

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



**“EXTRACTOS VEGETALES ANTIMICROBIANOS  
EN TRES BEBIDAS A BASE DE PULPAS DE FRUTAS  
Y CHÍA (*Salvia hispánica* L)”**

**Presentada por:  
KEVIN REÁTEGUI OCHOA**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO  
MAGISTER SCIENTIAE EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Lima - Perú**

**2023**

## Document Information

<b>Analyzed document</b>	2. Tesis maestria - Kevin Reategui Ochoa.pdf (D152965925)
<b>Submitted</b>	2022-12-11 16:08:00
<b>Submitted by</b>	MARCIAL IBO SILVA JAIMES
<b>Submitter email</b>	misilva@lamolina.edu.pe
<b>Similarity</b>	1%
<b>Analysis address</b>	misilva.unalm@analysis.arkund.com

## Sources included in the report

<b>W</b>	URL: <a href="https://www.tiger-algebra.com/drill/a~3-ab~2-a~2b_b~3/a~3-3a~2b_3ab~2-b~3/">https://www.tiger-algebra.com/drill/a~3-ab~2-a~2b_b~3/a~3-3a~2b_3ab~2-b~3/</a> Fetched: 2021-05-19 06:56:25	 <b>1</b>
<b>W</b>	URL: <a href="https://www.bartleby.com/questions-and-answers/question-6-solve-the-equation.-a-4a-9a-36-a-4-a...">https://www.bartleby.com/questions-and-answers/question-6-solve-the-equation.-a-4a-9a-36-a-4-a...</a> Fetched: 2021-11-09 11:52:23	 <b>1</b>
<b>SA</b>	<b>1595289639_238__Reporte_2_-_Diseño_de_Procesos_Térmicos_(1).docx</b> Document 1595289639_238__Reporte_2_-_Diseño_de_Procesos_Térmicos_(1).docx (D77120328)	 <b>3</b>
<b>SA</b>	<b>Universidad Nacional Agraria La Molina / DETERIORO (YOGURT).pdf</b> Document DETERIORO (YOGURT).pdf (D142944996) Submitted by: pgp@lamolina.edu.pe Receiver: pgp.unalm@analysis.arkund.com	 <b>1</b>
<b>W</b>	URL: <a href="https://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2015.07.018">https://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2015.07.018</a> Fetched: 2022-12-11 16:09:00	 <b>1</b>

## Entire Document

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA ESCUELA DE POSGRADO MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
Presentada por: KEVIN REÁTEGUI OCHOA TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO MAGISTER SCIENTIAE EN  
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Lima - Perú 2022 "EXTRACTOS VEGETALES ANTIMICROBIANOS EN TRES BEBIDAS A  
BASE DE PULPAS DE FRUTAS Y CHIA (Salvia hispánica L)"

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA ESCUELA DE POSGRADO MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
"EXTRACTOS VEGETALES ANTIMICROBIANOS EN TRES BEBIDAS A BASE DE PULPAS DE FRUTAS Y TESIS PARA OPTAR EL  
GRADO DE MAESTRO MAGISTER SCIENTIAE Presentada por: KEVIN REÁTEGUI OCHOA Sustentada y aprobada ante el  
siguiente jurado: Ph.D. Patricia Glorio Paulet Dr. Américo Guevara Pérez MIEMBRO MIEMBRO Dr. Marcial Silva Jaimés  
ASESOR Mg.Sc. Gloria Pascual Chagman CO-ASESOR Mg.Sc. Carlos Elías Peñafiel PRESIDENTE CHIA (Salvia hispánica L)"

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**“EXTRACTOS VEGETALES ANTIMICROBIANOS EN  
TRES BEBIDAS A BASE DE PULPAS DE FRUTAS Y  
CHÍA (*Salvia hispánica* L)”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO  
MAGISTER SCIENTIAE**

**Presentada por:  
KEVIN REÁTEGUI OCHOA**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Mg.Sc. Carlos Elías Peñafiel  
**PRESIDENTE**

Dr. Marcial Silva Jaimes  
**ASESOR**

Mg.Sc. Gloria Pascual Chagman  
**CO-ASESOR**

Ph.D. Patricia Glorio Paulet  
**MIEMBRO**

Dr. Américo Guevara Pérez  
**MIEMBRO**

## **DEDICATORIA**

*Dedico esta tesis a mi familia y mis amigos, ellos que me apoyaron en los momentos más difíciles. Sus apoyos fueron los cimientos que me permitieron continuar y terminar este trabajo.*

*Dediqué todo un año para la finalización y cristalización de unos de mis sueños, que se ha vuelto un paso más hacia un futuro.*

## AGRADECIMIENTOS

*Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi familia por ayudarme y apoyarme durante todo el año. Muchas veces, el tiempo parecía infinito y el fin inalcanzable; muchas gracias por esperarme.*

*Mis profundos agradecimientos al Ministerio de Producción y su Programa Innovate Perú Proyecto 046-FIDECOM-INNOVATEPERU-PIMEN-2017 que permitió el financiamiento de esta investigación. Asimismo, se agradece la labor de la Coordinadora del Proyecto Ing. Natalia Vega por su contribución y apoyo en la parte logística y burocrática de la investigación.*

*Agradeciendo al Doctor Marcial Silva Jaime por darme la oportunidad de realizar esta tesis en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos y con ello, alcanzar el grado de Magister Ciencia en Tecnología de Alimentos.*

*Agradeciendo a la gerente general Carmen Silva Tasayco y al Coordinador General Eduardo Polo Silva de la Empresa New Market Latin America por darme las facilidades para poder superar distintos obstáculos respecto a mi tesis.*

*Agradeciendo al Ing. Miguel Gómez y al Blgo. Joe por su apoyo en el área de Biología molecular. Asimismo, agradezco a las técnicas Sra. Julia y Sonia que me dieron su apoyo en los momentos difíciles durante todo el trabajo de tesis.*

*Muchas gracias por todo*

## RESUMEN

Los extractos antimicrobianos pueden ser usados como conservantes naturales para retrasar el deterioro de los alimentos por proliferación de microorganismos. Debido a ello, se estableció como objetivo seleccionar un extracto antimicrobiano y evaluar su efecto en la estabilidad microbiológica de tres bebidas con pulpa de fruta (maracuyá, fresa y arándano) con semilla de chía. Por ende, se evaluó tres extractos por pruebas de sensibilidad antimicrobiana y se seleccionó la dosis mínima del mejor de ellos; se seleccionó un tratamiento descontaminante para la semilla de chía (irradiación y ozono) que facilite el accionar del extracto, y por último, se evaluó el efecto del extracto en dos dosis diferentes (0.5 y 0.7 por ciento) en la estabilidad microbiológica y la aceptabilidad, como objetivos adicionales se identificaron a los microorganismos sobrevivientes para investigaciones futuras. Los resultados obtenidos demostraron que una dosis de 16 mg/mL del extracto de ayrampo mantuvo los niveles microbiológicos exigidos por Digesa (Mesófilos <100 ufc/mL; Levadura <10 ufc/mL; coliformes < 3ufc/mL) por 60 días en las bebidas de pulpa de maracuyá y arándano con semilla de chía y 50 días en las bebidas con pulpa de fresa; las dos dosis no afectaron significativamente el tiempo de almacenamiento mas el tipo de pulpa sí. Asimismo, una dosis de irradiación de 4KGy es suficiente para eliminar a las levaduras, mesófilos aerobios y esporulados en la semilla de chía; la adición del extracto tuvo un efecto positivo en el aspecto sensorial, inclusive un aumentó al 1.6% y se identificaron a *Lactobacillus spp*, *Bacillus coagulans*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Candida guilliermondii* y *Candida parapsilosis* como responsables principales del deterioro en las tres bebidas. Se concluyó que el extracto de ayrampo ser una alternativa natural como un conservante natural en bebidas de pulpa de fruta con semilla de chía.

