

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



Aislamiento e identificación de levaduras nativas  
causantes del deterioro en bebidas no carbonatadas a base  
de fruta

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en  
Biología

Gloria Estela Varillas Moreno

Lima, Perú

2019



**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



Aislamiento e identificación de levaduras nativas  
causantes del deterioro en bebidas no carbonatadas a base  
de fruta

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en  
Biología

Gloria Estela Varillas Moreno

Asesor: Mg. Juan Carlos Ramos Gorbeña

Lima, Perú

2019

# DEDICATORIA

A Dios,  
por darme fuerza y salud  
y quien me acompaña siempre.

A mis padres y hermano,  
por todo su amor, apoyo  
y comprensión.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres que son mi motivo para seguir adelante día tras día. Quienes con los valores que me inculcaron y sus consejos supieron guiarme en el transcurso de la vida. A mi hermano, quien me acompañó en esta etapa como uno más en ciencias biológicas y mis tías y prima que significan mucho para mí, quienes me han demostrado su apoyo y su fe en mí.

Agradezco a todos los que me brindaron su apoyo y así lograr desarrollar esta investigación. Mis profesores que han formado parte de mi crecimiento académico e inculcado herramientas necesarias para la investigación científica. Al profesor Juan Carlos Ramos por su paciencia, comprensión y todo el apoyo a lo largo de mi formación académica.

A mis amigas y compañeras que me acompañaron en esta etapa, por trabajar juntas, ayudarnos en los momentos difíciles y compartir diversas experiencias en nuestra etapa estudiantil.

# INDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Planteamiento del problema.....	4
1.2 Justificación de la investigación.....	4
1.3 Objetivo General.....	5
1.4 Objetivos Específicos.....	5
2. MARCO TEORICO.....	6
2.1 Bebidas no Carbonatadas (refrescos/néctares).....	6
2.2 Fermentación Alcohólica.....	6
2.3 Aditivos alimentarios.....	7
2.4 Coloración diferencial de Gram.....	9
2.5 Test de Fermentación de azúcares.....	9
2.6 Prueba Del Tubo Germinativo.....	9
2.7 Agar Papa Dextrosa.....	9
2.8 Agar Sabouraud Dextrosa.....	10
3. ANTECEDENTES.....	11

4. HIPÓTESIS.....	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
5.1 Lugar de ejecución.....	14
5.2 Tipo y diseño de investigación.....	14
5.3 Variables.....	14
5.4 Operacionalización de las variables.....	15
5.5 Muestreo.....	15
5.6 Procedimientos y análisis de datos.....	16
6. RESULTADOS.....	19
7. DISCUSIÓN.....	23
8. CONCLUSIONES.....	26
9. RECOMENDACIONES.....	26
10.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	27
11.ANEXOS.....	31

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla N°1.</b> Características en las bebidas no carbonatadas alteradas por levaduras .....	19
<b>Tabla N°2.</b> Componentes de las bebidas .....	20
<b>Tabla N°3.</b> Características morfológicas de las muestras en medio sólido y tinción Gram.....	21
<b>Tabla N°4.</b> Pruebas bioquímicas en las bebidas no carbonatas de durazno, mango, cranberry y chicha morada.....	22
<b>Tabla N°5.</b> Identificación de muestras de levaduras de cada bebida.....	22



## RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo aislar e identificar microorganismos causantes del deterioro de bebidas no carbonatadas a base de fruta. Siendo estas bebidas, por sus características, un medio ideal para el desarrollo de microorganismos tales como bacterias, mohos o levaduras, se utilizaron bebidas no carbonatadas a base de fruta que presentaban alteraciones en sus propiedades organolépticas.

Para la identificación de microorganismos se emplearon técnicas bioquímicas, identificaciones morfológicas y medios de cultivo. El estudio morfológico consistió en una evaluación macroscópica, microscópica y tubo germinativo. Las pruebas bioquímicas consistieron en fermentación de carbohidratos y como medio de cultivo se utilizó agar nutritivo, agar Sabouraud, agar Papa y agar MacConkey.

Las características fenotípicas y las pruebas bioquímicas determinaron la presencia de *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulopsis sp.* en las bebidas.

Estas levaduras predominaron en condiciones de refrigeración (7.2°C), toleraron los procesos de pasteurización y adición de conservantes. Encontrando en las bebida no carbonatadas a base de fruta condiciones favorables para su crecimiento y proliferación.

**Palabras clave:** *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis*, levaduras, bebidas no carbonatadas a base de fruta

## ABSTRACT

The objective of the present investigation was to isolate and identify microorganisms that cause the spoiled of non-carbonated beverages based on fruit. These drinks are the ideal medium for the development of microorganisms such as bacteria, molds or yeasts because it has the components that they need. Non-carbonated beverages based on fruit that had alterations in their organoleptic properties were used.

For the identification of microorganisms, biochemical techniques, morphological identifications and growth medium were used. The morphological study consisted of a macroscopic, microscopic evaluation and germinative tube. The biochemical tests consisted of fermentation of carbohydrates and as a growth medium, nutritive agar, Sabouraud agar, Potato Dextrose Agar and MacConkey agar were used.

The phenotypic characteristics and the biochemical tests determined the presence of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulopsis sp.* in the beverages.

These yeasts predominated under refrigeration conditions (7.2 ° C), tolerated the pasteurization processes and the addition of preservatives, they found favorable conditions for growth and proliferation in non-carbonated fruit-based beverages.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis*, yeast, non-carbonated fruit-based beverages

## INTRODUCCIÓN

Las levaduras “nativas o naturales” debido a su diversidad fisiológica pueden crecer en un amplio rango de hábitats, poseen la habilidad de utilizar azúcares simples presentes en los sustratos desempeñando diferentes procesos bioquímicos y ecológicos. Las frutas representan un micro hábitat importante para las levaduras debido a que poseen una alta concentración de azúcares simples, bajo pH y la constante visita de insectos vectores (Rosi & Domizio, 1994).

Las bebidas no carbonatadas a base fruta contienen endulzantes naturales o químicos, acidulantes, colorantes, antioxidantes, estabilizadores de acidez y conservantes; y se caracterizan por su bajo pH, baja actividad acuosa y escasez de oxígeno (Sobrero *et al.*, 2005). Estas características reducen mínimamente el ataque bacteriano, pero sus componentes son propicios para el desarrollo de levaduras y menor proporción los mohos (Cabrera, 2015).

La presencia de estos microorganismos alteran las propiedades organolépticas del producto, deteriorándolo y comprometiendo la salud pública, causando pérdidas económicas y dañando la imagen de la empresa productora.

Por esta razón la industria de alimentos y bebidas cuenta con un sistema de gestión que garantiza la calidad e inocuidad alimentaria a través del análisis y control de peligros biológicos, químicos y físicos (NACMCF, 1997) de esta manera se cumplen las especificaciones nutricionales de los productos y el mantenimiento de sus propiedades organolépticas a lo largo de toda su vida útil.

El estudio de los diversos microorganismos presentes en los concentrados de fruta es fundamental ya que de esta manera se garantiza estrategias de control en la prevención del deterioro de bebidas así como la salud de sus consumidores.

La presente investigación tuvo como finalidad el aislamiento de microorganismos y la identificación bioquímica de levaduras nativas que causan deterioro en bebidas no carbonatadas a base de fruta.

## **1.1 Planteamiento del problema**

La contaminación por microorganismos en bebidas no carbonatadas a base de fruta es un problema que los productores de estas bebidas deben enfrentar puntualmente en las diferentes etapas de su producción.

Los microorganismos causan el deterioro de estas bebidas alterando de diferente manera sus propiedades organolépticas; por ejemplo bacterias como *Alicyclobacillus* spp. confieren un sabor “a medicina” asociado a la formación en el zumo de compuestos utilizados con finalidad antiséptica. (Fernandez, 2016), la presencia de estos microorganismos esta relacionada con la microbiota en particular que representan estas bebidas, es así como especies tales como *Penicillium expansum*, *P. griseofulvum*, *P. citrinum*, *Aspergillus terreus* y *A. flavus* fueron aislados en jugos de naranja (Alemandri et al., 2005). También en jugos concentrados de naranja y mandarina fueron encontrados mohos xerófilos, mohos que toleran bajas concentraciones de oxígeno, mohos que metabolizan conservantes y hongos productores de toxinas, incluso *Neosartorya fischeri*, que se caracteriza por su termorresistencia. (Sobrero et al., 2005) (Anexo N°12 y 13).

De acuerdo a las características propias del producto y de un microorganismo en particular se podrían dar condiciones favorables para su desarrollo y proliferación. El deterioro que ocasionan a nivel industrial representa una gran pérdida económica para la empresa productora de estas bebidas, también se ven afectados los distribuidores y finalmente el consumidor poniendo en riesgo su salud.

## **1.2 Justificación de la investigación**

Las bebidas no carbonatadas a base de fruta son altamente susceptibles al deterioro por diversos microorganismos. Y este deterioro no siempre resulta evidente mediante una evaluación sensorial ya que la bebida podría o no presentar algún sedimento, formación de gas, cambio de color, olor o sabor. Es por ello que la identificación de estos microorganismos conllevaría a lo siguiente:

Mejora en los puntos críticos de control y establecer buenas prácticas de limpieza e higiene en la industria productora. Esta evaluación contribuiría en la mejora de tecnologías de procesamiento y la evaluación de calidad del producto. (Deák, 2007).

Evaluar el potencial deterioro que ocasionará el microorganismo, relacionando sus propiedades fisiológicas con los atributos que le suministra la bebida no

carbonatada a base de fruta, tal como el contenido nutricional, sus carbohidratos, su actividad acuosa (aw) y su bajo pH (Ray & Bhunia, 2008).

Caracterizar alguna levadura con potencial biotecnológico que sería de gran interés para las industrias por las diversas aplicaciones biotecnológicas que implicarían. (Guamán & Carvajal, 2009).

### ***1.3 Objetivo general***

Aislar microorganismos e identificar bioquímicamente levaduras nativas que causan deterioro en bebidas no carbonatadas a base de fruta.

### ***1.4 Objetivos específicos***

- Aislar microorganismos en medio selectivo
- Identificar bioquímicamente a los microorganismos aislados
- Determinar los parámetros físicos y químicos de los microorganismos

## MARCO TEÓRICO

### **2.1 Bebidas no Carbonatadas (refrescos/néctares)**

Los néctares son bebidas naturales preparados a partir principalmente de pulpa de fruta, natural o concentrada, sanas y maduras. Son elaboradas a partir de agua potable, azúcar o edulcorantes, saborizantes y colorantes naturales o artificiales. Estas bebidas no son alcohólicas y no contienen dióxido de carbono disuelto.

