Otros géneros y especies se han

aislado de las materias primas, principalmente de los concentrados y almíbares, de los materiales y de alguno de los productos acabados (Bourgeois y col., 1994). Diferentes trabajos revelan una cierta constancia en la naturaleza de las especies aisladas (Sand y Kolfshoten, 1969; Sand y Van Grinsven, 1976).

Existen, sin embargo, particularidades importantes en el caso de aquellos productos en los que la sacarosa se sustituye por otro edulcorante (Turtura y Samaja, 1978).

Se ha confirmado también que las especies aisladas en las materias primas y de los materiales no pertenecen a las especies responsables de la alteración (Sand, 1973; Comi y col., 1981); Sand explica esta aparente anomalía por el hecho de que las especies responsables de la alteración son muy minoritarias en los recuentos y por tanto pasan desapercibidas.

2.4.7 Alteraciones en las bebidas por efecto de los microorganismos

Las alteraciones que se han observado en estos productos son las siguientes:

2.4.7.1 Modificaciones del aspecto

- Producción de opalescencia o turbidez en las bebidas claras (levaduras en bebidas con extractos, levaduras o bacterias en zumos de frutas).
- Formación de un anillo opaco sobre todo en los jarabes (levaduras osmotolerantes).
- Aparición de flóculos en las bebidas gaseosas (levaduras) y en las no gaseosas (levaduras o mohos; *Acetobacter*).

- Formación de un sedimento (levaduras).
- Aumento de la viscosidad, gelificación (bacterias lácticas).
- Disminución de la turbidez en las bebidas turbias de forma natural (organismos pectolíticos).
- Decoloración de los pigmentos naturales de las bebidas (levaduras o bacterias).

2.4.7.2 Aumento de la presión en los envases

Esta alteración tiene diferentes consecuencias: salida de líquido (el envase rezuma), abombamiento, estallido (generalmente levaduras fermentativas; a veces bacterias lácticas heterofermentativas) (Bourgeois y col., 1994).

2.4.7.3 Modificaciones del aroma

- Pérdida del sabor (levaduras),
- Aroma a cerveza (levaduras),
- Sabor agrio (bacterias lácticas o acéticas),
- Aroma a mantequilla (bacterias lácticas),
- Olor enmohecido (mohos).

Mrozek (1972) ha estudiado, mediante la inoculación experimental de microorganismos alterantes, el umbral de aparición de los defectos para las diferentes especies. En el caso de sabor a fermentado producido por levaduras el umbral se sitúa entre 50.00 y 100.000 gérmenes por mililitro.

2.4.8 Control microbiológico de bebidas refrescantes

El control debe hacerse sobre las materias primas (agua, jarabes de azúcar, zumos de fruta), sobre la cadena de fabricación (puntos críticos), y sobre el producto envasado (Sand, 1970).

Los análisis a efectuar son por un lado la búsqueda de gérmenes indicadores de contaminación fecal (*E. coli*) o por otros materiales (coliformes) por los métodos habituales y por otro, la investigación específica de microorganismos alterantes. Esta investigación se lleva a cabo teniendo en cuenta las características propias de cada bebida (Bourgeois y col., 1994).

La especificidad de los medios a utilizar se presta a discusión. Se puede hacer un recuento elevado en un medio de poca especificidad, o al contrario buscar específicamente los microorganismos de importancia en la alteración. Esta segunda opción parece más eficaz si se dispone de buenos medios de detección ya que esta flora puede que sea minoritaria (Back, 1981),.

Los métodos inmunológicos deberían servir para cambiar esta situación ya que además de ser muy específicos alguno son muy rápidos, el método del ATP por ejemplo (Littel y La Rocco, 1986).

2.4.8.1 Prevención de las alteraciones

La prevención de las alteraciones debe dirigirse de una parte a evitar o reducir la contaminación y de otra a inhibir la multiplicación de los microorganismos presentes (Bourgeois y col., 1994).

2.4.8.2 Reducción de la contaminación

Mediante el mantenimiento de la calidad de las materias primas, unas buenas prácticas de fabricación y una eventual destrucción de la microflora del producto final se consigue al reducir de forma efectiva la contaminación.

En lo que concierne a la elección de las materias primas las exigencias son las siguientes:

- Agua potable y desprovista de gérmenes específicos de la alteración.
- Azúcar líquido, la forma más corriente de utilización, o sólido que contenga por cada 10 g como máximo: 4 levaduras, 10 esporas de mohos y 200 bacterias mesófilas.
- Jugos de fruta y extractos: ausencia de gérmenes específicos de la alteración vivos; flora total poco numerosa.

En lo que concierne a la higiene de la fabricación es necesario sobretodo impedir que se formen “nichos de contaminación” mediante una cuidadosa limpieza y una desinfección eficaz (Sand,1971; Scheibe y Barwald,1971).

Los recipientes utilizados para el envasado deben estar exentos de microorganismos deterioradores. El ambiente debe también contener pocos microorganismos sobre todo en los locales donde se efectúa el trasiego.

La eliminación de los microorganismos en el producto terminado puede hacerse mediante los siguientes tratamientos:

- Filtración esterilizante.
- Pasterización (pasterización rápida, trasiego en caliente, o pasterización en botellas).

- Tratamiento con pirocarbonato de etilo (30-200 mg/l) sustancia que destruye la mayor parte de los microorganismos y por lo tanto realiza una verdadera pasterización química (Voerkelius,1968).

Los tratamientos térmicos son particularmente útiles y los únicos utilizados en el caso de los jugos de fruta aunque la termosensibilidad de los agentes contaminantes sea bastante variable. Según un estudio muy metódico realizado por Put y col., (1976), las levaduras más termorresistentes entre las que se pueden encontrar en las bebidas son: *Saccharomyces cerevisiae* y *S. chevalieri* (sobreviven en el 10% de los tubos que contenían 10^5 células, después de un tratamiento a 65°C durante 10 minutos) seguidas de *S. bailii*, *S. uvarum* y *Kluyveromyces bulgaricus* (Bourgeois y col., 1994).

2.4.8.3 Inhibición de la multiplicación de los microorganismos presentes

Las características físico-químicas de las bebidas y muy particularmente de las bebidas gaseadas son muy selectivas y además esta selectividad se puede en cierta medida potenciar. Sin embargo, existen ciertas limitaciones, de tipo organoléptico por ejemplo, que impiden que se potencie mucho la acción selectiva de un factor o en varios de ellos y esperar que actúen sinérgicamente. El aumento de la selectividad de las bebidas se consigue según Voerkelius (1968), Mrozek (1972), Sand (1977), Jährgig y Schade (1979) y Day (1983) de la siguiente forma:

- Bajando el pH a valores alrededor de 2.5 en algunas bebidas. Esto no es suficiente para impedir el desarrollo de levaduras sobre todo ácido-tolerantes.
- Elevando la presión de anhídrido carbónico hasta 3.5-4 kg/cm² con ello se inhibe la mayor parte de los microorganismos excepto levaduras y bacterias lácticas.
- Manipulando el contenido en oxígeno. Este es un factor bastante crítico para los microorganismos aerobios estrictos (*Gluconobacter*) e incluso para los microaerofilos (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*). La vulnerabilidad mucho más marcada de las bebidas no gaseadas respecto a las otras se explica por la ausencia de CO₂ y el contenido más elevado de O₂ libre. Es pues importante eliminar perfectamente el oxígeno, reducir al máximo el espacio de cabeza y a veces añadir ácido ascórbico;
- Controlando la a_w o la presión osmótica. Este es un factor estabilizante en los jarabes pero no en las bebidas.