**Palabra Clave:** extracto, estabilidad microbiológica, tiempo de almacenamiento, ayrampo, aceptabilidad.

## SUMMARY

Antimicrobial extracts can be used as natural preservatives to delay the deterioration of food due to the proliferation of microorganisms. Due to this, the objective was to select an antimicrobial extract and evaluate its effect on the microbiological stability of three beverages with fruit pulp (passion fruit, strawberry and blueberry) with chia seed. Therefore, three extracts were evaluated by antimicrobial sensitivity tests and the minimum dose of the best of them was selected; A decontaminating treatment for chia seed (irradiation and ozone) was selected to facilitate the action of the extract, and finally, the effect of the extract at two different doses (0.5 and 0.7%) on microbiological stability and acceptability was evaluated. Surviving microorganisms were identified as additional targets for future research. The results obtained showed that a dose of 16 mg/mL of ayrampo extract maintained the microbiological levels required by Digesa (Mesophiles <100 cfu/mL; Yeast <10 cfu/mL; coliforms <3 cfu/mL) for 60 days in beverages of passion fruit and blueberry pulp with chia seeds and 50 days in drinks with strawberry pulp; The two doses did not significantly affect storage time, but the type of pulp did. Likewise, an irradiation dose of 4KGy is sufficient to eliminate yeasts, aerobic and sporulated mesophiles in chia seeds; the addition of the extract had a positive effect on the sensory aspect, including an increase to 1.6% and *Lactobacillus spp*, *Bacillus coagulans*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis* were identified as the main responsible for deterioration in the three beverages. It was concluded that the ayrampo extract is a natural alternative as a natural preservative in fruit pulp beverages with chia seeds.

**Key Words:** extract, microbiological stability, storage time, ayrampo, acceptability

# ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. EXTRACTOS VEGETALES.....</b>	<b>3</b>
2.1.1. Generalidades.....	3
2.1.2. Obtención del extracto.....	3
2.1.3. Actividad antimicrobiana.....	4
2.1.4. Plantas con principios antimicrobianos.....	4
2.1.5. Aplicación de extractos antimicrobianos en alimentos.....	8
<b>2.2. SEMILLA DE CHIA.....</b>	<b>10</b>
2.2.1. Generalidades.....	10
2.2.2. Descripción morfológica de la chía.....	10
2.2.3. Componentes de la semilla de chía.....	11
2.2.4. Aplicaciones de la chía en alimentos.....	11
<b>2.3. JUGOS Y NÉCTARES.....</b>	<b>13</b>
2.3.1. Generalidades.....	13
2.3.2. Jugos o néctares enriquecidos/fortificados.....	13
2.3.3. Proceso de producción.....	15
2.3.4. Criterios para jugos y néctares.....	16
<b>2.4. CONSERVACIÓN DE BEBIDAS.....</b>	<b>17</b>
2.4.1. Conservantes tradicionales.....	17
2.4.2. Conservantes naturales.....	17
<b>2.5. MICROBIOLOGÍA DE BEBIDAS Y SEMILLAS.....</b>	<b>19</b>
2.5.1. Semilla de chía.....	19
2.5.2. Pulpa de Maracuyá, fresa y arándano.....	19
2.5.3. Bebida con pulpa de fruta pasteurizada.....	20
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2. MATERIA PRIMA, INSUMOS Y UTENSILIOS.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3. MATERIALES Y EQUIPOS.....</b>	<b>25</b>
3.3.1. Materiales.....	25
3.3.2. Equipos.....	25
3.3.3. Medios de cultivo.....	26
3.3.4. Reactivos.....	27
<b>3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS.....</b>	<b>27</b>
3.4.1. Métodos Microbiológicos.....	27
3.4.2. Método Físicoquímico.....	32
3.4.3. Método sensorial.....	32
<b>3.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>33</b>
3.5.1. Obtención del extracto.....	33
3.5.2. Descontaminación de la semilla de chía.....	34
3.5.3. Elaboración de las bebidas de pulpa de fruta con extractos y semilla de chia.....	36
3.5.4. Diseño Experimental.....	38
3.5.5. Análisis estadístico.....	39