Esta bebida de fruta es un producto no pulposo o pulposo sin fermentar, pero fermentable, destinado al consumo directo, en algunos casos se agrega ácidos orgánicos, como el ácido cítrico y un espesante. (Livia, 1999) con o sin la adición de sustancias preservantes, vitaminas y otros aditivos alimentarios permitidos.

La adición de ácidos preservantes y estabilizadores está permitida cuando el contenido de jugo de fruta en el producto final no sea inferior al 5 %. (De Néctares & Carbonatadas, 2003).

Los jugos de frutas usados en la preparación de bebidas sin alcohol son ácidos (pH entre 3 y 4) y tienen un contenido de azúcares de hasta 15° Brix. (Ancasi, 2006)

### **2.2 Fermentación Alcohólica**

La fermentación alcohólica es la característica más llamativa de un gran número de levaduras; solo unos pocos azúcares, hexosas o polisacáridos, pueden ser fermentados por ellas (Déak, 2007). El mecanismo común para el metabolismo de carbohidratos por parte de los microorganismos es la conversión de glucosa-6-fosfato a piruvato. Bajo condiciones aeróbicas, el piruvato es oxidado por el ciclo del ácido tricarboxílico y la respiración. Bajo condiciones anaeróbicas, el piruvato es fermentado para formar etanol y dióxido de carbono (Déak y Beuchat, 1993). Existen especies de levaduras, *S. cerevisiae* por ejemplo, que son capaces de respirar y fermentar (Katz, 2012; Lagos, 2017). Levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* son más resistentes al etanol, la fermentación procede hasta el agotamiento de los azúcares o hasta que algún componente esencial para el crecimiento se agote o hasta que aparezca el efecto inhibitor de los metabolitos producidos durante la fermentación.

Las levaduras no-*Saccharomyces* durante la fermentación natural convierten los azúcares en etanol, dióxido de carbono y en un sin número de compuestos volátiles y no volátiles.

Los azúcares fermentables son la fuente de energía más importante en el metabolismo de levaduras. *Saccharomyces ludwigii* al igual que las demás levaduras utiliza vías metabólicas comunes para la degradación de azúcares. Los azúcares para ser utilizados deben ser transportados hacia el interior de la célula mediante mecanismos de transporte específicos. La velocidad de utilización de azúcares está influenciada por la concentración y el tipo de azúcar, la concentración de oxígeno disuelto en el medio, la temperatura de fermentación y el pH, entre otros factores.

Una vez dentro de la célula, el azúcar es fosforilado y así entra a la vía de la glucólisis, la cual termina en la formación de piruvato, proceso llevado a cabo en el citosol. Luego, el piruvato formado puede ser incorporado, bien al metabolismo respiratorio o al fermentativo, dependiendo de la concentración de azúcar (glucosa) y oxígeno disuelto en el medio. (Estela *et al.*, 2011)

### **2.3 Aditivos alimentarios**

Son sustancias o mezclas de sustancias de origen natural o artificial que normalmente no se consumen como alimento ni se usan como ingredientes característicos del alimento, pueden tener o no valor nutritivo y cuya adición intencional al alimento tiene un fin tecnológico, incluso organoléptico en la fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o conservación de ese alimento. (Bautista, 2013). Según el *Codex alimentarius*, el concepto de aditivo se refiere a cualquier sustancia que, independientemente de su valor nutricional, se añade intencionadamente a un alimento con fines tecnológicos en cantidades controladas. Para que una sustancia sea admitida como aditivo debe estar bien caracterizada químicamente y debe superar los controles toxicológicos establecidos por parte de los correspondientes organismos sanitarios. Son varios los organismos con competencias en materia de aditivos alimentarios. Así, la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS), creó un conjunto de comités que evalúan diversos aspectos de los aditivos. (Ibáñez & Irigoyen, 2003).

#### **➤ Conservante**

Son sustancias que prolongan la vida útil de los alimentos y bebidas protegiéndolos frente al deterioro causado por microorganismos. Previenen retardan o limitan la proliferación de microorganismos (bacterias, levaduras, hongos y mohos), presentes en los alimentos o con los que estos pueden contaminarse. La presencia de conservadores puede ser necesaria para garantizar el mantenimiento de la calidad (propiedades organolépticas y valor nutritivo) y de la seguridad higiénico–sanitaria de los productos elaborados.

Son por lo tanto, motivos de tipo sanitario y económico los que justifican su uso. (Bautista, 2013)

Los conservadores se adicionan con el propósito de controlar el crecimiento de microorganismos (bacterias y hongos), y pueden ser químicos o naturales (bioconservadores). Entre los conservadores químicos se encuentran el benzoato de sodio, el ácido sórbico, sulfitos, nitritos, nitratos, peróxido de hidrógeno y cloruro de sodio. (Barboza *et al.*, 2004)

➤ **Sorbato de Potasio**

Los sorbatos se utilizan muy ampliamente, en particular para la protección contra mohos, retarda el crecimiento de hongos y bacterias. El pH debe ser inferior a 6.5 (aumenta la efectividad a medida que el pH disminuye). La toxicidad de los sorbatos es baja, porque se metaboliza con el resto de ácidos grasos y la ventaja es que no proporciona olores ni sabores extraños a los alimentos. (Bautista, 2013).

➤ **Benzoato de Sodio**

El benzoato de sodio como aditivo alimentario es usado como conservante, matando eficientemente a la mayoría de levaduras, bacterias y hongos. El benzoato sódico sólo es efectivo en condiciones ácidas (pH<3,6). (Bautista, 2013)

➤ **Ácido cítrico**

El ácido cítrico se utiliza principalmente en la industria alimentaria debido a su agradable sabor ácido un su alta solubilidad en agua. El uso de compuestos acidulantes en la conservación y mejora de propiedades organolépticas en alimentos es extenso, en particular, los ácidos que contienen uno o más carboxilos son aditivos alimentarios importantes. En bebidas proporciona acidez y complementa los sabores de las frutas y bayas. Aumenta la eficacia de los conservantes antimicrobianos. Se utiliza en el ajuste del pH para proporcionar una acidez uniforme.

El principal uso es la acidificación y control del pH en el producto final. Un pH bajo, retarda el crecimiento de microorganismos indeseables (principalmente bacterias) y aumenta la efectividad de conservadores como benzoatos y sorbatos. Asimismo, reduce la necesidad de tratamientos térmicos drásticos durante la esterilización de frutas (Muñoz, *et al.*, 2014).



## ***2.4 Coloración diferencial de Gram***

La tinción diferencial de Gram, en el caso de levaduras se utiliza para poder referirse a la morfología celular e identificar la presencia de posibles contaminaciones con otros microorganismos. Está compuesto por la solución de cristal violeta, solución de yodo (Iugol), decoloración con etanol-acetona y el colorante de fondo Safranina 1%. (Kurtzman & Boekhout, 2011)

## ***2.5 Test De Fermentación De Azucares***

Se determina la capacidad de asimilación y fermentación de la levadura frente a los siguientes azúcares: glucosa, galactosa, maltosa, sacarosa, lactosa. Para ello se utiliza utilizando un medio base de fermentación compuesto por 0.45% extracto de levadura, 0.75% peptona de carne (Kurtzman & Boekhout, 2011) conteniendo diferentes azúcares galactosa, glucosa, maltosa, lactosa y sacarosa al 1%, y utilizando como indicador del medio, púrpura de bromocresol. Una fermentación positiva por formación de ácido estará indicada por viraje del indicador del púrpura al amarillo.

En caso de que se produzca gas, éste se acumulará en el tubo de Durham. Según la producción de gas la fermentación del azúcar se clasifica en fuerte, si en los tres primeros días se llena la campana; trabajo débil, si la campana está parcialmente llena; trabajo muy débil si solo presenta una burbuja; lenta, si la fermentación se produce pero despacio y por último ausente. (Kurtzman & Boekhout, 2011)

## ***2.6 Prueba Del Tubo Germinativo***

El tubo germinal es una extensión filamentosa de la levadura, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre. (Kurtzman & Boekhout, 2011)

## ***2.7 Agar Papa Dextrosa***

Es un medio utilizado para el cultivo de hongos y levaduras, la infusión de papa promueve un crecimiento abundante de los hongos y levaduras. Permite la observación de las levaduras a diferentes temperaturas. (Kurtzman & Boekhout, 2011)

## **2.8 Agar Sabouraud Dextrosa**

Se utiliza para el aislamiento y el cultivo de hongos (levaduras, mohos y dermatofitos). Se para la identificación y mantenimiento de la mayoría de los hongos patógenos. Para mejorar la inhibición bacteriana se puede adicionar cloramfenicol 0,5 g/L. (Kurtzman & Boekhout, 2011)

## ANTECEDENTES

(Orberá, 2004) Menciona que la aparición de contaminaciones en alimentos y bebidas por levaduras, se debe al uso de tecnologías modernas de elaboración donde utilizan condiciones de procesamiento menos exigentes para mantener el sabor, olor y color naturales, con el propósito de consumir productos cada vez más sanos, existe una tendencia a reducir el uso de preservantes y a la producción de alimentos bajos en calorías, en los cuales no existen elevadas concentraciones de solutos, que reducen la actividad acuosa (aw) lo que le confiere un efecto preservante, por lo que se favorece la aparición de levaduras contaminantes en siropes, concentrados de frutas y vegetales.

(Davidson *et al.*, 2005) Mencionaron que la exposición de *Saccharomyces cerevisiae* en ácido sórbico causa una fuerte inducción de dos proteínas de membrana plasmática, una de ellas encargada de transportar el cassette de unión ATP (adenosin trifosfato), que es esencial para su adaptación y para que crezca bajo condiciones bajas de acidez, confiriéndole resistencia a la acidez mediante una dependencia energética de agua soluble en iones carboxilos.

(Hidalgo, 2007) Expone que en el Perú existe un Reglamento sobre Vigilancia y Control Sanita - rio de Alimentos y Bebidas, aprobado por Decreto Supremo 007-98- SA. Y más recientemente contamos con el proyecto Norma Sanitaria sobre el Procedimiento para la Aplicación del Sistema HACCP en la Fabricación de Alimentos y Bebidas (prepublicado con Resolución Ministerial 482-2005/Minsa el 29 de junio del 2005).

(Calderón, 2009) Mencionó que en una evaluación de la calidad microbiológica y físicoquímica de refrescos no carbonatados listos para beber comercializados en el área metropolitana de San Salvador, recolectaron 102 muestras para análisis de tipo físicoquímico y recuento de microorganismos mesófilos aerobios, recuento de mohos y levaduras e identificación de *Escherichia coli*. Según los resultados de los análisis, en el 22,5% de los casos estuvieron presentes los microorganismos mesófilos aerobios y sobrepasaron los límites establecidos.