También puede contribuir al aumento del período de conservación la adición de aditivos conservadores siempre que estén autorizados. Sin embargo, los agentes conservantes no son una panacea. Por una parte, el nivel de contaminación inicial es crítico, generalmente las concentraciones legalmente admitidas no permiten más que estabilizar productos con una contaminación inicial muy pequeña. Por otra parte, hay que tener en cuenta el desarrollo progresivo de la resistencia a los conservadores por parte de la microflora. Según Sand (1969) cuatro de las cinco

cepas aisladas de bebidas con 100 ppm de ácido benzoico fueron aisladas en países donde está autorizado el empleo de este aditivo en las bebidas.

Las bebidas refrescantes son productos selectivos que no dan problemas sanitarios, únicamente problemas de conservación. Su alteración se produce casi siempre por levaduras o por bacterias lácticas, dos grupos de microorganismos bien adaptados a las condiciones selectivas del medio.

Dentro de estos productos los más vulnerables son por una parte las bebidas enriquecidas con nitrógeno y factores de crecimiento por llevar extractos de frutas y por otra las bebidas no carbonatadas no protegidas por el anhídrido carbónico (Bourgeois y col., 1994).

2.4.9 Tipo de microorganismos acidófilos.

Cada organismo suele tener un nivel de pH dentro del cual es posible su desarrollo y un pH óptimo bien definido.

La mayor parte de los ambientes naturales tienen valores de pH entre 5 y 9 y los organismos con óptimos dentro de estos límites son los más comunes; solamente algunas especies se pueden desarrollar a valores de pH menores a 2, o superiores a 10. Los organismos que viven a valores bajos de pH se llaman acidófilos (Thomas y Michael, 1993).

Los acidófilos tienen un valor de pH óptimo de crecimiento entre 0 y 5.5., Los neutrófilos, entre 5.5 y 8.0; y los alcalófilos prefieren un rango de pH de entre 8.5 y 11.5. Los alcalófilos extremos tienen un valor de pH óptimo de crecimiento de 10 o más (Prescott y col., 2002).

Aunque la mayor parte de las bacterias crecen mejor a pH neutro, también existen bacterias acidófilas. En efecto, algunas de estas bacterias son acidófilas obligadas, incapaces absolutamente de crecer en la neutralidad. Las bacterias acidófilas obligadas incluyen varias especies del género eubacteriano. *Thiobacillus* y varios géneros de arqueobacterias que incluyen *Sulfolobus* y *Thermoplasma*. *Thiobacillus* y *Sulfolobus* presentan una propiedad interesante: oxidan minerales de sulfuro y producen ácido sulfúrico.

Es extraño considerar que para los acidófilos obligados el pH neutro es realmente tóxico. Probablemente el factor más crítico para la acidofilia obligada es la membrana plasmática. En realidad cuando el pH se eleva a la neutralidad, la membrana plasmática de las bacterias acidófilas obligadas se disuelve y estas células se lisan, lo cual sugiere que se requieren altas concentraciones de iones hidrógeno para la estabilidad de la membrana (Thomas y Michael, 1993).

En general, cada grupo microbiano posee preferencias de pH características. La mayoría de las bacterias y protozoos son neutrófilos. La mayor parte de los hongos prefieren medios ligeramente ácidos, con valores de pH de 4.6; las algas prefieren también una ligera acidez. Existen numerosas excepciones a esta norma. Aunque los microorganismos crecen a menudo en medios con un amplio rango de pH, su tolerancia tiene un límite. Variaciones intensas en el pH pueden dañar a los microorganismos alterando la membrana plasmática o inhibiendo la actividad de las enzimas y las proteínas transportadoras (Prescott y col., 2002).

2.4.10 Tipos de microorganismos acidófilos que se pueden encontrar en bebidas ácidas

La mayoría de las bacterias no crecen en acidez media. Muchas bacterias mueren rápidamente en tal ambiente, pero algunas pueden crecer a pH bajo, tales como bacterias ácido acéticas como *Acetobacter* y *Gluconobacter spp.*, bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus* y *Leuconostoc spp.* Respecto al grupo de N- streptococos: *Clostridium butyricum* y *C. pasteurianum*, *Alicyclobacillus* (ex-*Bacillus*) ácido terrestres, *B. coagulans*, *B. macerans*, y *B. polymyxa*. Las esporas de bacterias como las de *Clostridium botulinum* no germinarán a un pH menor a 4.5, aunque se ha informado el lento crecimiento de *C.botulinum* a pH de 4.1 que ha sido reportado en medios de laboratorio, *C. pasteurianum* y *C. buytricum* pueden crecer a pH de 3.6 y han sido reportados como causa del deterioro en jugos de fruta. *Clostridium spp.* ha sido el agente causante de las explosiones de lata del jugo de pera a un pH de 4.72. Esporas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis* han sido mostradas en la germinación del jugo de tomate a pH de 4.4 y crecer gradualmente mientras se eleva el pH a 5.0. Tales esporas sobreviven fácilmente a la pasteurización pero crecen y dependen de la disponibilidad de oxígeno. El deterioro bacteriano a pH's bajos en su mayoría frecuentemente asociado con *Gluconobacter* (*Acetomomas*). Éstos dependen absolutamente de la presencia de oxígeno libre para crecer, y éste se restringe por el empaquetamiento gas-impermeable y el espacio de cabeza mínimo (Malcolm y col., 2000).

III. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar, identificar y estudiar el comportamiento de microorganismos acidúricos en una bebida light ácida envasada en frío.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar e identificar microorganismos acidúricos a partir de una bebida light ácida envasada en frío.
2. Estudiar el comportamiento de microorganismos acidúricos aislados de una bebida light ácida envasada en frío.

IV.-METODOLOGÍA

4.1 Equipo y Materiales

Autoclave eléctrica SM 200 Yamato Scientific ®

Baño maría con circulación Riosa (0-120°C)

Balanza analítica PC 2000 Mettler ®

Contador de colonias de campo obscuro American Optical Quebec ®

Horno para esterilización Craft (0-250°C)

Incubadora bacteriológica Blue M ®

Lámpara de luz ultravioleta ENF-240C, Spectroline ®

Termómetros

Vortex 2-genie Scientific Industries

Material de uso común en el laboratorio de microbiología

4.2 Medios de cultivo

Agar de bilis y rojo violeta (ABRV) BD Bioxon ®

Agar de eosina y azul de metileno (EMB) BD Bioxon

Agar soya tripticasa (AST) BD Bioxon

Agar Cuenta Estándar (ACS)

Agua peptonada, 1 % (AP) BD Bioxon

Caldo soya tripticaseína (CST) Merck (KGaA)

Diluyente de peptona 0.1 % (DP) BD Bioxon

4.3. Muestras

Se recolectaron 50 unidades envasadas de la bebida de 500 y 1000 mililitros pertenecientes a un mismo lote. Las muestras de la bebida envasada en frío fueron proporcionadas por una empresa productora de bebidas, establecida en el Estado de México. Se empleó una bebida que previamente presentó problemas aparentemente de contaminación en alguna etapa de su producción; los niveles de microorganismos detectados estuvieron por arriba de los límites establecidos por la empresa. (Por razones de confidencialidad no se revelará el nombre de la empresa ni el de la bebida).