<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>40</b>
<b>4.1.</b>	<b>DESCONTAMINACIÓN DE LAS SEMILLA DE CHIA</b> .....	<b>40</b>
4.1.1.	Efecto de la irradiación .....	40
4.1.2.	Efecto de la Ozonización .....	41
<b>4.2.</b>	<b>DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA</b> .....	<b>43</b>
4.2.1.	Actividad antimicrobiana de tres extractos.....	43
4.2.2.	Concentración mínima inhibitoria de los extractos.....	45
<b>4.3.</b>	<b>ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA DE LAS BEBIDAS CON EXTRACTO</b> .....	<b>48</b>
4.3.1.	Obtención de tres bebidas de pulpa de fruta con extracto y chia.....	48
4.3.2.	Estabilidad microbiológica de bebidas de pulpa de fruta con extracto de ayrampo y chia	50
4.3.3.	Efecto de la dosis del extracto en la estabilidad microbiológica .....	51
<b>4.4.</b>	<b>ACEPTABILIDAD DE TRES BEBIDAS CON PULPA DE FRUTA, CHÍA Y EXTRACTO ANTIMICROBIANO</b> .....	<b>55</b>
<b>4.5.</b>	<b>AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE SOBREVIENTES</b> .....	<b>56</b>
4.5.1.	Aislamiento y caracterización morfológica de bacterias sobrevivientes .....	56
4.5.2.	Identificación Bioquímica de Bacterias .....	58
4.5.3.	Identificación Molecular de Bacterias Sobrevivientes.....	60
4.5.4.	Aislamiento y Caracterización de Levaduras .....	61
4.5.5.	Identificación Bioquímica de Levaduras Sobrevivientes.....	63
4.5.6.	Identificación molecular de las levaduras.....	64
4.5.7.	Aislamiento e identificación morfológica de mohos termófilos.....	66
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>68</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>69</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>70</b>
<b>VIII.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>84</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1:	Composición centesimal de la semilla de chía ..... 11
Tabla 2:	Criterios de calidad para jugos y néctares ..... 16
Tabla 3:	Composición centesimal de tres jugos de frutas ..... 20
Tabla 4:	Cebadores para identificación de <i>Saccharomyces</i> spp ..... 29
Tabla 5:	Cebadores para identificación de <i>Lactobacillus</i> spp ..... 30
Tabla 6:	Efecto de la irradiación en la población microbiana de la semilla de chía ..... 40
Tabla 7:	Efecto del ozono en la población microbiana de la semilla de chía ..... 42
Tabla 8:	Parámetros fisicoquímicos de las tres bebidas ..... 49
Tabla 9:	Recuento de mesófilo aerobio, levadura y coliforme en bebidas de maracuyá y semilla de chía con extracto o sin extracto de ayrampo ..... 50
Tabla 10:	Recuento de levadura y coliforme de tres bebidas de pulpa de fruta con chía y extracto de ayrampo ..... 53
Tabla 11:	Aceptabilidad de tres bebidas ..... 55
Tabla 12:	Forma Presuntiva y reacción de coloración gram de acuerdo al medio de cultivo de bacterias sobreviviente de bebidas pasteuriza de pulpa de fresa y extracto antimicrobiano ..... 56
Tabla 13:	Forma Presuntiva y reacción de coloración gram de acuerdo al medio de cultivo de bacterias sobreviviente de bebidas pasteuriza de pulpa de maracuyá y extracto antimicrobiano ..... 57
Tabla 14:	Forma Presuntiva y reacción de coloración gram de acuerdo al medio de cultivo de bacterias sobreviviente de bebidas pasteuriza de pulpa de arándano y extracto antimicrobiano ..... 57
Tabla 15:	Identificación Bioquímica de Microorganismos Gram (-) y Oxidasa (-) ..... 59
Tabla 16:	Identificación Bioquímica de Microorganismos Gram (+) y Catalasa (+) ..... 60
Tabla 17:	Caracterización Morfológica de las levaduras aisladas de las tres bebidas ..... 62
Tabla 18:	Identificación bioquímica de levaduras ..... 63

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Flujo de proceso para la obtención de extracto.....	4
Figura 2: Vaina de tara.....	5
Figura 3: Hoja de moringa.....	6
Figura 4: Semilla de ayrampo .....	8
Figura 5: Semilla de chía .....	11
Figura 6: Flujo de procesos para jugos .....	15
Figura 7: Flujo de proceso para la obtención de extracto de tara, moringa y ayrampo .....	33
Figura 8: Flujo del proceso de la descontaminación de la semilla de chía .....	34
Figura 9: Flujo de proceso de elaboración de las bebidas de pulpa de fruta y con extractos y semilla de chía.....	36
Figura 10: Diseño experimental .....	38
Figura 11: Actividad antibacteriana de extracto de moringa, ayrampo y tara sobre <i>E. coli</i> y <i>St. aureus</i> .....	43
Figura 12: Actividad antifúngica del extracto de moringa, ayrampo y tara sobre <i>Saccharomyces cerevisia</i> y <i>Aspergillus niger</i> .....	44
Figura 13: Concentración mínima inhibitoria del extracto de ayrampo a 24 horas .....	45
Figura 14: Concentración mínima inhibitoria del extracto de tara a 24 horas.....	46
Figura 15: Concentración mínima inhibitoria del extracto de moringa a 24 horas .....	47
Figura 16: Concentraciones mínimas inhibitoria del extracto de moringa, tara y ayrampo en <i>St. aureus</i> y <i>E. coli</i> .....	48
Figura 17: Bebidas obtenidas de pulpa de fruta con extracto de ayrampo y chía .....	49
Figura 18: Recuento de mesófilos aerobios de una bebida de pulpa de maracuyá con chía y extracto de ayrampo.....	51
Figura 19: Recuento de mesófilos aerobios de una bebida de pulpa de arándano con chía y extracto de ayrampo.....	52
Figura 20: Recuento de mesófilos aerobios de una bebida de pulpa de fresa con chía y extracto de ayrampo.....	53
Figura 21: Diagrama de fluorescencia respecto al número de copias de ADN de <i>Lactobacillus spp</i> .....	61
Figura 22: Aislamiento de levaduras sobrevivientes .....	62

Figura 23:	Diagrama de fluorescencia respecto al número de copias de ADN de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	65
Figura 24:	Diagrama de fluorescencia respecto al número de copias de ADN de <i>Saccharomyces spp</i> .....	65
Figura 25:	Aislamiento de <i>Paecilomyces variotii</i> .....	66

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Ficha de evaluación sensorial .....	84
Anexo 2. Formulación de las tres bebidas.....	85
Anexo 3. Prueba estadística de irradiación .....	86
Anexo 4. Prueba estadística de ozono .....	87
Anexo 5. Prueba estadística de estabilidad de bebidas .....	88
Anexo 6. Prueba estadística de almacenamiento de tres bebidas último día.....	89
Anexo 7. Prueba estadística de almacenamiento de tres bebidas penúltimo día.....	90
Anexo 8. Prueba estadística de aceptabilidad de tres bebidas .....	91
Anexo 9. Curva estándar de cebadores.....	92

## I. INTRODUCCIÓN

Los jugos y néctares han cobrado un inusitado protagonismo en estos últimos años. En el mercado interno, el valor de estas bebidas alcanzaba los S/ 980 millones de soles al cierre del 2016; se proyecta que alcance los S/ 1 128 millones de soles al 2021 (Peruretail 2019). Mientras que, en el mercado externo, las exportaciones de estas bebidas ascendieron US\$ 48 a US\$ 621 millones de dólares entre el año 2014 al 2018 (AgrodataPeru 2019). Este crecimiento se potenció gracias a una fuerte campaña que resalta los beneficios de su consumo para la salud. Se ha recomendado el consumo de jugos y néctares como una alternativa para prevenir la aparición de enfermedades cardiovasculares, diabetes y obesidad (Rivera *et al.* 2008). Esto ha conllevado a una gran variedad de diversos productos y ha saturado el mercado peruano.

Algunos empresarios han enriquecido estas bebidas con semilla de chía u otros complementos alimenticios para aumentar su valor nutricional, diferenciarse de la competencia y mejorar sus oportunidades en el mercado peruano (Rendón-Villalobos *et al.* 2018). Otra estrategia estudiada ha sido la remoción de los conservantes tradicionales para una mayor aceptación del consumidor (Pandey y Negi 2018). Esto ha resultado en una disyuntiva; el uso de estos compuestos retrasa la proliferación de bacterias y hongos, por lo tanto, su remoción afectaría considerablemente la calidad de las bebidas, adicionalmente, disminuiría el tiempo de almacenamiento (Bevilacqua *et al.* 2011). Como una solución, se ha propuesto el uso de conservantes naturales como los extractos antimicrobianos, aceites esenciales, entre otros (Sasaki *et al.* 2002; Stratford *et al.* 2007). Se ha comprobado que su uso en conjunto con tratamientos descontaminantes aumenta significativamente el tiempo de almacenamiento comparando con una contraparte sin conservante (Belickaqua *et al.* 2011; Espina *et al.* 2013).