(López *et al.*, 2009) Recolectaron diversas bebidas preparadas (fresa, guayaba, horchata, Jamaica, limón, mango, melón, naranja, papaya, sandía, tamarindo y piña) para evaluar las condiciones higiénico-sanitarias. Analizaron que para el caso de los hongos y levaduras eran las instalaciones y utensilios de preparación los posibles reservorios, que al contacto con la fruta la contaminan. Los hongos y levaduras fueron los microorganismos que más se presentaron

en la mayoría de las muestras analizadas con 57.6%, seguidas de las bacterias coliformes con un 51.52%, y por último con un 24.25% los mesófilos

(Fleet, 2011) Indicó que el deterioro por levaduras en los alimentos ocurre donde la competencia en el crecimiento bacteriano es retardado o impedido por su pH bajo, alto contenido de azúcar, productos conservados con ácidos débiles y productos congelados (condiciones de procesamiento y almacenamiento). Lo que ocasiona la susceptibilidad al deterioro por levaduras de fermentación es la concentración de azúcar de hasta 10%, pH entre 3.0 – 3.5 y condiciones relativamente libres de oxígeno en la bebida no carbonata. Finalmente un fracaso en la asepsia y control durante el proceso de producción conduce a la contaminación y el deterioro por levaduras que son generalmente resistentes a los conservantes añadidos.

(Smit *et al.*, 2011) Mencionaron que los productos ácidos por su bajo pH actúan como medida de control natural contra el deterioro de la mayoría de las bacterias. Sin embargo, bebidas a base del zumo de fruta son susceptibles al deterioro por levaduras, micelios de hongos y bacterias ácido lácticas, convirtiéndose así en una amenaza creciente para la industria de bebidas a base de frutas. Causando la descomposición del producto, lo que conlleva a pérdidas financieras y la pérdida de los consumidores. Por lo tanto, el conocimiento de las condiciones de almacenamiento, la temperatura, las condiciones favorables para el crecimiento de estos microorganismos son necesarios.

(Wallis, 2013) Observó en estudios con *Saccharomyces cerevisiae*, que la trehalosa era un compuesto importante para la supervivencia de las células cuando se expone al estrés osmótico severo. Las tasas de mortalidad fueron más bajas en las células que contenían más trehalosa intracelular. La trehalosa también puede estar relacionada con la resistencia al estrés térmico, ya que se encontraron grandes cantidades de trehalosa en células de *S. cerevisiae* que fueron sometidas a choque térmico, pero los suministros de trehalosa rápidamente desaparecieron cuando las células fueron devueltas a temperatura ambiente.

(Rendueles & Díaz 2014) Describen la utilización de diversos microorganismos en distintos productos de base biológica con interés comercial. Levaduras del género *Saccharomyces* son utilizadas en la fermentación alcohólica de diversos sustratos, en la producción de proteína unicelular. También mohos y hongos superiores en diversos procesos, setas en purines o compost sintético. Las enzimas, como las lipasas (obtenidas principalmente de hongos y levaduras) se usan en detergentes, alimentación, biodiesel.

(Baldarrago & Delgado, 2015) En su estudio de mercado sobre las bebidas no carbonatadas a base de fruta, proporcionaron las estadísticas de producción de jugos, néctares y bebidas de fruta en la cual muestran un constante crecimiento desde el año 2005 hasta el 2012. Este crecimiento sostenido pone en evidencia un mayor consumo de los productos que tienen como materia prima las diversas frutas existentes en el mercado peruano

(Burbano, 2015) Condiciona un medio de cultivo, el cual lo acidifica a un pH de 3,5, en el cual evidencia la supervivencia de los hongos y levaduras pero una eliminación de la mayoría de las bacterias. Finalmente, las condiciones de aerobiosis y la incubación a una temperatura de  $25 \pm 1$  °C, da como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos.

(Álvarez, 2016) Hace referencia a los factores que afectan el proceso, la pasteurización suele modificar de manera positiva o negativa muchos alimentos. Las bebidas son pasteurizadas a temperaturas bajas al igual que su pH el cual no debe sobreponerse a valores de 4 a 5, esto se debe a que si el pH es elevado permitirá el crecimiento de bacterias. Es así como la temperatura influye en los tipos de microorganismos que se desarrollan y los tipos de descomposición que tendrá el producto.

(Tarifa, 2017) Describe a las bacterias lácticas, mohos y levaduras como parte de la microbiota de las bebidas a base de fruta y siendo las bacterias lácticas las responsables del deterioro primario de jugos de frutas, sin embargo su número se reduce considerablemente después de los procesos de pasteurización, concentración y refrigeración. Por otro lado, los mohos y las levaduras toleran mejor estas condiciones además de tolerar altas presiones osmóticas, bajo pH y crecer a temperaturas de refrigeración; transformándolas en las principales responsables del deterioro del producto ya procesado.

## **HIPÓTESIS**

Si las propiedades organolépticas de las bebidas no carbonatadas a base de frutas se ven alteradas entonces podría estar relacionado a una contaminación por bacterias, hongos o levaduras.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***5.1 Lugar de ejecución***

Laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas.  
Universidad Ricardo Palma

### ***5.2 Tipo y diseño de investigación***

Investigación básica  
No experimental, descriptivo - observacional

### ***5.3 Variables***

Identificación de levaduras presentes en las bebidas no carbonatadas a base de fruta.

Características de las levaduras y bebidas no carbonatadas a base de fruta.

#### 5.4 Operacionalización de las variables

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	INDICADORES
<b>Aditivos alimentarios</b>	Cualitativa	Nominal	- Antioxidantes - Reguladores de acidez - Conservantes
<b>Morfología macroscópica</b>	Cualitativa	Nominal	- Forma - Tamaño - Color
<b>Morfología microscópica</b>	Cualitativa	Nominal	- Forma - Tamaño - Color
<b>pH</b>	Cuantitativa	Ordinal	- Ácido - Básico
<b>Tubo germinativo</b>	Cualitativa	Nominal	- Positivo - Negativo
<b>Crecimiento a 37° C</b>	Cualitativa	Nominal	- Positivo - Negativo
<b>Fermentación de azúcares</b>	Cualitativa	Nominal	Fermentación Glucosa Fermentación Maltosa Fermentación Lactosa Fermentación Galactosa

#### 5.5 Muestreo

Las muestras fueron proporcionadas por la Empresa Selva Industrial que durante la etapa de almacenamiento de sus productos evidenciaron alteraciones (hinchazón) en las botellas de sus bebidas antes de cumplir su fecha de caducidad. Estas bebidas (Anexo - Figura N°1) fueron separadas de sus respectivos lotes y trasladadas al laboratorio de Laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma, donde se almacenaron para su posterior análisis.

## **5.6 Procedimientos y análisis de datos**

### **➤ Obtención y almacenamiento del material biológico**

Las bebidas no carbonatadas a base de fruta, se obtuvieron de lotes eventuales producidos por la empresa Selva Industrial. La composición de las bebidas fue detallada antes de su procesamiento (Tabla N°2.). Luego fueron almacenadas en el laboratorio de microbiología a temperatura ambiente y refrigerados (4°C) una vez abiertos.

### **➤ Procesamiento de muestras**

Las muestras fueron procesadas desde inicios de Agosto del 2016. Se describió el estado de los envases que contenían las bebidas no carbonatas a base de fruta, los cuales estaban sellados e hinchados (Anexo - Figura N°2). Cuando fueron abiertos se desprendió el CO<sub>2</sub> generado, producto de la fermentación (Anexo - Figura N°3). También se observó en la base de la botellas un precipitado (Anexo - Figura N°4)

Se utilizaron 100mL de agar MacConkey marca Merck, 400mL de agar nutritivo marca Merck, 400mL agar Sabouraud marca Merck y 400mL agar papa dextrosa, los cuales fueron autoclavados y posteriormente servidos en placas Petri estériles y una vez enfriados se almacenaron en una estufa entre 30 - 37 °C por 24 horas.

Luego de las 24 horas y sin presencia de contaminación en las placas, se procedió a rotular las placas de acuerdo a la muestra que fue sembrada (D = Durazno, MG = Mango, CR = Cranberry y CH = Chicha Morada).

El área de trabajo fue esterilizada con alcohol 70% y minutos después se encendió el mechero Meker-Fisher. Las bebidas de durazno, mango, cranberry y chicha morada fueron homogenizadas. Una vez abierta la bebida, con un hisopo estéril, se tomó una pequeña porción de muestra y fue sembrado en cada una de las diferentes placas. Se repitió este proceso con cada una de las bebidas.

Previamente a la incubación, las placas fueron agrupadas y selladas con cinta adhesiva a los lados para evitar alguna posible contaminación. Finalmente se llevó a la estufa entre 30 - 37 °C por un periodo de 48 a 72 horas.



➤ **Determinación de pH**

Se utilizó un pHmetro para medir el pH en cada una de las bebidas. Se colocó 10 mL de cada una de las muestras en un vaso de precipitado, se introdujo el pHmetro y se realizó la medición de pH.

➤ **Caracterización morfológica de levaduras**

Para caracterizar las colonias de levaduras, se observaron en medio sólido. A las 48 horas de evidenció crecimiento en el agar nutritivo, Sabouraud y agar papa. En el agar MacConkey, no se evidenció crecimiento.

Se observaron las colonias en todas las placas de acuerdo a la bebida a la que pertenecían y se detallaron las características de las colonias tomando en cuenta la forma, tamaño y color. (Anexo - Figura N°5 y N°6)

De estas colonias se tomó una muestra de cada bebida y se realizó una coloración simple con Cristal violeta y la tinción Diferencial de Gram para observar su morfología microscópica. (Anexo - Figura N°7 y 9)

Adicionalmente se realizó la prueba de prueba de tubo germinativo (Anexo - Figura N°11)

➤ **Aislamiento de levaduras**

Las colonias seleccionadas fueron sembradas por estrías en agar Sabouroud y luego incubadas a una temperatura entre 30 - 37 °C por un periodo de 48 a 72 horas. (Anexo - Figura N°8)

➤ **Conservación de cepas aisladas**

Finalmente una vez terminada la incubación de las colonias aisladas, estas placas fueron refrigeradas hasta su posterior identificación bioquímica.

➤ **Identificación bioquímica de levaduras nativas**

La identificación bioquímica (Tabla N°4) fue realizada por FSCertificaciones, Jr. Monterrey 221 Of. 228 - Santiago de Surco, Lima - Perú. Esta identificación consistió en realizar pruebas bioquímicos a cada cepa con el objetivo de determinar las características fenotípicas de cada microorganismo presente en

la bebida. Posteriormente se procedió a comparar el fenotipo encontrado con claves taxonómicas y software para identificar la especie. (Anexo - Figura N°10)

Pruebas bioquímicas diferenciales fueron:

- Fermentación Glucosa
- Fermentación Lactosa
- Fermentación Maltosa
- Fermentación Galactosa

➤ ***Tolerancia a preservantes***

Se procedió a sembrar las cepas en el medio PRY (Preservative Resistant Yeast Medium) a fin de evaluar si presentaban tolerancia a preservantes. El PRY está compuesto por Manitol (10 g), extracto levadura (10 g), ácido acético glacial (10 mL), agar (15 g) y agua destilada (1 L).