Algunos de los ingredientes de la bebida empleada en este estudio fueron: Agua, saborizante, ácido cítrico, hexametáfosfato de sodio, citrato de sodio, aspartame y acesulfame K, ácido málico, benzoato de sodio, sorbato de potasio, EDTA disódico, color caramelo, ácido ascórbico, tartrazina, amarillo ocaso FCF y rojo allura AC.

4.4 Aislamiento e identificación de microorganismos a partir de la bebida envasada en frío.

Las muestras, en sus respectivos envases sellados y cerrados, fueron transportadas bajo refrigeración hasta el laboratorio de Microbiología del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) y se procesaron inmediatamente después de su

recepción. Se realizó la cuantificación de microorganismos acidúricos y organismos coliformes, y se identificó el tipo de microorganismos encontrados.

4.4.1 Recuento de microorganismos

Previo a la apertura de las botellas; todas fueron desinfectadas con un hisopo de algodón humedecido previamente con alcohol etílico.

Se analizaron 10 mL de cada botella de la bebida; estos se mezclaron con 90 mL de diluyente de peptona contenidos en una bolsa de plástico; la mezcla se agitó por 1 minuto en el Stomacher ®. Apartir del homogeneizado, se tomo 1 mL y se efectuó el recuento de microorganismos acidúricos, para ello se empleó el agar suero de naranja empleando la técnica de vertido en placa; las cajas se incubaron a 35°C por 24 h (Downes y Ito, 2001).

4.4.2 Identificación de microorganismos

Se seleccionaron colonias al azar con características morfológicas distintas procedentes de los dos tipos de medio de cultivo y se sembraron en tubos conteniendo agar base sangre inclinado. Una vez desarrolladas, las cepas se almacenaron en refrigeración hasta su uso.

Para la identificación de los microorganismos se realizaron las siguientes pruebas:

Microscopia.

Se realizó la tinción de Gram; para ello se realizó un frotis de las cepas aisladas sobre un portaobjetos, se tiñó con solución de cristal violeta y sé fijó con solución de lugol; posteriormente, se decoloró con alcohol-cetona. Finalmente, se aplicó

safranina y posteriormente se lavó con agua para quitar el exceso de safranina (BAM, 2001). Bajo el microscopio de luz, las bacterias gram-positivas aparecen de color violeta mientras que las gram-negativa se tiñen de rosa.

Pruebas bioquímicas.

La identificación se realizó mediante diferentes pruebas del metabolismo de los microorganismos bajo estudio: oxidasa; producción del indol; utilización del citrato; prueba de Vogues-Proskauer; fermentación de azúcares: glucosa, arabinosa, manosa, manitol; asimilación de: N-acetil-glucosamina, gluconato, caprato, adipto, malato, fenil-acetato; reducción de nitritos, producción de arginina dihidrolasa, hidrólisis de urea, hidrólisis de esculina, licuefacción de la gelatina, presencia de la enzima β -galactosidasa. Las pruebas o reacciones bioquímicas fueron efectuadas empleando el sistema miniaturizado API 20-E. El sistema de ensayo API-20E, es un método rápido para la identificación de enterobacterias. Consiste en un dispositivo plástico (plantilla) con 20 mini-tubos que contienen diferentes medios de cultivo deshidratados en donde se realizan las pruebas bioquímicas descritas arriba; a partir de estas reacciones se identifica el microorganismo. La inoculación, lectura e identificación de los microorganismos a partir de las plantillas, se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (BioMérieux, Cop.).

Las cepas microbianas aisladas e identificadas fueron sembradas e incubadas en agar base sangre inclinado y posteriormente almacenadas en refrigeración para ser usadas en los estudios de comportamiento.

4.4.3 Comportamiento de los microorganismos acidúricos en la bebida a diferentes temperaturas: 15°C, 22°C, 32°C y 35°C.

Se trabajó con los tres tipos de cepas aisladas a partir de las bebidas fermentadas: *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*. Las tres cepas fueron cultivadas en CST a 35°C/24-48 horas, bajo estas condiciones de cultivo las cepas alcanzaron una concentración de aprox. 9 Log₁₀ UFC/mL.

A partir de botellas independientes, por separado se tomaron 10 mL de bebida y se colocaron en frascos estériles de vidrio. Cada frasco fue inoculado sólo con una cepa de estudio. A partir de diluciones decimales seleccionadas provenientes de cada cepa se tomaron 10 µL y se inocularon en la bebida para lograr la concentración inicial deseada (10², 10³, 10⁴ UFC/mL). Los frascos inoculados se almacenaron a 15°, 22°, 32° y 35°C. Periódicamente, se efectuaron recuentos, a partir de cada uno de los frascos, mediante la técnica de vertido en placa empleando agar cuenta estándar. Las cajas inoculadas fueron incubadas a 35°C por 24-48 horas. Todos los estudios se efectuaron por triplicado.

V.-RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Identificación de microorganismos acidúricos en la bebida ácida

Se aislaron 100 cepas distintas procedentes de las botellas. La tinción mostró que todas eran gram (+). Mediante las pruebas bioquímicas se identificaron 3 géneros: *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter* en una relación de 50, 30 y 20 %, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Microorganismos aislados e identificados en las botellas de la bebida ácida

Muestras analizadas	Microorganismos identificado	Porcentaje (%)
25	<i>Enterobacter sp</i>	50
15	<i>Klebsiella sp</i>	30
10	<i>Citrobacter sp</i>	20

Los microorganismos identificados corresponden al grupo coliforme, por lo que su presencia en el producto es posible relacionarlo con malas prácticas de higiene en la preparación de la bebida, empleo de materias primas de mala calidad, inadecuado almacenamiento o efecto ineficiente de los conservadores. La empresa periódicamente y de forma controlada realiza limpieza y desinfección de

las superficies y equipos por lo que una contaminación dentro de la empresa durante la elaboración del producto parecía poco probable.

Además, el sistema de limpieza y los desinfectantes empleados previamente habían sido evaluados y se había encontrado una eficiencia adecuada. No obstante, era necesario descartar la hipótesis de falta de higiene o ineficiencia del procedimiento de desinfección con evidencia por lo que se realizaron muestreos de las superficies y equipos involucrados en la preparación de la bebida, y se evaluó el procedimiento de desinfección. Se encontró que el procedimiento de limpieza y el de desinfección eran adecuados; además no se aisló de las superficies o equipo ninguno de los microorganismos identificados en las bebidas, por lo que se descartó la hipótesis que llevó a este estudio interno.