En Perú, ha surgido el interés de evaluar si estos extractos pueden ser aplicados en la conservación de bebidas con pulpa de fruta y semilla de chía sin conservante tradicional. Los extractos de tara, ayrampo y moringa poseen actividad antimicrobiana; sin embargo, es necesario evaluar si su adición en la elaboración de bebidas da buenos resultados en el tiempo

de almacenamiento (Zárate 2015; Soto 2014; Wang *et al.* 2016). Por lo tanto, se planteó como objetivo principal:

- Seleccionar un extracto antimicrobiano de tres hierbas y evaluar su efecto en la estabilidad microbiológica de tres bebidas con pulpa de fruta (maracuyá, fresa y arándano) con semilla de chía.

Mientras que los objetivos específicos fueron:

- Evaluar y seleccionar el extracto antimicrobiano y su dosis de los extractos de ayrampo, moringa y tara en contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus niger*
- Seleccionar un tratamiento descontaminante y su dosis que elimine la carga microbiana de la semilla de chía (Irradiación y ozono).
- Evaluar el efecto de dos dosis del extracto (0.5 y 0.7 por ciento) en la estabilidad microbiológica y la aceptabilidad de tres bebidas de pulpa de fruta con chía y extracto antimicrobiano.
- Identificar a los microorganismos sobrevivientes en las tres bebidas para investigaciones futuras.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. EXTRACTOS VEGETALES

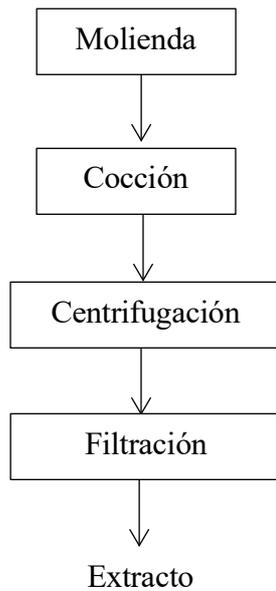
#### 2.1.1. Generalidades

Los extractos vegetales son una mixtura de metabolitos secundarios que está íntimamente relacionado con la fisiología y bioquímica de la planta. La Fitoquímica es la rama de la ciencia encargada del estudio de los extractos y estos metabolitos. Su estudio se enfoca en la estructura química, metabolismo, distribución natural, función biológica, extracción y evaluación (Ringuelet y Viña 2013).

Los metabolitos secundarios se agrupan de acuerdo a su estructura química en compuestos nitrogenados, azufrados, fenólicos y terpenoides (Ringuelet y Viña 2013). Los extractos exhiben actividades antimicrobianas, antiinflamatorias, analgésicas, entre otras; esto depende de la presencia y proporción de estos compuestos (Cowan 1999). La temporada de cosecha, condiciones de cultivo y el método de extracción influyen en esas proporciones y por ende repercute en estas actividades (García y Pérez-Urria 2009). Por ejemplo, López *et al.* (2011) observaron diferencias significativas en la concentración de fenoles totales y actividad antioxidante de tara cultivadas en distintas regiones del Perú.

#### 2.1.2. Obtención del extracto

El proceso de obtención consiste en la interacción del solvente con una parte de la planta. Se acompaña este proceso con pasos físicos (secado, trituración, centrifuga) para aumentar la extensión superficial y favorecer la extracción. Asimismo, se aumenta la temperatura para acelerar el proceso o facilitar la separación de algún metabolito. Resulta clave la polaridad y afinidad de estos frente al solvente usado. Los dos procesos más usados son la maceración y la infusión (García y Pérez-Urria 2009; Cowan 1999). A continuación, se exhibe el flujo de procesos para obtener un extracto (Figura 1):



**Figura 1: Flujo de proceso para la obtención de extracto**

Fuente: Gyawali *et al.* (2015).

### **2.1.3. Actividad antimicrobiana**

Se define aquella actividad que inhibe o elimina el crecimiento de un microorganismo, esto se determina por pruebas de sensibilidad (Herrera 1999). Existe un interés en aprovechar los extractos antimicrobianos como sustitutos a los antibióticos y conservantes tradicionales (Davidson *et al.* 2013). Se ha demostrado su efectividad frente a diversos patógenos y plagas (Thielmann *et al.* 2017).

La actividad antimicrobiana se atribuye a los compuestos fenólicos, los grupos OH y el anillo fenólico de su estructura química juegan un rol importante (Lima *et al.* 2019). Hasta donde se conoce, el mecanismo de inhibición se relaciona con la disrupción de la membrana celular; Davidson (1997) lo resume en tres procesos: ruptura de la membrana celular, daño a la bicapa fosfolípida e interferencia con la permeabilidad de la membrana. Adicionalmente, Sánchez *et al.* (2010) mencionan también como otro mecanismo el cambio de pH intracelular.

### **2.1.4. Plantas con principios antimicrobianos**

Se han reportado que diversas hierbas oriundas del Perú presentan actividad antimicrobiana. Para esta investigación, se escogió la tara, moringa y el airampo ya que anteriores trabajos han señalado que poseen actividad antimicrobiana.

## **a. Tara**

### **a.1. Generalidades**

Es una planta nativa del Perú, *Caesalpinia spinosa*, originaria del Perú. Es un árbol de dos a tres metros de altura; su corteza se caracteriza por una coloración gris espinosa; las hojas tienen forma de plumas, ovoides y brillante levemente espinosa, color verde oscuro y mide 1,5 cm de largo; presenta flores amarillentas con pigmentos rojizos de 8-15 cm de largo. Los frutos son vainas explanadas e indehiscentes de color naranja que contiene de 4 a 7 semillas. Crece en los valles o lomas de la Costa, por la vertiente occidental y los valles interandinos de los Andes (Castro *et al.* 2013). La vaina de tara se muestra en la Figura 2.



**Figura 2: Vaina de tara**

**Fuente:** SINEACE (2017)

Destaca el alto contenido de taninos; la vaina concentra entre 40-60 por ciento de ellos, asimismo su componente principal es el ácido gálico (Kondo *et al.* 2006; Villanueva 2007). Este ácido se usa para la elaboración de tintes, curtido de pieles y como medicina desde los tiempos antiguos. Actualmente, su valor radica como materia prima para el mercado de hidrocoloides alimenticios; Perú concentra el 80 por ciento de la producción a nivel global (De la Cruz 2004).