➤ ***Análisis de datos***

Para el análisis de datos se elaboraron tablas descriptivas, indicando la composición y características de las bebidas, características morfológicas macro y microscópicas de las levaduras. Y tablas comparativas entre la levadura encontrada y la bebida de procedencia.

## RESULTADOS

Las especies de levadura identificadas fueron *Saccharomyces cerevisiae* para las bebidas sabor durazno, mango y chicha morada y *Torulopsis* sp. Esta identificación consistió en un análisis morfológico y fisiológico del microorganismo que contaminó las bebidas.

Se realizó un análisis sensorial a cada sabor de bebida y se detallaron sus características, las cuales incluyó su fecha de caducidad, turbidez que correspondía con la presencia o ausencia de precipitado, la presencia de CO<sub>2</sub>, olor (Tabla N°1). Asimismo se determinó el pH de cada una de ellas. Todas estas características resultaron ser un indicador de alteración de sus propiedades organolépticas.

**Tabla N°1.** Características en las bebidas no carbonatadas alteradas por levaduras

BEBIDA	DURAZNO	MANGO	CRANBERRY	CHICHA MORADA
FECHA DE VENCIMIENTO INDICADA EN EL ENVASE	30/Oct/2016	01/Ene/2017	30/Ago/2016	19/Nov/2016
TURBIDEZ	Presencia de precipitado	Clara	Presencia de precipitado	Clara
CO <sub>2</sub>	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
OLOR	Frutal fermentado	Frutal fermentado	Frutal fermentado	Frutal fermentado
pH	4,2	3,3	2,4	4,2
CRECIMIENTO A 37°C	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
TUBO GERMINATIVO	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Los diversos conservantes, tales como el benzoato de sodio, sorbato de potasio y ácido sorbico confieren protección contra una variedad de microorganismos, las cepas que se lograron aislar fueron sometidas a un ensayo de tolerancia a preservantes utilizando como medio PRY (Preservative Resistant Yeast Medium), el cual resulto negativo, no presentó crecimiento.

La presencia de estos conservantes y composición de cada sabor de bebida se encuentra detallada en la Tabla N°2

**Tabla N°2.** Componentes de las bebidas

BEBIDA	DURAZNO	MANGO	CRANBERRY	CHICHA MORADA
SABOR	Concentrado de Durazno	Pulpa de Mango	Jugo concentrado de Arándano	Piña, membrillo, manzana, maíz morado, canela y clavo de olor
	Sabor durazno	Sabor idéntico al natural	-	-
	Emulsión de durazno	-	-	-
AGUA	Agua	Agua filtrada	Agua tratada	Agua tratada
AZUCAR	Azúcar	Azúcar	Azúcar	Azúcar
	Edulcorante (E-951)	Stevia	-	-
COLORANTES	Betacaroteno	Betacaroteno	-	-
	Enturbiante (E-171)	-	-	-
ESPESANTES, ESTABILIZANTES Y EMULSIONANTES	Estabilizante (E-466)	-	-	CMC (SIN-466)
	Goma Xantan	Goma Xantan	-	-
ANTIOXIDANTES Y REGULADORES DE ACIDEZ	Ácido cítrico	Ácido cítrico	-	Ácido cítrico (SIN-330)
	Vitamina C	-	Vitamina C	-
	-	Eritorbato de sodio	-	-
	-	Citrato de sodio (E-331)	-	-
CONSERVANTES	Benzoato de sodio (E-211)	Benzoato de sodio (E-211)	Benzoato de sodio (E-211)	-
	Sorbato de potasio (E-202)	Sorbato de potasio (E-202)	Sorbato de potasio (E-202)	Ácido sorbico (SIN-200)

Se realizó una tinción Gram para determinar la morfología microscópica de cada muestra, donde los microorganismos resultaron ser Gram positivo y células con forma ovaladas para las bebidas de durazno, mango y chicha morada, mientras que la muestra obtenida de la bebida de cranberry presentó células alargadas con bordes curvos.

El crecimiento de *S. cerevisiae* en el cultivo fue de 24 horas, mientras que el crecimiento de *Torulopsis* sp. en el cultivo fue de 48 a 72 horas.

En el medio de cultivo (agar nutritivo, agar Sabouraud y agar Papa) se evidenciaron colonias redondeadas, convexas, cremosas blanquecinas. Existió una diferencia en el tamaño de las colonias, siendo las colonias de *Torulopsis* sp. más pequeñas que las de *Saccharomyces*. (Tabla N°3).

**Tabla N°3.** Características morfológicas de las muestras en medio sólido y tinción Gram.

<b>MUESTRA DE LEVADURAS</b>	<b>MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA</b>	<b>MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA</b>
<b>DURAZNO</b>	Colonias de forma esférica, ovalada, alargada y convexa. Aspecto cremoso de color blanquecino, lechoso. Aproximadamente de 3 mm de diámetro.	Células ovaladas, Gram positivo
<b>MANGO</b>	Colonias de forma esférica, ovalada, alargada y convexa. Aspecto cremoso de color blanquecino, lechoso. Aproximadamente de 3 mm de diámetro.	Células ovaladas, Gram positivo
<b>CRANBERRY</b>	Colonias de forma esférica, ovalada y convexa. Aspecto cremoso de color blanquecino, lechoso. Aprox. de 1 mm de diámetro.	Células alargadas con bordes curvos, Gram positivo
<b>CHICHA MORADA</b>	Colonias de forma esférica, ovalada, alargada y convexa. Aspecto cremoso de color blanquecino, lechoso. Aproximadamente de 3 mm de diámetro.	Células ovaladas, Gram positivo

Las pruebas bioquímicas consistieron en la capacidad del microorganismo en fermentar los siguientes carbohidratos: glucosa, maltosa, lactosa y galactosa. Todos los microorganismos provenientes de cada una de las bebidas fermentaron la glucosa, los microorganismos procedentes de las bebidas de durazno, mango y chicha morada fermentaron la maltosa y galactosa y ninguno de ellos fermentó la lactosa. Tabla N°4

**Tabla N°4.** Pruebas bioquímicas en las bebidas no carbonatas de durazno, mango, cranberry y chicha morada.

<b>BEBIDA PRUEBA</b>	<b>DURAZNO</b>	<b>MANGO</b>	<b>CRANBERRY</b>	<b>CHICHA MORADA</b>
<b>FERMENTACION GLUCOSA</b>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<b>FERMENTACION MALTOSA</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
<b>FERMENTACION LACTOSA</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
<b>FERMENTACION GALACTOSA</b>	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo

Finalmente, el aislamiento y mediante la caracterización morfológica y bioquímica, se logró identificar las levaduras causantes del deterioro de bebidas no carbonatadas de sabor durazno, mango, cranberry y chicha morada. Las especies de levadura identificadas fueron *Saccharomyces cerevisiae* para las bebidas sabor durazno, mango y chicha morada y *Torulopsis* sp. para la bebida de cranberry (Tabla N°5).

**Tabla N°5.** Identificación de muestras de levaduras de cada bebida

<b>MUESTRA</b>	<b>ESPECIE IDENTIFICADA</b>
<b>DURAZNO</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>MANGO</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>CRANBERRY</b>	<i>Torulopsis</i> sp
<b>CHICHA MORADA</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

## DISCUSIÓN

Los estudios realizados por López et al. (2009) identificaron una variedad de especies en bebidas de chicha de maíz, piña y arracacha, las más representativas fueron: *Candida tropicalis*, *Pichia kluyveri*, *Pichia guilliermondii*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida maltosa*, *Rhodotorula glutinis*, *Torulaspota del brueckii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania exigua*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lypolitica*, *Candida parapsilosis*, *Debaromyces hansenii*, *Cryptococcus arboriformis*, *Saccharomyces martiniae*, *Dekkera anomala*, *Aureobasidium pullulans* y *Candida pseudo intermedia*. En este estudio se identificaron dos especies de levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* en las bebidas no carbonatadas sabor durazno, mango y chica morada y *Torulopsis* sp. en la bebida no carbonatada de cranberry.

En la investigación realizada por Huaman (2010) menciona la algunas cepas de *Saccharomyces* segregan en el medio compuestos proteicos conocidas como toxinas killer, las cuales representan uno de los mecanismos de antagonismo entre levaduras en fermentaciones espontaneas. Con lo cual la evidencia en este estudio la presencia de un solo tipo de levadura en la contaminacion de bebidas no carbonatadas a base de fruta. Asimismo debido a la abundante formación de alcohol y la falta de oxígeno, las especies de levaduras aerobias van deteniendo su desarrollo, muriendo gran parte de ellas. De esta manera frente a condiciones anaerobias prevalece un solo tipo de levadura. (Carretero, 2011).

Las levaduras son los microorganismos representativos de la fermentación natural y espontánea. Durante toda la fermentación, se ha comprobado que prácticamente existe solo un tipo de levadura que domina el proceso fermentativo, y aunque se han aislado otros tipos, su presencia no influye en la misma proporción. (procesoliva, 2016). Las bebidas analizadas ya presentaban alteraciones en sus propiedades organolépticas que indicaban la posible contaminación por microorganismos, la producción de CO<sub>2</sub> fue un indicio de presencia de levaduras fermentativas.

Las bebidas no carbonatadas a base de frutas presentan características que no suelen ser aptas para el desarrollo de microorganismos, por ejemplo baja actividad acuosa, pH ácido, escasez de oxígeno, procesos de pasteurización y preservación. Todas estas cualidades logran disminuir la carga bacteriana (Sobrero et al., 2005). Sin embargo, la microbiota más probable de encontrar en estas condiciones está constituida por mohos y levaduras porque toleran un pH relativamente bajo y una alta presión osmótica, además el contenido de azúcares es beneficioso para su crecimiento (Ancasi et al., 2006). Estos

estudios concuerdan con los resultados encontrados ya que no se evidenció la presencia de bacterias y las levaduras prevalecieron por las condiciones del medio.

El tiempo de crecimiento en los diferentes medios de cultivo se basa en el tipo de metabolismo que poseen las levaduras. Siendo especies como *Torulopsis sp.* poseen metabolismo oxidativo (procesoIva, 2016) es así como su crecimiento fue de 48 a 72 horas del cultivo de la bebida de cranberry ya que la falta de disponibilidad de oxígeno pudo haber afectado su velocidad de crecimiento. En cambio la levadura *Saccharomyces cerevisiae* posee un metabolismo oxidativo y fermentativo; es así como expuestas a las mismas condiciones de incubación, ésta solo requirió 24 horas para su desarrollo y proliferación.

El aumento en la presión interna de las botellas fue un indicador puntual de la presencia de levaduras tal como lo indican Davidson *et al.*, (2005) la mayoría de levaduras son fermentadoras causando la formación de etanol y CO<sub>2</sub> provocando la ruptura y explosión de sus envases.