A continuación se investigó la calidad de las materias primas; los tres tipos de microorganismos (*Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*) fueron aislados de una de las materias prima (extracto de sabor), los tres tipos de microorganismos fueron aislados e identificados a partir de 10 muestras analizadas provenientes del mismo lote empleado para elaborar la bebida que presentó problemas microbiológicos. Hasta el momento no cabía duda de que la fuente de contaminación fue la materia prima, no obstante, quedaba por resolver una cuestión importante: los microorganismos identificados en la bebida fueron aislado en un concentración promedio de 1000 UFC/mL, y en la materia prima en la misma concentración; sin embargo, la materia prima es un extracto concentrado el cual para elaborar la bebida se diluye quedando en la bebida final 1000 veces diluido por lo que los microorganismos también se diluyen en la misma proporción. Así, en teoría habría que esperar entonces en promedio 1 UFC/ml de bebida; por lo que entonces la

concentración de los microorganismos encontrada en la bebida problema podría ser el resultado de multiplicación de los microorganismos. Para tener evidencias científicas sobre esta hipótesis, se procedió a realizar estudios del comportamiento de *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter* en la bebida ácida.

5.2 Comportamiento de las cepas de microorganismos acidúricos en la bebida almacenada a 15°, 22°, 32° y 35°C.

Los problemas microbiológicos asociados con las bebidas refrescantes se reducen prácticamente a los relacionados con la alteración. Sin embargo, a las bebidas refrescantes se les involucra ocasionalmente con intoxicaciones alimentarias. No obstante, la inmensa mayoría de las ocasiones en las que se les involucra, se carecen de fundamento, aunque en un pequeño número de casos se ha constatado una sintomatología suave tras el consumo de bebidas refrescantes que contenían una gran cantidad de levaduras o películas superficiales visibles de mohos (Varnam y Sutherland, 1994).

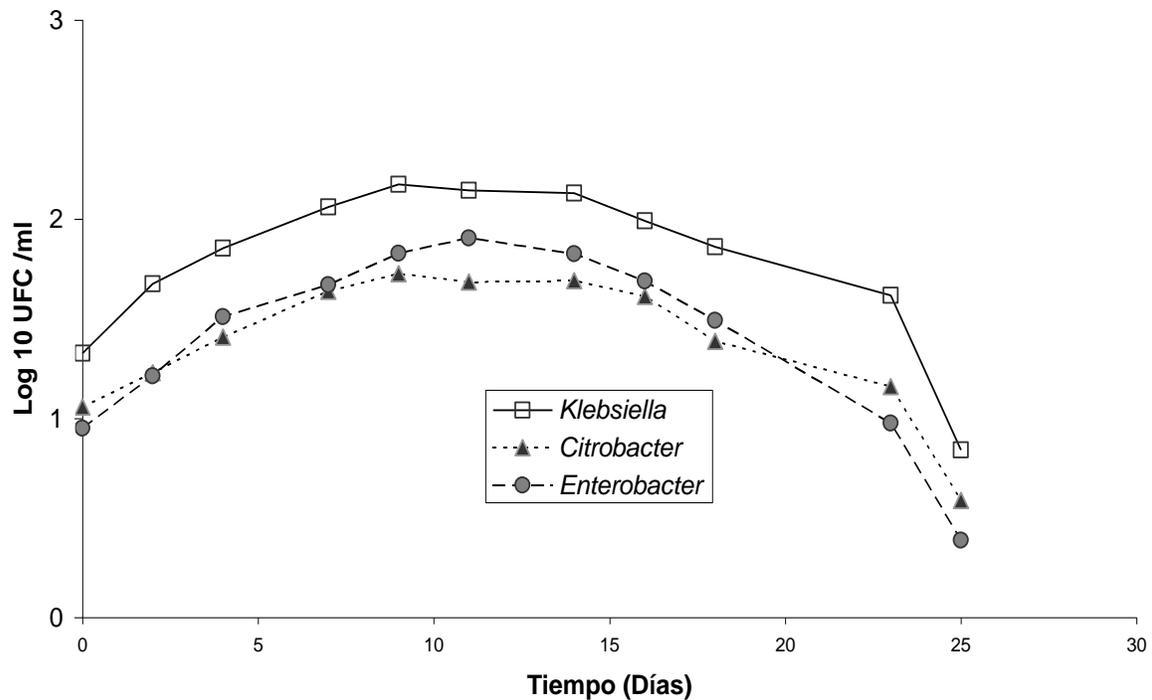
En general, las bebidas refrescantes sólo permiten el crecimiento de clases restringidas de microorganismos. Esto se debe a la presencia de varios factores inhibidores, por lo que los microorganismos capaces de prosperar son los que toleran a los diversos factores estresantes. Dependiendo de la formulación de las bebidas refrescantes y de los refrescos, el grado de estrés que ejerce sobre los potenciales microorganismos es diferente, y éste afecta no sólo a la velocidad de crecimiento sino también a la composición de la microflora (Varnam y Sutherland, 1994).

El estudiar el comportamiento de microorganismos acidúricos en alimentos, no es una tarea fácil ya que diversos factores tienen influencia directa en los resultados finales como pueden ser: las condiciones de cultivo del inóculo, el procedimiento de inoculación, el tratamiento, procesamiento o tratamiento de las muestras y los métodos para detectar o enumerar dichos microorganismos acidúricos (Beuchat y col., 2001a).

Para estudiar el comportamiento de microorganismos acidúricos en una bebida Light ácida envasada en frío se recurrió a modelos de laboratorio que consisten en inocular la bebida con un número conocido de microorganismos, almacenarlas para monitorear su comportamiento y finalmente efectuar recuentos periódicos de las porciones inoculadas para poder conocer si el microorganismos se multiplica, muere o permanece en números constantes sobre la bebida (González y col., 1994). Para realizarlo, se emplearon las cepas de los microorganismos aislados de la propia bebida. Se evaluó el comportamiento de microorganismos acidúricos a 15°, 22°, 32° y 35°C. El estudio se justifica ya que durante el almacenamiento y durante la comercialización con frecuencia la bebida ácida envasada en frío es mantenida a tales temperaturas.

Al realizar ahora el estudio del comportamiento de los tres tipos de microorganismos a 15°C, al cabo de tres días las cepas de *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter* ya mostraban una lenta multiplicación (Figura 1).