### **a.2. Actividad antimicrobiana del extracto acuoso de tara**

El ácido gálico está asociado a la actividad antimicrobiana del extracto acuoso de tara (Cristina *et al.* 2019). Diversos estudios han reportado su actividad antimicrobiana:

- López *et al.* (1998) demostraron que el extracto de tara posee actividad antimicrobiana en bacterias gram (+) y gram (-), *Candida albican*, *Penicillium spp* y *Aspergillus spp*. Asimismo, se determinó que la vaina presenta la mayor concentración de taninos.
- Añanca (2009) reportó que la concentración mínima fue 13 ug/mL para a *St aureus*.
- Zárate (2015) registró que la actividad antimicrobiana es similar a la observada por el antibiótico gentamicina para *E. coli*.

### **b. Moringa**

La moringa (*Moringa olifera Lam*) es un árbol nativo de la India y Bangladesh (Radovich 2009). Se cultiva en países tropicales de África, Asia y América Latina (Santos *et al.* 2015). Es un árbol de 7 a 12 metros de altura y 20 a 40 centímetro de diámetro (Liñan 2010). Su ciclo de vida es de 20 años promedio (Radovich 2009). Sus hojas son compuestas y están dispuestas en grupos de folíolos con cinco pares cuya una longitud es entre 30-70 cm. Sus flores son bisexuales con pétalos blancos y estambres amarillos, florecen una vez al año o dos dependiendo del país. Por último, sus frutos son vainas de color pardo, lineales de 20 a 45 cm de largo (Liñan 2010; Olson *et al.* 2011). Se muestra la hoja de moringa en la Fig. 3.



**Figura 3: Hoja de moringa**

**Fuente:** Peinado (2019).

La moringa posee una gran importancia como suplemento alimentario por su alto contenido de proteínas y vitaminas para la alimentación de aves, peces, ganados (Garavito 2008). Se ha demostrado que la moringa exhibe diversas propiedades medicinales para la curación de diversos males. Por otro lado, se la usa en el sector agroindustrial, forrajero, biocombustibles y tratamientos de agua (Velázquez-Zavala *et al.* 2015).

### **b.1. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de moringa**

Se atribuye su actividad antimicrobiana a la presencia de ácido felúrico, gálico y elágico,  $\alpha$  y  $\beta$  amirina en hojas; catequina en flores y fenilmetamina en semillas (Velázquez-Zavala *et al.* 2015). Se constata que la actividad antimicrobiana se concentra en las hojas:

- Pal *et al.* (1995) evaluaron el extracto etanólico de hojas de moringa en cuatro bacterias gram (+) y dos gram (-). Observaron que la hoja de moringa posee actividad antimicrobiana en todas estas bacterias a una concentración de 55 mg/mL.
- Peixoto *et al.* (2011) reportaron que una mezcla de extracto etanólico acuoso posee actividad antimicrobiana a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Aeromonas Caviae*, mientras no hubo inhibición en *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enteditis*. La concentración de inhibición fue de 400 uL/disco.
- Yentunde y Comfort (2015) concluyeron que la concentración mínima inhibitoria para diversos microorganismos es de 200 mg/mL.
- Wang *et al.* (2016) recopilaron un perfil antimicrobiano de la actividad antimicrobiana de diversas partes de la moringa. Se deslumbra que la hoja concentra la mayoría de los compuestos antimicrobianos.

### **c. Ayrampo**

El ayrampo o airampo (*Opuntia soherensii*) es una planta silvestre de la sierra central y sur, se distribuye por las zonas altas de Perú, Bolivia y Argentina. Pertenece al género *Opuntia spp*, pariente de la tuna (*Opuntia ficus-indica*). Se la describe como una planta herbácea pequeña de tallos aplanados ovoides; cuyos frutos son pequeñas bayas rojas carnosas (Lock de Ugaz 1994) crece óptimamente entre los 1700 y 2500 m.s.n.m y un rango de temperatura de 17 a 23°C. Su fruto consiste en un conglomerado de semillas unidas por un tejido parenquimatoso, este tejido y las semillas representan el 3,5 y 27,2% del peso total, respectivamente. Se utiliza el fruto como colorante natural para postres y como medicina natural para combatir la fiebre, conjuntivitis, gastritis, antiinflamatorio, fatiga entre otros (Sarmiento 2003). Se muestra la semilla de ayrampo en la Figura 4.



**Figura 4: Semilla de ayrampo**

### **c.1. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de ayrampo**

Si bien se ha identificado la presencia de fenoles, no se ha podido identificar cuál de ellos posee actividad antimicrobiana; no existen muchas investigaciones sobre el ayrampo, las pocas que hay, se enfocan en su uso como colorante natural.

- Soto (2014) determinó que a una concentración de 50 mg/mL de extracto etanólico genera halo de inhibición de 13-16,6 mm de diámetro en *E. coli*, *St. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. Asimismo, descarta que el extracto acuoso tenga actividad antimicrobiana.
- Christiana *et al.* (2019) mencionan que el extracto de la tuna (*Opuntia ficus-indica*) demostró actividad antimicrobiana para *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* entre otros. La concentración mínima inhibitoria es de 2,5-18,25 mg/mL.

### **2.1.5. Aplicación de extractos antimicrobianos en alimentos**

Los extractos se usan en la industria de alimentos como colorante, edulcorante, emulsificante, saborizante, entre otros. Se está explorando su uso como sustituto a los conservantes tradicionales usados en la industria alimentaria. Ya que los métodos de descontaminación habituales son cada vez menos efectivos y la aparición de cepas resistentes a estos conservantes ha generado preocupación en los empresarios y científicos (Álvarez-Ordoñez *et al.* 2009; Hayek *et al.* 2013). Se podría añadir que se los han relacionado a ciertos problemas

de salud, en consecuencia, los consumidores han buscado alternativas más saludables (Giner *et al.* 2012).

Se ha demostrado que añadir extractos antimicrobianos a productos alimentarios, inhiben el crecimiento microbiano, retrasando su deterioro y por ende aumentando su tiempo de almacenamiento (Gyawali *et al.* 2015). Esto señala una serie de oportunidades y desafíos:

#### **a. Oportunidad**

El potencial radica en diversos aspectos: algunos extractos han demostrado un amplio espectro de inhibición (Thielmann *et al.* 2017; Nada y Zainab 2013); pueden inhibir las esporas de bacilos esporulados (Sasa *et al.* 2016; Celenk y Ayse 2015); su obtención es simple, económica y accesible a comparación de otras opciones (Nada y Zainab 2013; Bevilacqua *et al.* 2011); su implementación sería más rápida, y no influyen en el aspecto sensorial (Thielmann *et al.* 2017; Rajauria y Tiwari 2018).

#### **b. Desafíos**

Se han señalado una serie de desafíos: se requiere de dosis mayores para emular los efectos observados (Negi 2012; Davidson 2001); la naturaleza del producto y sus ingredientes repotencian o disminuyen la actividad antimicrobiana (Bevilacqua *et al.* 2011; Negi, 2012); si bien su uso alarga el tiempo de vida, todavía, no es comparable con el uso de los conservantes tradicionales (Rajauria y Tiwari, 2018).