Algunas levaduras alteran el ambiente en que se encuentran cambiando el pH o degradando los conservantes ácidos. Otras, como *Saccharomyces cerevisiae* y *Z. bailii*, se adaptan y pueden crecer hasta pH 2,8 ya que poseen un sistema enzimático que produce solutos compatibles. *S. cerevisiae* es capaz de fermentar sacarosa y puede emplear el ácido benzoico y sórbico como fuente de carbono. (Ancasi *et al.*, 2006).

Entre los conservantes presentes en las bebidas no carbonatadas a base de fruta de este estudio se encontraban el ácido sórbico que fue utilizado como conservante en la bebida chicha morada, sorbatos y benzoatos en las bebidas de durazno, mango y cranberry. Además de que las bebidas no carbonatadas a base de frutas son un medio vulnerable al deterioro por levaduras, estas presentan resistencia a sorbatos y a la pasteurización; Cabrera, (2015) menciona que el efecto de los sorbatos disminuye cuando la célula se ha adaptado al sorbato en un medio con glucosa o sucrosa). No obstante, la ausencia de bacterias competidoras y su rápido crecimiento anaeróbico favorecen la prevalencia de levaduras termoresistentes, psicotróficas y osmotolerantes (Deák & Beuchat, 1993), siendo estas la flora predominante frente a los hongos. . La prevalencia de *S. cerevisiae* en las bebidas de durazno, mango y chicha morada que tenían diferentes conservantes, evidencia la capacidad de adaptación de esta levadura

Las bebidas analizadas se encontraban dentro de su fecha de vencimiento, sin embargo se evidenciaron alteraciones físicas que conllevaron a sospechar de una probable contaminación por microorganismos, Ayasta (2018) menciona



que en las bebidas no alcohólicas donde se someten a tratamientos conservantes, se utiliza de 0,1 a 0,15% de sorbato de potasio y dado que llegará disuelto a la bebida, es recomendable que se realice un tratamiento conservante posterior a la adición de sorbato de potasio ya que no se garantiza la preservación de la bebida. La temperatura influye en la preservación del producto, *S. cerevisiae* posee una gran tolerancia a los conservantes pero no tolera temperaturas por encima de los 40°C. De la misma forma la higiene en cada etapa del procesamiento es fundamental ya que *Torulopsis* sp. prevalece donde la limpieza es inadecuada.

## CONCLUSIONES

- Se determinó que la flora predominante en bebidas no carbonatas a base de fruta son las levaduras.
- Los microorganismos aislados e identificados bioquímicamente en las bebidas no carbonatadas a base de fruta fueron *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulopsis* sp.
- Las características similares en las bebidas de sabor durazno, mango y chicha morada resultaron ser el medio ideal para la proliferación de *Saccharomyces cerevisiae*

## RECOMENDACIONES

Se recomienda ampliar la investigación sobre microorganismos nativos de diferentes frutas utilizadas en la industria de las bebidas.

Se recomienda contar con un buen sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control. Desde la recepción de la materia prima ya que durante su procesamiento las levaduras encontrarán un medio propicio por los componentes característicos del producto que será apto para su desarrollo y proliferación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

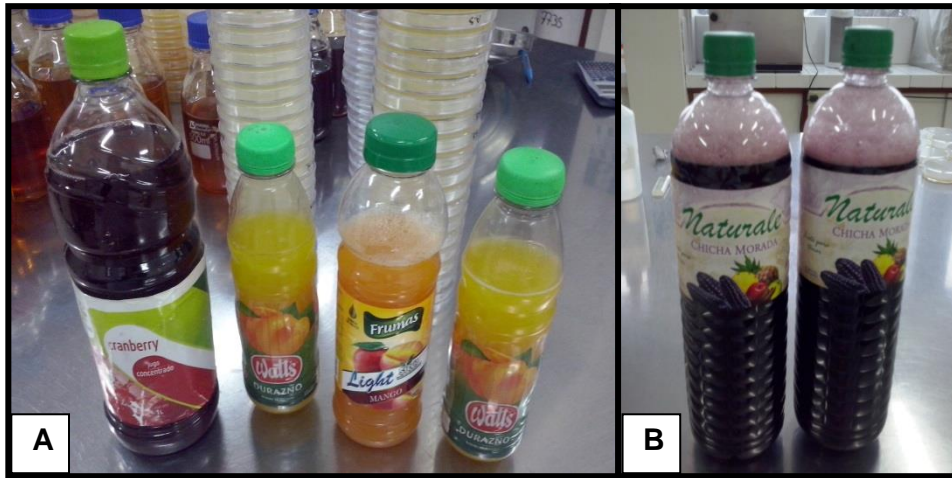
- Alemandri, V., Sobrero, M. S., Basílico, M. L., Sanchis, J. C., & Basílico, J. C. (2005). Determinación de la capacidad toxicogénica de mohos aislados de jugos cítricos. *FABICIB*, 8(1), 241-248.
- Alimentarius, C. (2005). Norma general del codex para zumos (jugos) y néctares de frutas. *Codex Stan*, 247, 21.
- Álvarez Cada, P. E. (2016). Determinación de parámetros microbiológicos en un producto pasteurizado de consumo humano mediante método y técnica microbiológica. (Tesis de Licenciatura).
- Ancasi, E. G., Carrillo, L., & Ahrendts, M. B. (2006). Mohos y levaduras en agua envasada y bebidas sin alcohol. *Revista Argentina de Microbiología*, 38, 93-96.
- Ayasta, C., & Mirelly, A. V. (2018). Estudio del efecto conservante del quitosano en una bebida no gasificada, tipo emoliente.
- Bautista Haro, K. M. (2013). Elaboración de una bebida nutritiva utilizando: spirulina (*Spirulina platensis*), y mora (*Morus nigra*), con tres concentraciones y dos tipos de conservantes (Benzoato de sodio y Sorbato de potasio) (Bachelor's thesis, LATACUNGA/UTC/2013).
- Baldarrago, K. N. U., & Delgado, J. A. P. (2015). Implementación de una planta de elaboración de bebida de papaya (*Carica papaya*) con linaza (*Linum usitatissimum*). *Ingeniería Industrial*, 1(1), 181-203.
- Barboza-Corona, J. E., Vázquez Acosta, H., Salcedo-Hernández, R., & Bautista-Justo, M. (2004). Probióticos y conservadores naturales en alimentos. Universidad de Guanajuato, Dirección de Investigación y Posgrado.
- Burbano Moreano, J. J. (2015). Influencia de la pasteurización abierta y al vacío en las propiedades fisicoquímicas y la aceptabilidad de un néctar de piña (*Ananas comosus* L.), naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) y borjój (*Borojoa patinoi* Cuatrec.).
- Cabrera Becerra, D. (2015). Investigación y control de levaduras en una línea de producción de bebidas (Master's thesis, Universidad del Azuay).

- Calderón, G. (2009). Estudio de caso—Enfermedades transmitidas por alimentos en El Salvador. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico: estudios de caso en Costa Rica, el Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua, 76-78.
- Carretero, F. (2011). Procesos de fabricación de bebidas alcohólicas. Consultado en Febrero, 20, 2012.
- Davidson, P. M., Sofos, J. N., & Branen, A. L. (Eds.). (2005). Antimicrobials in food. CRC press.
- Deák, T. (2007). Handbook of food spoilage yeasts. CRC press, Boca Raton, FL.
- Deák, T. & Beuchat, L. R. (1993) Yeasts associated with fruit juice concentrates. J. Food Protect. 56:777–782.
- Deák, T. & Beuchat, L. (1996). Yeast in Specific Types of Foods. Handbook of Food Spoilage Yeast. New York, CRC Press. 76 -15
- De Nectares, N. D. E., & Carbonatadas, J. Y. B. N. Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense. Norma, 3, 043-03.
- Estela-Escalante, W., Rychtera, M., Melzoch, K., Hatta-Sakoda, B., Ludeña-Cervantes, Z., Sarmiento-Casavilca, V., & Chaquilla-Quilca, G. (2011). Actividad fermentativa de *Saccharomyces Ludwigii* y evaluación de la síntesis de compuestos de importancia sensorial durante la fermentación de jugo de manzana. Tip. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 14(1).
- Fernández, M. P. F. (2016). Desarrollo de métodos rápidos para la detección de *Alicyclobacillus* spp. en materia prima destinada a la elaboración de bebidas y zumos de frutas (Doctoral dissertation, Universidad de Murcia).
- Fleet, G. H. (2011). Yeast spoilage of foods and beverages. The yeasts, a taxonomic study, 1, 53-63.
- Guamán Burneo, C., & Carvajal Barriga, J. (2009). Caracterización e identificación de aislados de levaduras carotenogénicas de varias zonas naturales del Ecuador. Universitas Scientiarum, 14(2-3), 187-197.