Figura 1. Comportamiento de *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter* en la bebida ácida almacenado a 15°C por 25 días



Después de que transcurrieron 10 días las cepas *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Enterobacter* a una temperatura de 15°C se alcanzó solo un aumento de sólo 2 UFC / ml. Con respecto a la cepa *Citrobacter* y *Enterobacter* no se observaron diferencias significativas de crecimiento o multiplicación con respecto al tiempo, aunque después de los 15 días se observó un decremento en la concentración. Cambios ambientales perjudiciales, como privación de nutrientes y acumulación de residuos tóxicos, pueden provocar la disminución del número de células viables, hecho que caracteriza la fase de muerte. Es decir, la muerte microbiana se define como la pérdida irreversible de la capacidad de multiplicarse (Prescott y col., 2002). Cuando los microorganismos se cultivan en un medio líquido,

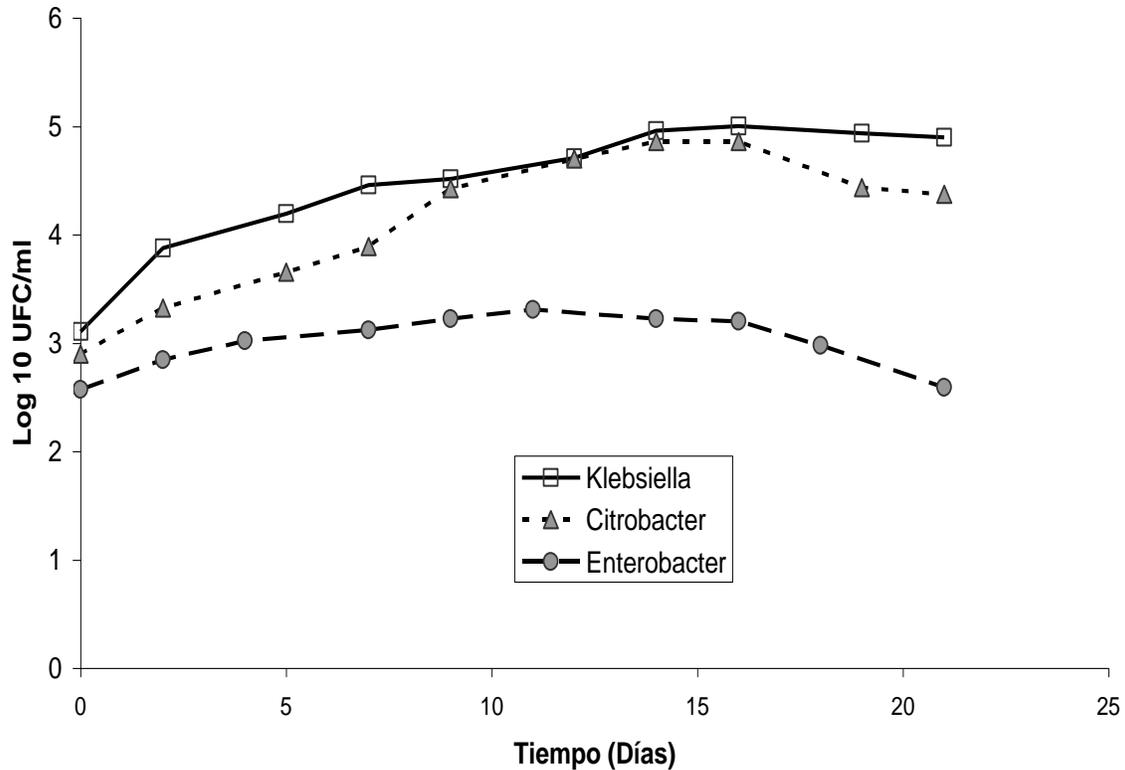
normalmente se trata de cultivo discontinuo o un sistema cerrado, esto es, se incuban en un tubo de ensaye cerrado al que no se añade más cantidad de medio que el inicial; en consecuencia, las concentraciones de nutrientes disminuyen y las de residuos aumentan (Prescott y col., 2002)

El limitado desarrollo de los microorganismos de estudio en la bebida podría explicarse por algunas causas adicionales:

- A. Que las cepas de microorganismos acidúricos se encontraron presentes en una baja concentración y con desigual distribución en el alimento de tal forma que es posible que las porciones analizadas no contenían en elevada concentración dichos microorganismos acidúricos, a pesar de haberse homogeneizado vigorosamente la muestra.
- B. Que los microorganismos se encontraran en una condición que se conoce como “viable no cultivable”, es decir que estando presentes tales microorganismos acidúricos no haya sido posible su recuperación en los medios de cultivo ordinarios (Hug y Cowell, 1995)

Cuando se inocularon las cepas de microorganismos de estudio en la bebida ácida a temperatura ambiente, en general los tres tipos de microorganismos se multiplicaron en las primeras horas (Figura 2).

Figura 2. Comportamiento de *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter* en la bebida ácida almacenado a 22°C por 21 días



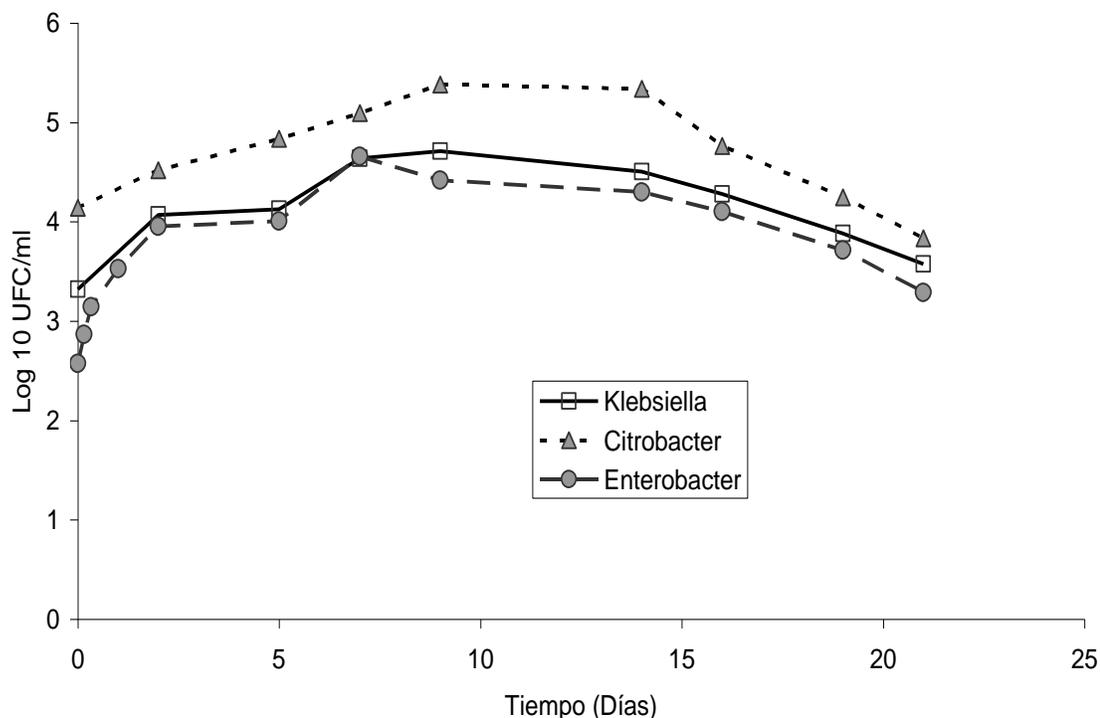
El número de microorganismos aumentó dentro de los primeros 2 días. Las cepas *Klebsiella* y *Citrobacter* incrementaron su concentración de 3 hasta aproximadamente entre 4.1 y 4.5 Log 10 UFC a los 5 días. La lenta multiplicación de la cepa *Enterobacter* en las primeras horas posiblemente se deba a que los acidulantes actuaron como antimicrobianos provocando un efecto estresante sobre la célula bacteriana, y es posible que el grado de estrés sobre esta cepa fue mayor a diferencia del observado en las cepas *Klebsiella* y *Citrobacter*.