## **2.2. SEMILLA DE CHIA**

### **2.2.1. Generalidades**

La chía (*Salvia hispánica*) es una hierba nativa de Centroamérica, México y Guatemala (Di Sapiro *et al.* 2012). Se cultiva en diversas regiones tropicales y subtropicales (Capitani *et al.* 2013). Se considera como un alimento completo por su alto contenido de antioxidantes, vitaminas y ácidos grasos. Además, su consumo posee efectos positivos en la salud humana (Guevara-Cruz *et al.* 2012).

Ixtania (2010) señala que la semilla de chía tuvo suma importancia en la alimentación, arte, medicina y religión para los mayas y aztecas. Su cultivo fue practicado extensamente para satisfacer los tributos del Imperio Azteca que ofrendaba de 5 a 15 mil toneladas hacia sus dioses. No obstante, su práctica se terminó con la llegada de los españoles, que prohibieron su cultivo por ser blasfemo. Debido a ello, su consumo y comercio fueron relegados a ciertas regiones de México. Todo cambió en 1965 que empezó a vender como alimento saludable en California y Arizona. En 1980, su comercio se expandió por todo EEUU como suplemento alimenticio. Finalmente, se introdujo a Latinoamérica en 1991 cuando Argentina lo identificó como un potencial cereal para ayudar a diversificar su mercado interno (Rendón-Villalobos *et al.* 2018)

La semilla de chía está presente en Latinoamérica, la Unión europea y países del sudeste asiático. Respecto a su producción, Argentina representa el 35%, mientras que México, Bolivia, Australia y Paraguay representan un 15% (Busilacchi *et al.* 2015). En Perú, se cultiva en los departamentos de Arequipa, Cuzco, Lambayeque, La Libertad, Huánuco y Apurímac. La planta ha demostrado una buena adaptabilidad a las distintas altitudes y climas de estas regiones (Valdivia-López *et al.* 2017).

### **2.2.2. Descripción morfológica de la chía**

Es una planta herbácea anual, de 1 a 1,5 m de altura, con tallos ramificados de sección cuadrangular y hueco, con pubescencias cortas y blancas; hojas opuestas con bordes aserrados de 80 a 100 mm de longitud y de 40 a 60 mm de ancho, con diferentes grados de pubescencia; las flores son hermafroditas, azules o blancas (Capitani *et al.* 2013); la semilla son monospermas ovales de 1.5 a 2 mm de longitud y 1 a 1.2 mm de diámetro; son suaves y brillantes, de color pardo grisáceo con manchas irregulares castaño oscuro, en su mayoría y

en menor proporción blanquecinas (Di Sapio *et al.* 2012). Se muestra la semilla de chía en la Figura 5.



**Figura 5: Semilla de chía**

**Fuente:** Ávila (2016).

### 2.2.3. Componentes de la semilla de chía

Se muestra los componentes de la semilla de chía en la Tabla 1.

**Tabla 1: Composición centesimal de la semilla de chía**

COMPONENTE	CONTENIDO
Carbohidratos	42,12 g
Fibra alimentaria	34,40 g
Grasas	30,74 g
Proteínas	16,54 g
Agua	5,80 g
Tiamina (vit. B1)	0,620 mg
Niacina (vit. B3)	8,830 mg
Vitamina C	1,6 mg
Vitamina E	0,50 mg
Calcio	631 mg
Hierro	7,72 mg
Magnesio	335 mg
Fósforo	860 mg
Potasio	407 mg

**Fuente:** USDA (2019).

### 2.2.4. Aplicaciones de la chía en alimentos

En México, se usó para la elaboración de una bebida comúnmente conocida como chía fresca, en la cual se mezcla el grano y agua o jugo con azúcar (Busway *et al.* 1981). Después de su

globalización, distintos países la usan para la elaboración de diversos alimentos; jugos, galletas, cereales, productos de panadería, en los cuales resaltan su valor nutricional. Asimismo, se vende como suplemento alimenticio por sus propiedades nutricionales en los EEUU (Rendón-Villalobos *et al.* 2018). También, se vende como alimento funcional ya que su consumo se relaciona a resultados favorables a la salud (Guevara-Cruz *et al.* 2012).

Su aplicación en alimentos va desde mantener el color y la textura; mejorar la humidificación y estabilidad emulsificante, y enriquecedor natural. De lo anterior, se resalta este último con la finalidad de aumentar el valor nutricional (Rendón-Villalobos *et al.* 2018). Como ejemplos se puede mencionar: Garda *et al.* (2012) concluyen que el uso de chía en panes libre de gluten mejoró el volumen y valor nutricional; Pizarro *et al.* (2015) reportaron que los panes con harina de chía tuvieron una buena aceptación y una mejora de la ratio de Omega-6/omega-3; y Arroyo-Mera (2013) observó que pasteles, raviolos, tamales y rissoto a base de chía fueron aceptado por un panel de 12 jueces que reconocieron su calidad. Su uso como ingrediente o sustituto también es posible porque no presenta un sabor distintivo o fuerte.

## **2.3. JUGOS Y NÉCTARES**

### **2.3.1. Generalidades**

El jugo se define como el líquido sin fermentar, pero fermentable, que se obtiene de la parte comestible de frutas en buen estado debidamente maduras y frescas o frutas que se han mantenido en buen estado por procedimientos adecuados, inclusive por tratamientos de superficie aplicados después de la cosecha; mientras que los néctares se define como el producto sin fermentar, pero fermentable, que se obtiene añadiendo agua con o sin la adición de azúcares de miel y/o jarabes y/o o a una mezcla de éstos. Podrán añadirse sustancias aromáticas, componentes aromatizantes volátiles, pulpa y células, todos los cuales deberán proceder del mismo tipo de fruta y obtenerse por procedimientos físicos (FAO 2005). Dependiendo de la formulación de la bebida, la proporción de los ingredientes varían, esto conlleva a cambios de denominaciones que la Norma Técnica Peruana 203.110 define.

La elaboración de jugos de frutas y néctares en el Perú, obedece los criterios y recomendaciones de la Norma Técnica Peruana 203.110. de INDECOPI (2009): debe tener un pH menor de 4,5; puede ser turbio, claro o clarificado y el contenido de sólidos solubles provenientes de la fruta presentes en el néctar deberá ser mayor o igual al 20 por ciento de sólidos solubles contenidos en el jugo original para todas las variedades de frutas.

### **2.3.2. Jugos o néctares enriquecidos/fortificados**

Se define como enriquecer cuando se añade un compuesto en el alimento no presente en el original. Al contrario, fortificar se define cuando se aumenta la concentración de un compuesto ya presente. En ambos procesos, los nutrientes son suplementados sin finalidad terapéutica (Vidal y Veciana 2012).