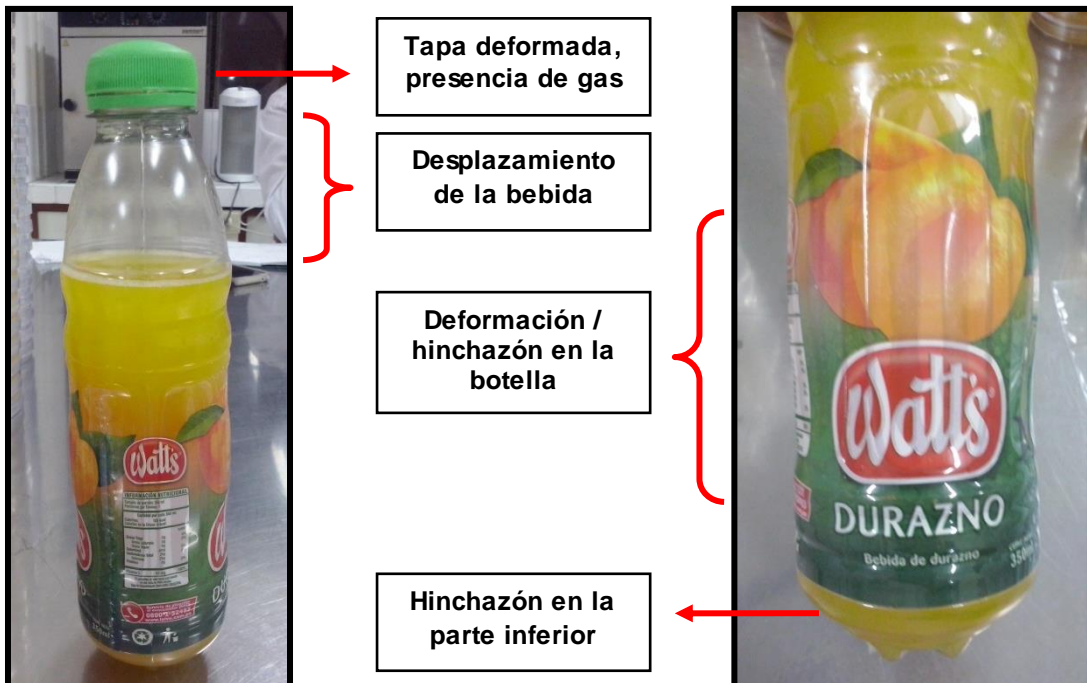
- Hidalgo, F. K. (2007). El HACCP y la ISO 22000: Herramienta esencial para la inocuidad y calidad de los alimentos. *Ingeniería industrial*, (25), 69-86.
- Huamán Romero, M. Y. (2010). Selección y caracterización de levaduras autóctonas aisladas de "cachina" del distrito de Lunahuaná
- Ibáñez, F., Torre, P., & Irigoyen, A. (2003). Aditivos alimentarios. *Área de Nutrición y Bromatología, Universidad Pública de Navarra*.
- Katz, S. E. (2012). *The art of fermentation: an in-depth exploration of essential concepts and processes from around the world*. Chelsea green publishing.
- Kurtzman, C., Fell, J. W., & Boekhout, T. (Eds.). (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.
- Lagos Narváez, J. F. (2017). *Identificación y caracterización de levaduras fermentadoras de cacao (Theobroma cacao) provenientes de centros de acopio de dos localidades del Ecuador* (Bachelor's thesis, PUCE).
- Livia, A. M. C. (1999). ESTUDIO DE PRE-FACTIBILIDAD PARA LA INSTALACIÓN DE UNA PEQUEÑA EMPRESA PROCESADORA DE NÉCTARES. *Industrial Data*, 2(2), 27-31.
- López-Ibarra, J. M., Orozco-Estrada, E., Elton-Puente, J. E., Méndez Gómez-Humarán, M. C., Hernández-Angulo, A. M., Ibarra-Valdovinos, I., ... & Rodríguez-Guevara, I. (2009). Calidad sanitaria de bebidas preparadas que se ofrecen al público en una institución de educación superior en Querétaro. México: Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ciencias Naturales, 1-4.
- LOPEZ, W.A., RAMÍREZ, M., MAMBUSCAY, L.A. y OSORIO-CADAVID, E. Diversidad de levaduras asociadas a chichas tradicionales de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, (12), 2009, p. 176-186
- MINISTERIO DE SALUD DE PERÚ, "Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad e inocuidad para alimentos y bebidas de consumo humano" Norma técnica Peruana, MINSA/DIGESA-V.01
- Muñoz-Villa, A., Sáenz-Galindo, A., López-López, L., Cantú-Sifuentes, L., & Barajas-Bermúdez, L. (2014). Ácido Cítrico: Compuesto Interesante Citric Acid: Interesting Compound. *Revista Científica*, 6(12).

- National advisory committee on microbiological criteria for foods, NACMCF. 1997. "Hazard Analysis and Critical Control Point Principles and Application Guidelines". *Journal of food Protection*, 61: 762-775
- Orberá Ratón, T. D. L. M. (2004). Acción perjudicial de las levaduras sobre los alimentos. *Revista Cubana de Salud Pública*, 30(3), 0-0.
- Osorio Cadavid, E., Ramírez, M., López, W. A., & Mambuscay, L. A. (2009). Estandarización de un protocolo sencillo para la extracción de ADN genómico de levaduras. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 125-131.
- Procesoliva. (2016) Recuperado el 11 de noviembre de 2016, de Table olives processing Consulting. <https://procesoliva.wordpress.com/category/procesos/page/2/>
- Ray B & Bhunia A. *Fundamental food microbiology*. Florida: CRC Press. 2008.
- Rendueles, M., & Díaz, M. (2014). *Biotecnología industrial*. Arbor, 190 (768), a155.
- ROSI, I., VINELLA, M. and DOMIZIO, P. Characterization of b-glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *J. Appl. Bacteriol.*, (77), 1994, p. 519-527.
- Sobrero, M. S., Basílico, M. L., Sanchis, J. C., & Basílico, J. C. (2005). Estudio de Hongos Contaminantes en el Proceso de Elaboración de Jugos Concentrados de Naranja y Mandarina. *FABICIB*, 5(1), 87-99.
- Tarifa, M. C. (2017). Formación de biofilms en sistemas de filtración por membranas.
- Wallis, A. A. (2013). Inhibition of Spoilage Yeasts using Spice Essential Oils and Their Components.

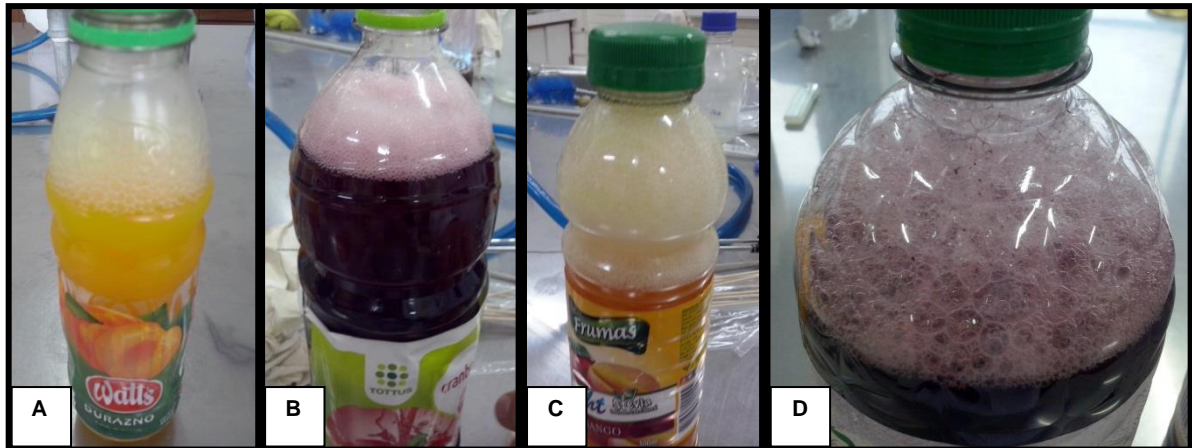
## ANEXOS



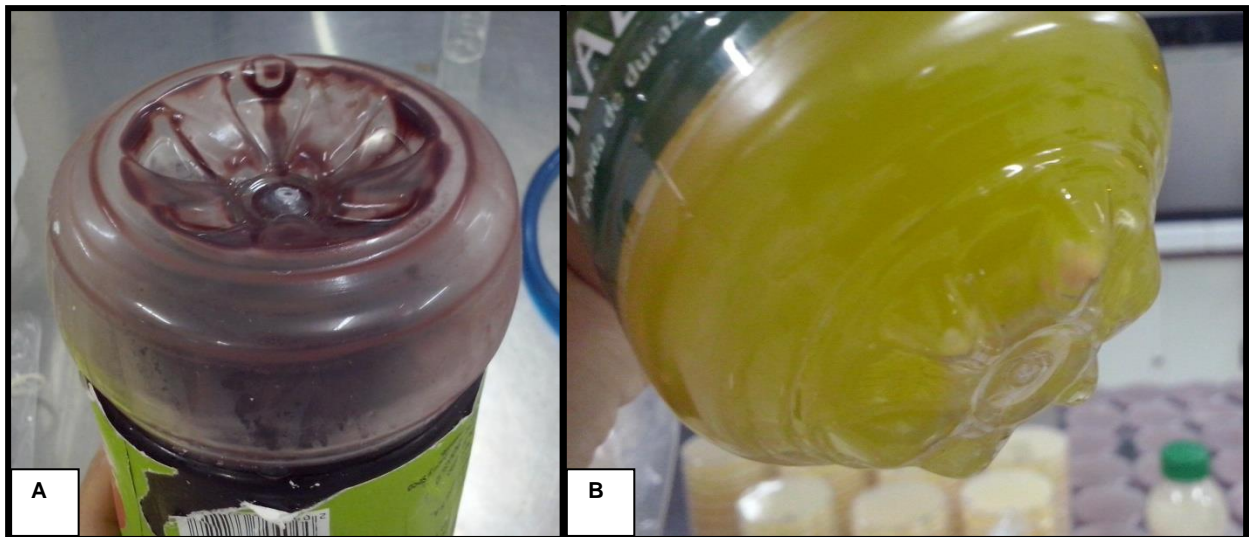
**Figura N°1.** A. Bebida de Cranberry (1L), Bebida de Durazno (350ml), Bebida de Mango (500ml).  
B. Bebida de Chicha Morada (1L)