No obstante, no existen publicaciones sobre el comportamiento de bacterias acidúricas en bebidas comerciales, para poder realizar alguna comparación con

los resultados que se obtuvieron. En la literatura solo es posible encontrar información con levaduras: en algunos estudios se reporta levaduras causantes de deterioro en bebidas comerciales, tal como *Z. bailii* que puede crecer y puede causar el deterioro de un lote. Una bebida que no contiene conservadores a temperatura ambiente, *Z. bailii* puede causar el deterioro dentro de pocos días, aunque puede tomar varias semanas la suficiente presión para romper la lata. La vida de anaquel para las bebidas que llevaron un proceso de pasteurización normalmente es de 6 a 12 meses. No se aprecia a menudo que esta vida de anaquel termine por un agente microbiano, sino por un agente fisicoquímico, a menudo debido a la oxidación del producto (Malcolm y col., 2000).

En un estudio realizado por Rico, (1999) en pulpa de mango procesada se recuperaron cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) que corresponden a los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Enterococcus*. Estos géneros encajaron muy bien con el perfil de deterioro que presentó la pulpa de mango (Rico, 1999). *Lactobacillus* y *Enterococcus* han sido implicados en deterioro de productos cítricos (pH 3.5), jugos de naranja (pH 3.4), y jugo de uva (pH 3.0), así como en latas con uvas en almíbar (pH 2.9), donde ha provocado gasificación e hinchamiento de la lata y otros productos fermentados (Fernández, 1981; Juven, 1976). En otro estudio, Tilbury (Fernández, 1981, Cit. en ref.223) menciona que existen efectos resultantes en la capacidad fermentativa de las bacterias lácticas sobre sustratos ricos en azúcares. Muestran una notable tolerancia a pH ácido que les permite competir ventajosamente con otros microorganismos (Fernández, 1981).

Figura 3. Comportamiento de *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter* en la bebida ácida almacenado a 32°C por 21 días



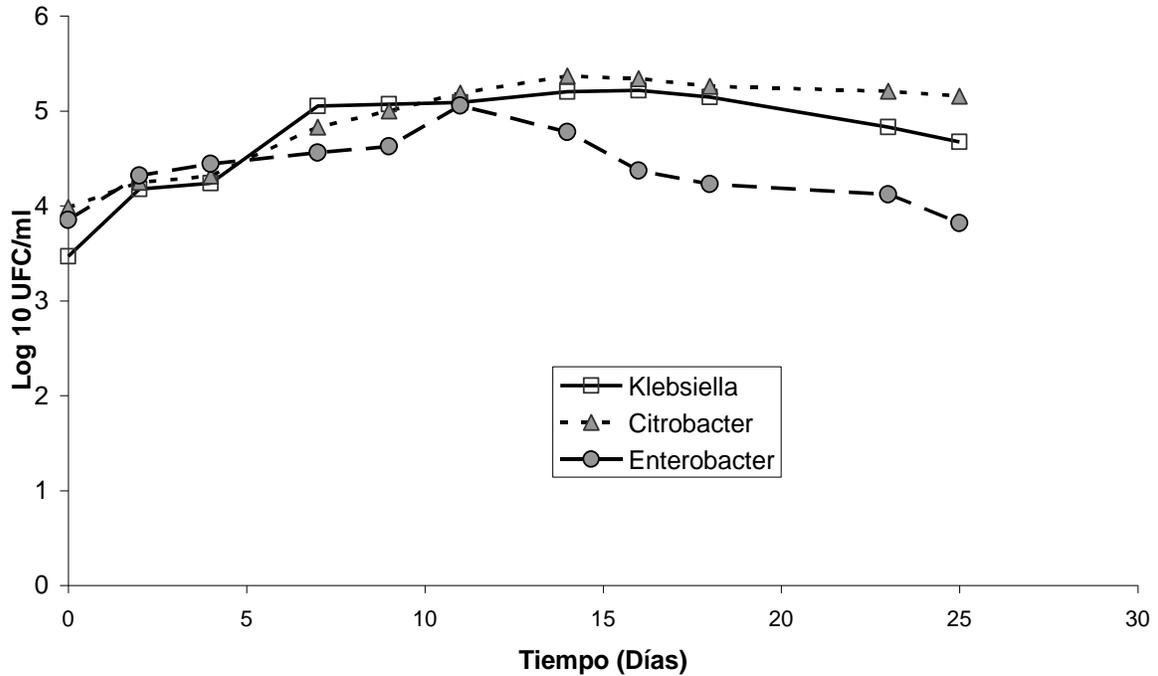
A 32°C las tres cepas de microorganismos acidúricos comenzaron su desarrollo entre los 2 y 3 días de incubación (Figura 3). La cepa de *Citrobacter* mostró una fase Lag más corta y la cepa de *Enterobacter* mostró una fase Lag más larga. Las dos cepas de microorganismo acidúricos previamente identificados como *Klebsiella* y *Citrobacter* alcanzaron su máximo desarrollo alrededor de los 9 días de incubación, mientras que la cepa identificada como *Enterobacter* lo hizo a los 7 días de incubación, quiere decir que *Enterobacter* bajo estas condiciones de almacenamiento presentó un metabolismo más rápido que *Klebsiella* y *Citrobacter*, o bien que la presencia de conservadores actuaron de mejor manera frente a *Klebsiella* y *Citrobacter*. Sin embargo es importante señalar que el microorganismo

a los catorce días posteriores de incubación entro en una fase donde su capacidad de multiplicarse disminuyó considerablemente a diferencia de la cepa identificada previamente como *Citrobacter*.

Cabe señalar que a esta temperatura se hicieron evidentes signos típicos de deterioro de la bebida. El deterioro consistió en la alteración de las características sensoriales de la bebida, la más pronunciada fue la turbidez de un amarillo claro a un amarillo ligeramente oscuro, pero no manifestándose a través de sabores anómalos o formación de sedimentos en el envase. La alta acidez y el contenido de conservadores tales como benzoato de sodio, sorbato de potasio permiten que clases restringidas de microorganismos como los acidúricos se puedan multiplicar en una bebida ácida.

Por ultimo, cuando se inocularon las cepas de microorganismos acidúricos en la bebida y se almacenó a 35°C, en general los tres microorganismos acidúricos se multiplicaron en las primeras horas de almacenamiento (Figura 4).

Figura 4. Comportamiento de *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter* en la bebida ácida almacenada a 35°C por 25 días



Después de que transcurrieron 16 días, al evaluar el comportamiento de las cepas identificadas como *Klebsiella*, *Citrobacter* y *Enterobacter* a 35°C, los valores descienden lentamente, una de las causas pudiese ser que los microorganismos sufrieron cambios ambientales perjudiciales, como privación de nutrientes y acumulación de residuos tóxicos, que resultan del metabolismo de azúcares y proteínas tales como ácido láctico, peróxido de hidrógeno, entre otros, que originaron la disminución del número de células viables, hecho que caracteriza la fase de muerte celular (Prescott y col., 2002). Al igual que para el caso del estudio

realizado a 32°C, a 35, también se hicieron evidentes en un corto tiempo los signos de deterioro.