Se enriquece cuando los procesos de elaboración (pasteurización, cocción, trituración) y factores externos (clima, cambios estacionales, desastres naturales) disminuyen significativamente la concentración de nutrientes en alimentos (Rendón-Villalobos *et al.* 2018). Es habitual que este proceso se destine a cereales, panes, pastas y ciertos sectores de bebidas (Rendón-Villalobos *et al.* 2018). Asimismo, es una solución que el estado y la empresa emplea por distintas razones: las empresas enriquecen para evitar que los alimentos pierdan su valor nutricional en el mercado; mientras que el estado lo hace para mejorar la dieta de una población vulnerables o combatir una enfermedad, por ejemplo, se enriquece las bebidas con hierro para combatir la anemia en los niños (Vidal y Veciana 2012). Por otra

parte, este proceso trae grandes ventajas a las empresas ya que aumentan el valor comercial del producto al consumidor, permite una diferenciación de la competencia y su implementación suele ser de bajo costo (Rendón-Villalobos *et al.* 2018).

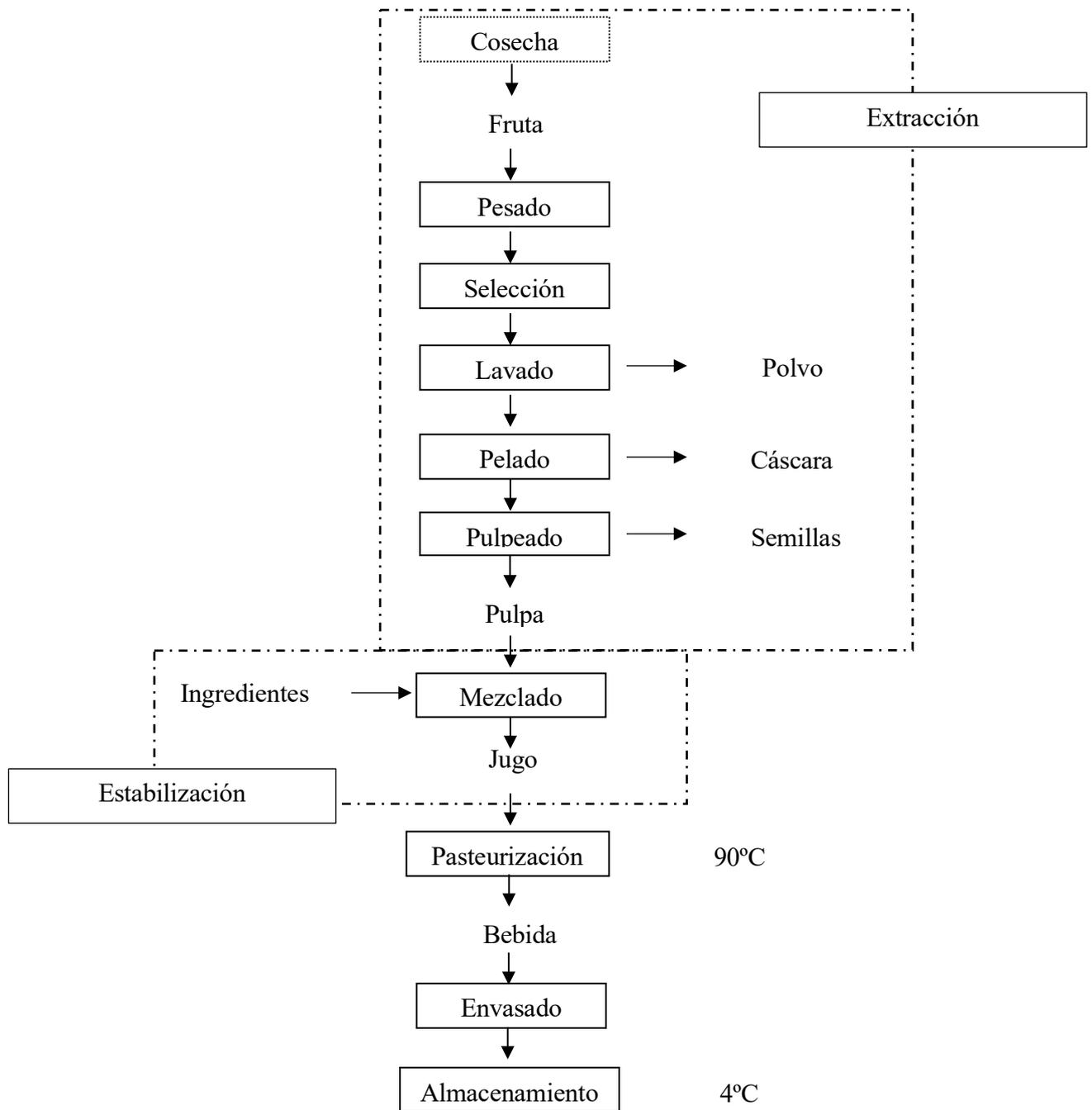
#### **a. Jugos o néctares enriquecidos con chía**

La incorporación de la semilla de chía en jugos tiene antecedentes en México donde se elaboraba una bebida conocida como chía fresca que es una mezcla de agua con semilla de chía (Busway *et al.* 1981). EEUU lideró el cambio con la venta de 100 jugos con chía en el 2012 (Busilacchi *et al.* 2015). Esta estrategia se basó en el alto valor nutricional de la semilla que dio un valor agregado y un atractivo a los consumidores preocupados por su salud (Xingu *et al.* 2017).

Rendón-Villalobos *et al.* (2018) recopilaron una serie de investigaciones que demostraba que la incorporación de semilla de chía aumentaba el valor nutricional de diversos alimentos, esto reforzaba la concepción de ser un enriquecedor natural (Busilacchi *et al.* 2015). Debido a ello, Rendón-Villalobos *et al.* (2018) proponen que los alimentos con semilla de chía, entre ellos los jugos y néctares, se denominan *productos enriquecidos nutricionalmente*. Esta denominación sería la más adecuada; ya que la semilla de chía eleva todo el valor nutricional del producto (Xingu *et al.* 2017).

### 2.3.3. Proceso de producción

En la Figura 6, se muestra el flujo de proceso para la elaboración de jugos y néctares:



**Figura 6: Flujo de procesos para jugos**

Fuente: Rajauria y Tiwari (2018).

- **Extracción:** incluye las operaciones unitarias de cosecha, pesado, selección, lavado, pelado y pulpeado; la cosecha, el pesado y la selección aseguran la calidad física del fruto, mientras que el lavado reduce la población microbiana y los residuos químicos,

y el pulpeado asegura la calidad de la pulpa. La finalidad es obtener la pulpa de fruta para la elaboración de los jugos y néctares.

- **Estabilización o clarificación:** busca aclarar el jugo para ello, se separa los componentes por medio de métodos físicos o químicos. Los métodos recomendados son la filtración, centrifugación, precipitación o maceración; la clarificación por acción de las enzimas es el método más conocido; está se basa en el uso de la pectinasa para reducir la viscosidad del jugo.
- **Pasteurización:** se realiza para desactivar enzimas y reducir la carga microbiana. Esto con la finalidad de conservar el producto por un mayor tiempo.
- **El envasado y el almacenamiento:** ambos procesos aseguran la presentación de producto y proteger de las condiciones externas que puedan deteriorar su tiempo de vida.