**Figura N°2.** Características del envase ocasionadas por presencias de levaduras

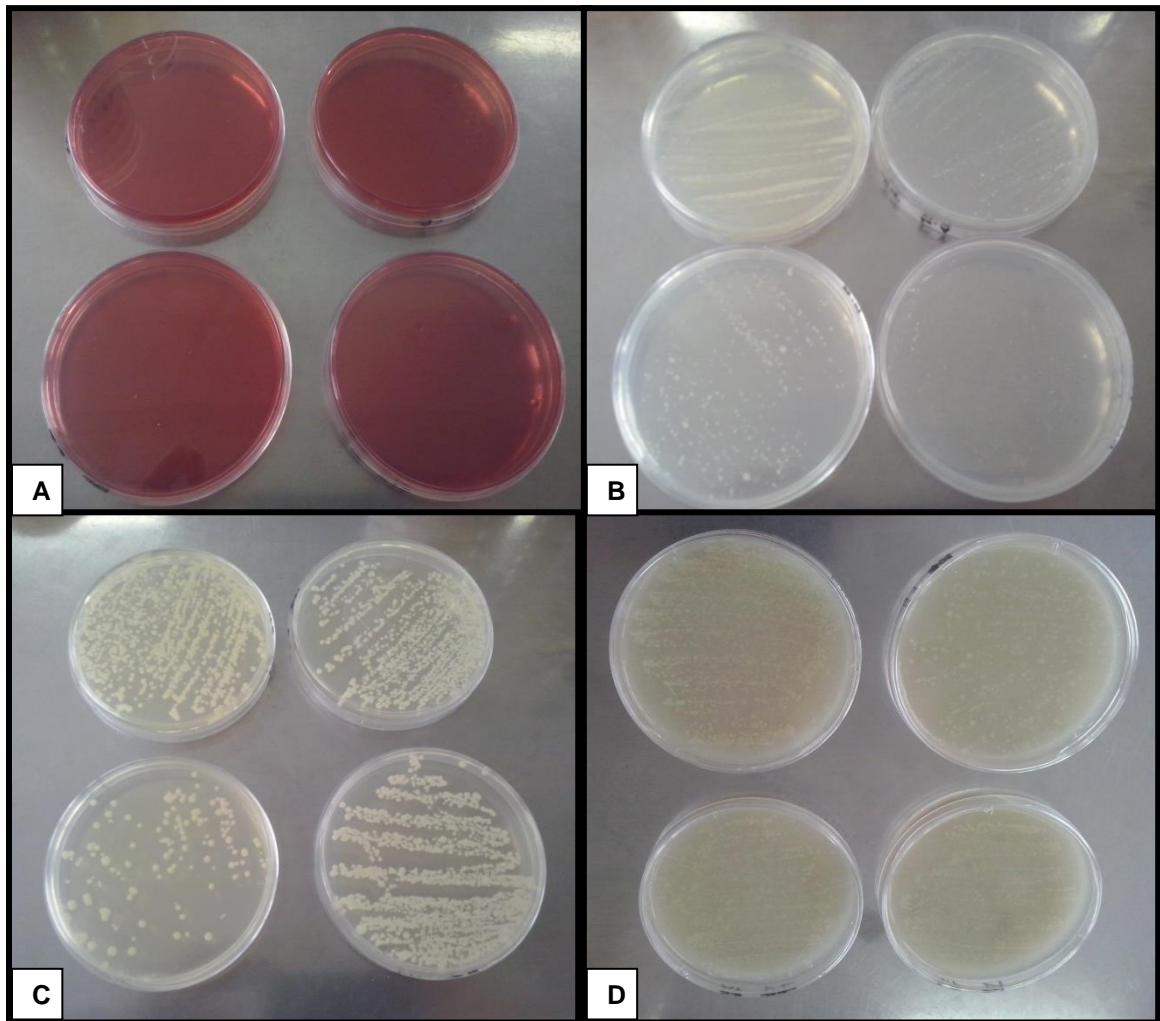


**Figura N°3.** Presencia de CO<sub>2</sub>. A. Bebida de Durazno, B. Bebida de Cranberry, C. Bebida de Mango, D. Bebida de Chica Morada.

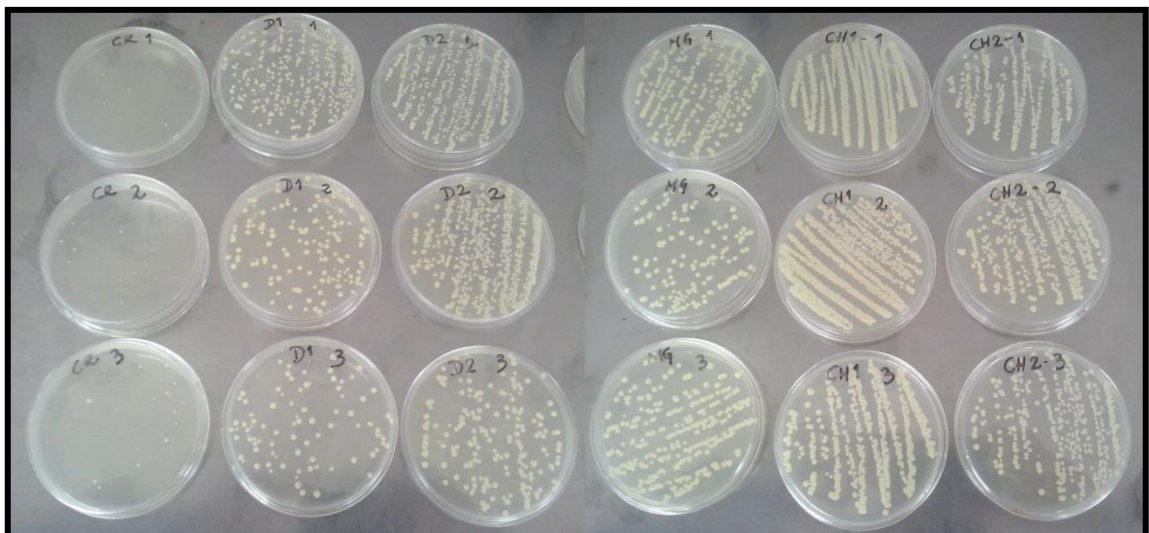


**Figura N°4.** Presencia de precipitado A. Bebida de Cranberry, B. Bebida de Durazno.

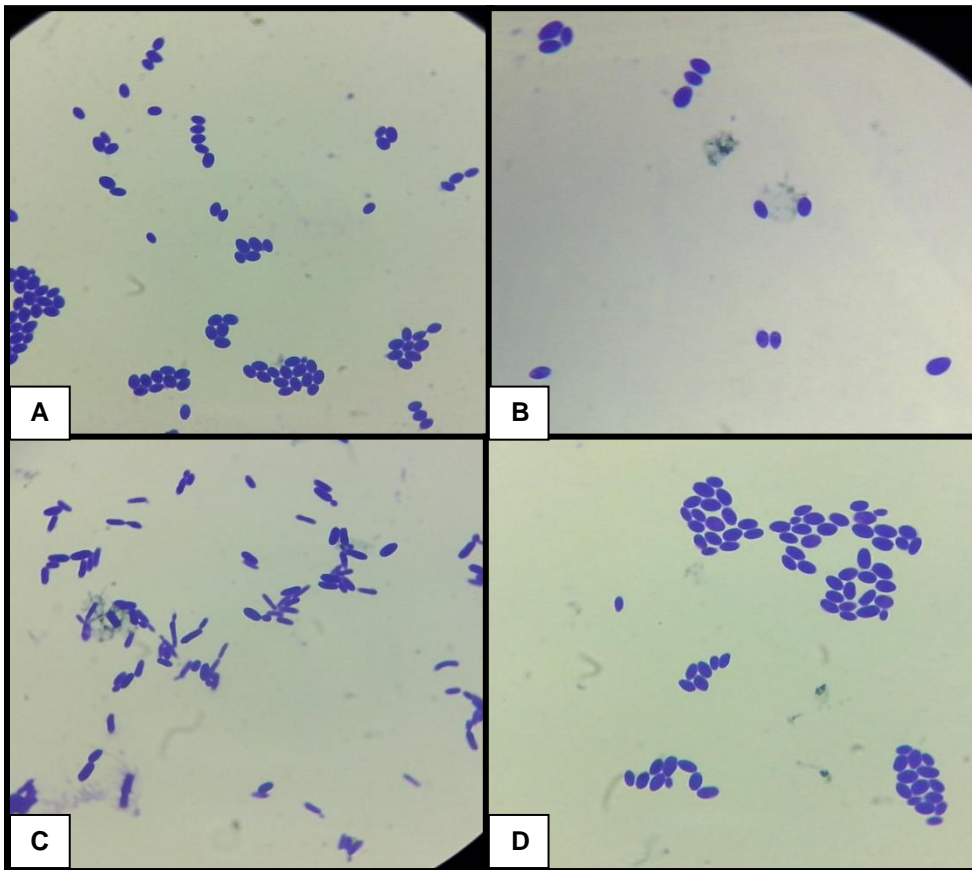




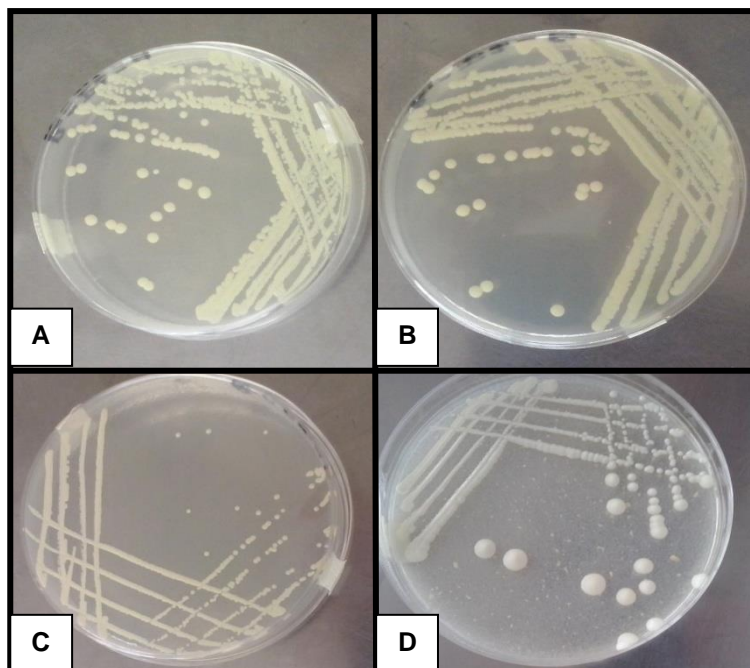
**Figura N°5.** Muestras sembradas en Agar MacConkey (A) Agar Nutritivo (B) Agar Sabouraud (C) y Agar Papa Dextrosa (D)



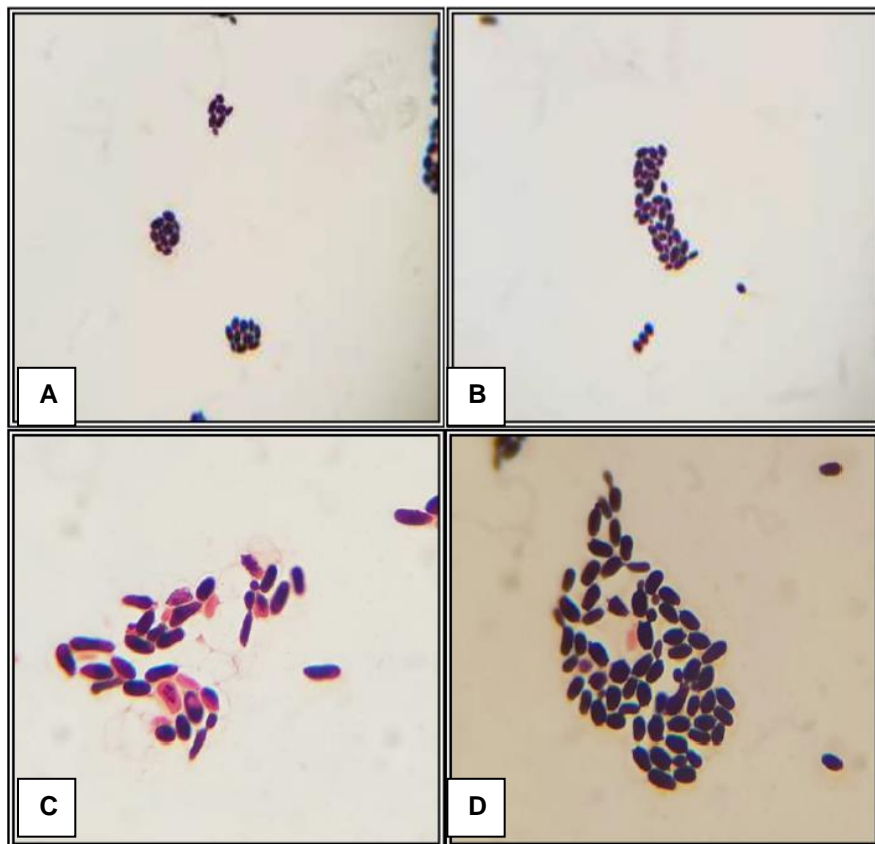
**Figura N°6.** Levaduras sembradas en Agar Sabouraud. CR: Cranberry, D: Durazno, MG: Mango, CH: Chicha Morada