Este hecho nos lleva a reflexionar que a pesar de la tecnología moderna, el deterioro de bebidas y jugos de fruta continúa ocurriendo a causa de los microorganismos. Debido a ello, continuamente la industria está sufriendo cambios motivados por la competición de la nueva tecnología y las demandas públicas de nuevos productos, creando con ello nuevos problemas microbiológicos, ejemplo de ello es el uso de tereftalato de polietileno (botella PET). Este es atractivo, de mejor apreciación visual, y tiene forma de empaquetamiento conveniente, capaz de contener productos carbonatados y muy populares por los consumidores actuales. Sin embargo, tiene las desventajas de permitir la infiltración de oxígeno a través del plástico y de no poder resistir las temperaturas de la pasteurización sin la distorsión, requiriendo llenado aséptico o una suma de conservadores adecuados para las bebidas (Malcolm y col., 2000). No obstante, la bebida objeto de nuestro estudio, paso a través de un llenado en frío por tales razones.

Se hace evidente que los procedimientos de conservación aplicados a las bebidas no son suficientes para garantizar la esterilidad completa de las mismas, tanto pasteurización ni usando conservadores. Se ha informado que las levaduras atacan a los jugos de fruta comercial en un 40%, mientras que Obeta y Ugqquanyi (1995) informan lo mismo a 27% en jugos de mango y de tomate conteniendo hongos con una alta resistencia al calor. Los microorganismos son normalmente bajos en número y la gran mayoría de tales no son causa de preocupación, siendo

incapaces de crecer o causar deterioro al producto. Sin embargo, la presencia de levaduras de deterioro fermentativo tales como *Z. baillii* a cualquier nivel en una bebida es inaceptable (Malcolm y col., 2000).

Algunos microorganismos pueden sobrevivir en las bebidas sin provocar en ellos cambios macroscópicos evidentes. Este es el caso de las levaduras aerobias como las *Rhodotorula* y las bacterias aerobias del género *Bacillus* o *Acetobacter* (Sand y Kolfshoten, 1969; Sand y Van Grinsven, 1976).

Las bebidas refrescantes son productos selectivos que no dan problemas sanitarios, únicamente problemas de conservación. Su alteración se produce casi siempre por levaduras o por bacterias lácticas, dos grupos de microorganismos bien adaptados a las condiciones selectivas del medio.

Dentro de estos productos los más vulnerables son por una parte las bebidas enriquecidas con nitrógeno y factores de crecimiento por llevar extractos de frutas y por otra las bebidas no gaseadas no protegidas por el anhídrido carbónico (Bourgeois, y col., 1994).

La acidez (pH de 3.5 a 4.0) asociada al tratamiento de llenado en frío, así como el uso de conservadores constituyen la base de la autopreservación de la bebida utilizada en nuestro estudio, conservado incluso a temperatura ambiente. (Rico, 1999). Sin embargo, a la postre, ciertos microorganismos dañados por el tratamiento térmico pero aún viables podrían recuperarse e iniciar su desarrollo con daño a la integridad de la bebida provocando su deterioro.

Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto la importancia de mantener a un mínimo nivel la carga microbiana de los insumos, los materiales, superficies y equipos, durante la preparación de la bebida ácida a nivel industrial. De esta forma sería posible obtener productos con alta estabilidad (larga vida de anaquel). Por otro lado, es conveniente también prevenir la recontaminación del producto al tiempo de envasado, asegurar el cierre hermético del envase del producto, y mantener a una temperatura adecuada (de preferencia en refrigeración) el producto durante su almacenamiento hasta antes de llegar a manos del consumidor.

VI.-CONCLUSIONES

1. Las cepas de microorganismos acidúricos identificadas fueron :
Enterobacter, Klebsiella y Citrobacter
2. Las tres cepas de microorganismos acidúricos identificadas fueron capaces de multiplicarse en la bebida ácida a todas las temperaturas de estudios mostrando el mayor desarrollo a 35°C.
3. La aparición de signos de deterioro en la bebida ácida inoculada con *Citrobacter* comenzó a detectarse a partir del segundo días de incubación tanto a 32 y como a 35 °C.
4. Los microorganismos acidúricos identificados en este estudio parecen ser los principales microorganismos deterioradores de la bebida ácida envasada en frío y parecen ser los responsables de los signos de cambio de color observados en la bebida deteriorada.
5. En función de los microorganismos identificados (coliformes), las bebidas ácidas envasadas en frío analizadas, además de los problemas de deterioro observados, siguen un peligro potencial para la población consumidora.
6. Los resultados obtenidos en este estudio ponen de manifiesto la importancia de mantener a un mínimo nivel la carga microbiana de los insumos, los materiales, las superficies, los equipos, y cuidar de manera exhaustiva la recontaminación del producto al tiempo de envasado, para evitar el posterior deterioro de la bebida

VII.- BIBLIOGRAFÍA

1. Ashurst, P.R. 1995. Producción y envasado de zumos y bebidas de frutas sin gas. 2ª. Edición. Edit. Acribia, S. A. Zaragoza España. Pp. 105-106,110-111,282-284, 295.
2. Back, W., 1981. Schadhliche Microorganismen in AFG-Betrieben. Nachweis- und Kultivie-rungsmethoden, Brauwelt. Pp 121, 10 315-318.
3. BAM (Bacteriological Analytical Manual *Online*). 2001. Disponible en la página: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>, fecha de acceso: Marzo, 2009.
4. Barbesier J., M. 1981. Contrôle des jus de fruits et des boissons dérivés. Communication aux Journées du Contrôle et de l'Analyse dans les I.A.A., Nantes-Pp16, 17,18.
5. Belitz, H.D. y Grosch, W. 1992. Química de los Alimentos. 2ª. Edición. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza (España). Pp. 912-918.
6. Beuchat, L. R., Harris, L. R., Ward, T.E. y Kajs, T.M., 2001a. A Development of proposed standard method for assessing the efficacy of fresh produce sanitizer. J. Food Prot. 64: 1103-1109.
7. Bourgeois, C.M.; Mescle, J.F.; Zucca J. 1994. Microbiología alimentaria 1. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza (España). Pp. 293-300.
8. Casp Vana Clocha, A. 1998. Tecnología de alimentos. Procesos de conservación de alimentos. Ediciones Mundi-Presa AMV. Pp. 19-28.