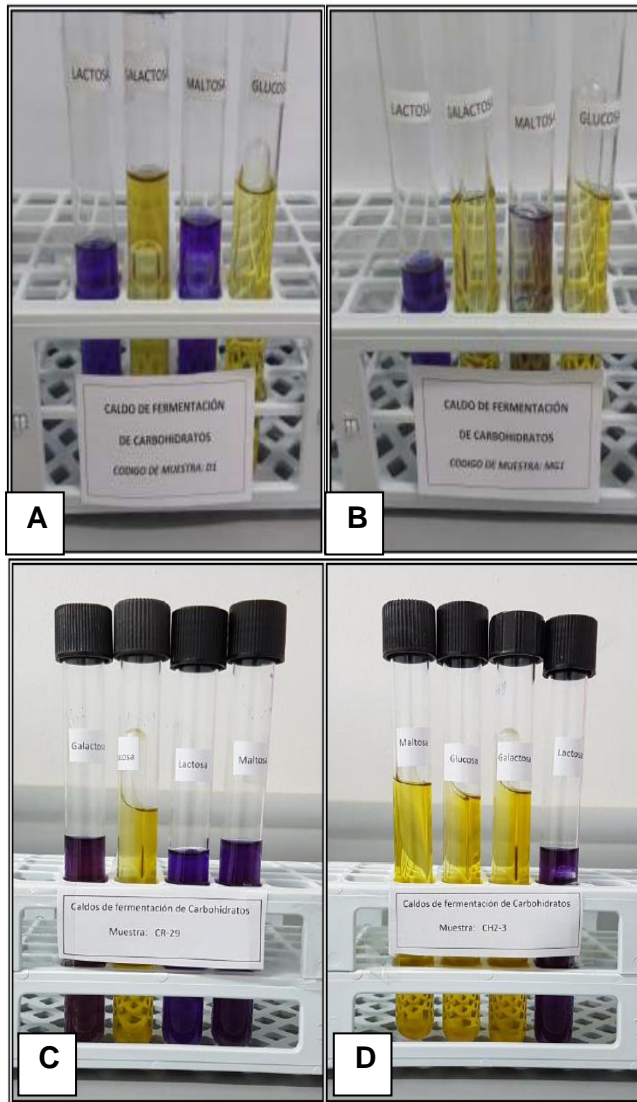
**Figura N°7.** Tinción simple de levaduras (100X). A. Muestra de durazno. B. Muestra de Mango. C. Muestra de Cranberry. D. Muestra de Chicha Morada



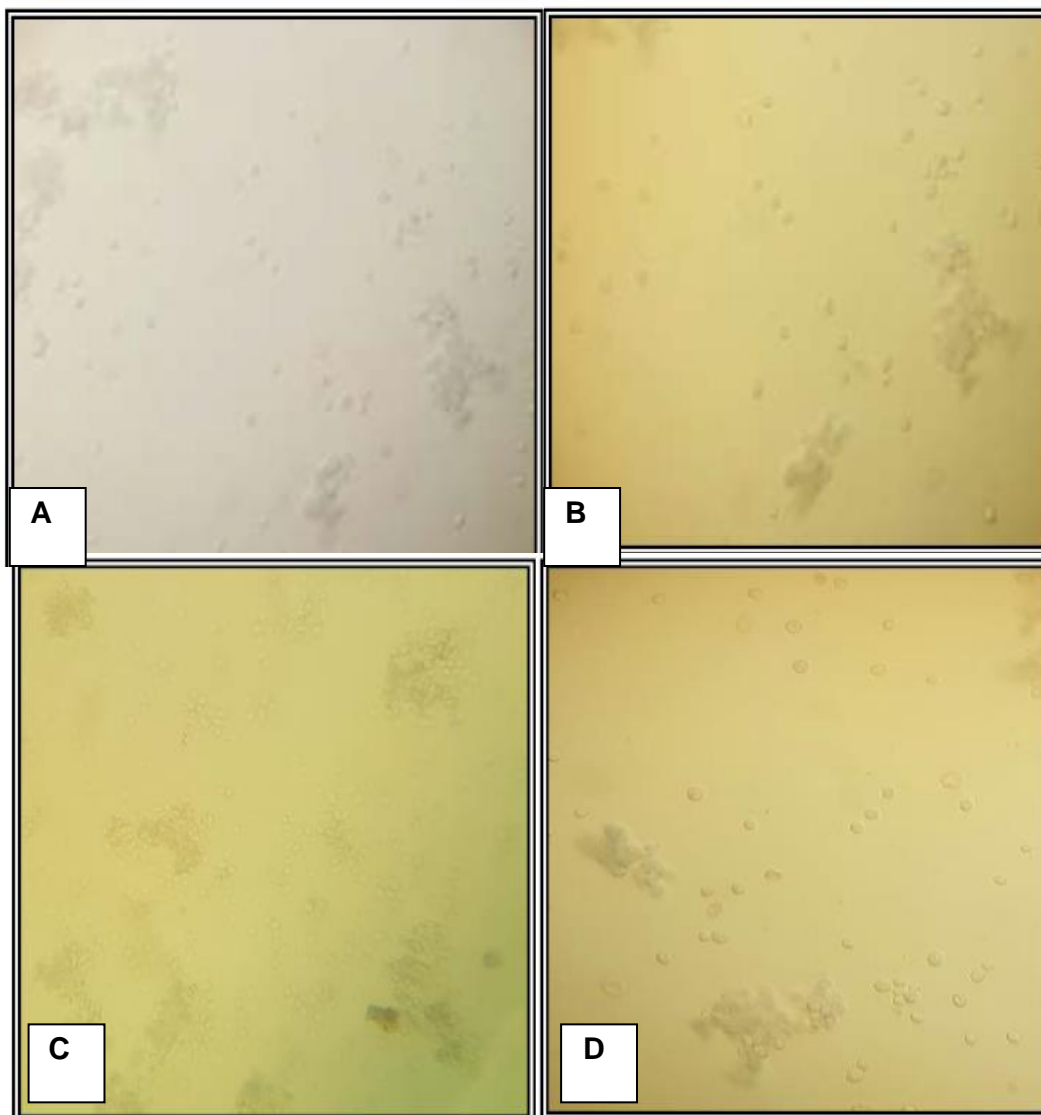
**Figura N°8.** A. Muestra de durazno. B. Muestra de Mango. C. Muestra de Cranberry. D. Muestra de Chicha Morada



**Figura N°9.** A. Levadura de durazno. B. Levadura de Mango. C. Levadura de Cranberry. D. Levadura de Chicha Morada (Imagen: FS Certificaciones)



**Figura N°10.** Fermentación de carbohidratos A. Muestra de durazno. B. Muestra de Mango. C. Muestra de Cranberry. D. Muestra de Chicha Morada (Imagen: FS Certificaciones)



**Figura N°11.** Tubo germinativo A. Muestra de durazno. B. Muestra de Mango. C. Muestra de Cranberry. D. Muestra de Chicha Morada (Imagen: FS Certificaciones)

**Tabla 5:** Recuento e identificación de la flora fúngica contaminante de jugos de naranja y mandarina pasteurizados

Jugos <sup>a</sup>	DRBC (Diclorán rosa de bengala - cloranfenicol - agar)		PDA (Papa - dextrosa - agar)	
	Recuento (UFC/ ml)	Hongos identificados	Recuento (UFC/ ml)	Hongos identificados
Naranja 1999	$1,3 \cdot 10^2$	<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Penicillium citrinum</i> <i>P. crustosum</i> <i>P. digitatum</i> <i>P. italicum</i> <i>Neosartorya fischeri</i>	$3,4 \cdot 10^2$	<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Colletotrichum gloesporioides</i> <i>Penicillium citrinum</i> <i>P. brevicompactum</i> <i>P. digitatum</i> <i>P. italicum</i> <i>P. spinolosum</i>
Naranja 2000	$1,5 \cdot 10^3$	<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Eurotium aemstelodami</i>	$5,5 \cdot 10^3$	<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Eurotium aemstelodami</i>
Mandarina 1999 <sup>b</sup>	$1,6 \cdot 10^2$	<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Penicillium citrinum</i> <i>Neosartorya fischeri</i>	$1,8 \cdot 10^3$	<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Colletotrichum gloesporioides</i> <i>Penicillium citrinum</i> <i>P. griseofulvum</i> <i>P. glabrum</i> <i>Neosartorya fischeri</i>

a: Se detalla el tipo de jugo y el año de la cosecha.

b: En el año 2000 no se realizó esta determinación en jugos de mandarina.

## Anexo N° 13

Levaduras más frecuentes en los zumos de frutas y refrescos.

### Yeasts Frequently Isolated from Fruit Juices and Soft Drinks

Species	Sources
<i>C. boidinii</i>	Soft drinks
<i>C. etchellsii</i>	Soft drinks
<i>C. inconspicua</i>	Soft drinks, conc. juices
<i>C. intermedia</i>	Fruit juices
<i>C. parapsilosis</i>	Fruit juices
<i>C. sake</i>	Soft drinks
<i>C. stellata</i>	Soft drinks, conc. juices
<i>C. tropicalis</i>	Apple juice, soft drinks
<i>Clsp. lusitaniae</i>	Fruit juices
<i>Db. hansenii</i>	Fruit juices
<i>Dek. anomala</i>	Soft drinks
<i>Dek. bruxellensis</i>	Soft drinks
<i>Hsp. occidentalis</i>	Fruit juices
<i>Hsp. uvarum</i>	Soft drinks, fruit juices
<i>Iss. orientalis</i>	Soft drinks, fruit juices, conc. juices
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Soft drinks, fruit juices, conc. juices
<i>Lachancea fermentati</i>	Soft drinks
<i>Lachancea kluyveri</i>	Soft drinks, conc. juices
<i>Lodd. elongisporus</i>	Soft drinks, conc. juices
<i>P. anomala</i>	Soft drinks, fruit juices, conc. juices
<i>P. fermentans</i>	Soft drinks, apple juice
<i>P. guilliermondii</i>	Soft drinks, fruit juices
<i>P. kluyveri</i>	Fruit juices
<i>P. manshurica</i>	Carbonated orange juice
<i>Rho. glutinis</i>	Fruit juices
<i>S. cerevisiae</i>	Soft drinks, fruit juices, conc. juices
<i>Tsp. delbrueckii</i>	Soft drinks, conc. juices
<i>Tsp. microellipsoides</i>	Soft drinks, fruit juices
<i>Zygo. bailii</i>	Soft drinks, conc. juices
<i>Zygo. rouxii</i>	Conc. juices