9. Comi G., Denozza D., Cantoni C., 1981. Sul deposito di lieviti in bibite analcoliche. *Industrie delle bevande*, ottobre. Pp. 346-348.
10. Downes and Ito ed. 2001. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C. Pp. 359-375.
11. Fennema, O. R. 2000. *Química de los Alimentos*. Departamento de Ciencia de los Alimentos universidad de Wisconsin. Madison.
12. Fernández, E. E. 2000. *Microbiología e Inocuidad de los Alimentos*. Universidad Autónoma de Querétaro, México.
13. Fernández, E.E., 1981, *Microbiología sanitaria de agua y alimentos*. Vol. 1. EDUG/Universidad de Guadalajara.
14. Fox, B. A. y Cameron, A.G. 2006. *Ciencia de los Alimentos. Nutrición y Salud*. 5ª. Edición. Editorial Limusa S.A. de C.V. pp. 239, 243-244.
15. Frazier W. C. y Westhoff D.C. 2000 .*Microbiología de los Alimentos*. Edit. Acribia,S.A. 4ª edición. Pp 156, 420-422.
16. González, N. M., Gómez, S.G. y Fernández, E. E. 1994. *Sobrevivencia de V. cholerae a la desecación*. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. México
17. Hug. A. y Cowell, R. R. 1995. A microbiological Paradox: Viable but Nonculturable Bacterial with Special Reference to *Vibrio cholerae*. *J. of Food. Prot.* . 59 (1): 96-101
18. Jählig, A. , Schade W., 1976. *Mikrobiologische Aspekte der Herstellung alkoholfreier Erfrischungsgetränke*. *Lebensmittelindustrie*, 26,11 , 511-516.

19. Juven, B.J., 1976. Bacterial spoilage of citrus products at pH lower than 3.5, *Journal Milk Food Technology*, 12:819-822
20. Kimball, Dan A. 2002. *Procesado de cítrico*. 2ª. Edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza España. P. 384.
21. Little K. J., La Rocco K.A., 1986. ATP Screening Method for Presumptive Detection of Microbiologically Contaminated Carbonated Beverages. *J. Food Science*, 51 n° 2, 474-476.
22. Lund M. Barbara, Baird-Parker T. C., y Gould W. Grahame. 2000. Control of pH and use of Organic Acid in The Microbiological Safety and Quality of Food. Vol. I. pp 175-192.
23. Mac Faddin. 2003. *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de importancia clínica*. Ed. Médica panamericana 3ª. Edición. pp. 470-472
24. Madrid, A.; Gómez-Pastrana, J.M.; Santiago, F.; Madrid, J.M. y Cenzano, J. M. 2003. *Refrigeración, congelación y envasado de los alimentos*. 1ª. Edición. AMV Ediciones Mundi-Prensa. p.118, 218.
25. Madrid, V. A. y Madrid, Cenzano J. 2001. *Normas de calidad de alimentos y bebidas*. 1ª. Edición. AMV Ediciones Mundi-Prensa. p. 60.
26. Malcolm, S.P.; Paul, D.H.; Martin, B.C. 2000. Fruit Juices, Fruit Drinks, and Soft Drinks in The Microbiological Safety and Quality of Food. Vol. 2. pp 849-850.
27. Mossel, D.A.A., 1971. Physiological and metabolic attributes of microbial groups associated with foods. *J. Appl. Bact.*, 34, 1 pp., 95-118.
28. Mrozek H., 1972. Etude des dangers d'altération des limonades par les levures. *Revue de l'embouteillage*, n° 125, pp. 46-50.

29. Mrozek H., 1973. Microbiologie des boissons nonalcoolisées. *Revue de l'embouteillage*, nº132, 29-33.
30. Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Procedimiento para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Secretaría de Salud. México.
31. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Secretaría de Salud. México.
32. Obeta, J.A.N. y Ugquanyi, J.O. 1995. Heat-resistant fungi in Nigerian heat-processed fruit juice. *Int. J. Food Sci. Technol.* 30, Pp 587-590
33. Philippot, E., 1981. Fabrication et qualité des sirops et concentrés. *Bios*, 12, nº 12, Pp. 4-11.
34. Prescott, L.M.; Harley, J.P.; Klein, D.A. 2002. Microbiología. 5ª edic. Ed. McGraw Hill Interamericana. pp. 28-29.
35. Put H., De Jong J., Sand F., Van Grinsven A., 1976. Heat Resistance Studies on Yeast spp, Causing Spoilage in Soft Drinks. *J. Appl. Bact.*, 40, Pp. 135-152.
36. Rico, R. Ma. L., 1999. Deterioro microbiano de pulpa de mango procesado. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis de Químico en Alimentos. Pp. 90-92.
37. Sand F., 1971. Higiéne des chaînes d'embouteillage des boissons sans alcool. *Brauwelt*, 80,111, Pp. 1788-1800.

38. Sand F., Kolfshoten A., 1969. Etude taxonomique et écologique de quelques levures isolées de boissons á base de cola. *Brauwiss*, 4, 2, Pp. 129-137.
39. Sand F., 1976. La boisson rafraíchissante comme écosystème. *Bios*, 7-8,12 /1 Pp. 27-36.
40. Sand F., 1970. Les levures dans les boissons sans alcool. *Brauwelt*, 15, Pp. 110, 225-234.
41. Sand F., Van-Grinsven A.M., 1976. Investigation of Yeast Strains Isolated from Scandivavien Soft drinks. *Brauwelt*, Pp. 11, 353-355.
42. Scheibe E., Bárwald G., 1971. Contrôle biologique de fabrication dans l'industrie des boissons. *Mineralwasserzei*. Pp, 370-378.
43. Senser, F.;Scherz, G.; Garching, B. M. 1991. Tablas de composición de alimentos, el pequeño Souci- Fachmann-kraut. 1ª. Edición. Editorial Acribia, S.A. Pp. 374.
44. Svorcova, L. Dire., 1977. Haltarbeit von Getränken mit fruchtsaft im Vergleich zu mit Saccharose und Saccharin gesübten Getränken. *Lebensm. Ind.* 24, 4. Pp 169-172
45. Svorcova, L. 1977. Mikrobiologische Problematik energiarmer Getränke. *Lebensm. Ind.*, 24, 12, Pp. 556-560
46. Thomas, Brock D. y Michael, T. M.1993. Microbiología .6ª edic. Ed. Prentice Hall Hispanoamericana S.A.(9):349-350
47. Turtura, G.C.; Samaja, T., 1978. Ricerche microbiologiche sulle bevande analcoliche. I. Identificazione di blastomiceti isolati da bibite preparate con aromatizzanti naturali. *Ann. Microbio*. Pp. 28, 1-9

48. Turtura, G.C.; Samaja, T., 1979. Ricerche microbiologiche sulle bevande analcoliche. II. Influenza degli aromatizzanti naturali sullo sviluppo dei blastomiceti. Ann. Microbiol, Pp. 28,15, 15-23
49. Varnam, A.H. y Sutherland, J. P. 1994. Bebidas. Tecnología, química y microbiología. Serie 2 Alimentos básicos. Editorial Acribia S.A. Pp. 77-130.
50. Vidales G.Ma.D. 1997. El mundo del envase. 2ª edic. Ed. G. Gili, S.A. de C.V. p. 59.
51. Voerkelius, A., 1968. Biologische Probleme bei Erfrichungsge tranken. Brauwelt, Pp. 70,108, 1284-1286
52. Vollmer, G.; Josst, G.; Schenker, D.; Sturm, W.; Vreden, N.. 1990 Elementos de bromatología descriptiva.. Editorial Acribia S.A. Zaragoza (España). Pp. 495