#### 2.3.4. Criterios para jugos y néctares

Los jugos y néctares deben cumplir los siguientes requisitos:

**Tabla 2: Criterios de calidad para jugos y néctares**

	<b>Criterio</b>	<b>Especificaciones</b>
<b>Fisicoquímico</b>	Grado Brix °	Mínimo 12° Brix
	pH	Máximo 4,5
	Acidez	4,4 % de ácido cítrico
<b>Microbiológico</b>	Levaduras	10 UFC/mL
	Mohos	10 UFC/mL
	Mesófilos aerobios	10 <sup>2</sup> UFC/mL
	Coliformes Totales	<3 UFC/mL

**Fuente:** DIGESA (2008) e INDECOPI (2009).

## **2.4. CONSERVACIÓN DE BEBIDAS**

La conservación de bebidas se basa en la combinación de operaciones para asegurar que el tiempo de vida sea lo más largo posible. Estas operaciones son el lavado, uso de tratamientos descontaminantes, conservantes, y almacenamiento. Asimismo, se usa las propiedades intrínsecas de los jugos para aumentar su conservación, por ejemplo, el pH <4,5 de los néctares dificulta el crecimiento de las bacterias. También, se tiene en cuenta pasos previos como las buenas prácticas de manufactura y la inocuidad de los ingredientes ya que basta solo una pequeña contaminación para estropear toda la bebida (Rajauria y Tiwari 2018; Tribst *et al.* 2009). En esta investigación, se va a centrar en los conservantes naturales, se define conservante todo compuesto cuya finalidad es aumentar el tiempo de vida por medio de la inhibición del crecimiento de bacterias y hongos.

### **2.4.1. Conservantes tradicionales**

Son compuestos químicos ampliamente usados por la industria por su bajo costo, abundancia y efectividad. Anteriormente, se mencionó que su uso se ha empezado a cuestionar por la aparición de cepas resistentes y problemas relacionados a la salud como problemas respiratorios y estomacales. Los conservantes más utilizados son el benzoato de sodio, metabisulfito de potasio y, sorbato de potasio y sus derivados (Sasaki *et al.* 2002; Stratford *et al.* 2007)

### **2.4.2. Conservantes naturales**

Su nombre alude a todo compuesto o sustancia que su obtención no es la síntesis química industrializada. Estos incluyen a los aceites esenciales, extractos vegetales, quitosano, compuestos fenólicos y bacteriocinas. Se ha reportado que poseen un amplio espectro de inhibición, no ocasiona problemas a la salud e incluso algunos demuestran efectos superiores a comparación de los conservantes tradicionales (Massilia *et al.* 2009). No obstante, se han percibido una serie de problemas para su aplicación a escala. Aparte, se debe tener en cuenta que la actividad antimicrobiana se puede reducir por la consistencia de los alimentos y pH, obligando a aumentar las concentraciones y afectando el sabor (Negi 2012). Davidson *et al.* (2013) menciona que el conservante ideal sería aquel que es efectivo a bajas concentraciones, costos bajos, imperceptible, seguro y un amplio espectro de inhibición.

#### **a. Aceites esenciales**

Los aceites esenciales se refieren a una mixtura de metabolitos secundarios, estos son lipofílicos, altamente volátiles y aromáticos. Su obtención mayormente es por la destilación.

Destacan por su alta actividad antimicrobiana y eficacia a pH bajos. Lamentablemente, su incorporación a bebidas afecta negativamente el sabor y la presentación del producto. Asimismo, su producción es cara y rendimiento bajo, por lo tanto, dificultando su implementación (Massilia *et al.* 2009; Hyldgaard *et al.* 2012).

#### **b. Quitosano**

El quitosano es un derivado natural de la quitina, es un biopolímero de aminopolisacáridos, compuesto por  $\beta$ - D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina, se halla en la concha y los caparzones de los crustáceos (No *et al.* 2007). Es un conservante prometedor por su amplio espectro de inhibición y bajas concentraciones, asimismo, su obtención encaja en una estrategia de aprovechamiento integral que reduciría costo y disminuirá el impacto ambiental que ocasiona la industria pesquera y los restaurantes marinos (Pandey 2018).

#### **c. Extractos**

Anteriormente, se discutió su definición más es una mixtura de metabolitos secundarios relacionados a la fisiología vegetal. Juega a su favor que su obtención es simple, económica y accesible, por lo tanto, su implementación es más viable a comparación de las otras opciones (Nada y Zainab 2013). Además, son solubles, esto facilita una distribución uniforme en toda la bebida (Rajauria y Tiwari 2018). Su incorporación a bebidas no altera la presentación y cualquier efecto en el sabor se puede enmascarar. Existen dos defectos: altas concentraciones y su bajo espectro de inhibición (Thielmann *et al.* 2017). Se ha propuesto como una solución el uso de métodos combinados, es decir, extractos y métodos descontaminantes para compensar esas fallas (Bevilacqua *et al.* 2011).

## **2.5. MICROBIOLOGÍA DE BEBIDAS Y SEMILLAS**

Debido a la composición y la consistencia de los jugos y néctares, estos son altamente susceptibles al deterioro. Los jugos contienen un amplio rango de microorganismos, proveniente de la pulpa de fruta u otros ingredientes, esto obliga a verificar que estos ingredientes sean inocuos.

### **2.5.1. Semilla de chía**

No existe información detallada sobre la microbiología de la semilla de chía. A diferencia de otras semillas, su población microbiana consiste mayormente en levaduras, *E. coli* y *St. aureus*. Las levaduras son la principal preocupación debido a su alto número, no deben sobrepasar los 1000 UFC/g (Miranda 2012). En singular destaca la aparición de *Bacillus* y *Sporolactobacillus spp* de entre todas las bacterias (Ávila 2014). Se emplea un tratamiento térmico como tratamiento descontaminante que, si bien elimina la mayoría de bacterias, no a los esporulados y los mohos termófilos. Son estos dos últimos los responsables del deterioro en bebidas ya que pueden sobrevivir a la pasteurización y propiciar las condiciones adecuadas para la propagación de las levaduras y los *Lactobacillus spp*, provenientes de la pulpa de fruta (Kotzekidou 1997).

### **2.5.2. Pulpa de maracuyá, fresa y arándano**

La microbiología de la pulpa de fresa es la más estudiada por ser una fruta muy usada en la industria de alimentos. Se reporta el hallazgo de *Rhodotorula spp*, *Candida spp* y *Cryptococcus spp* en la fresa (Jense *et al.* 2013). Asimismo, se ha identificado *Bacillus subtilis*, *Enterobacter ludwigii*, *lactobacillus plantarum* y *Pantoea punctata*, especial mención al género *Pseudomonas*, *Serratia* y *Enterobacter* (De Melo *et al.* 2012). Por otra parte, se ha reportado que la preocupación en los jugos de pulpa de arándano son *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium expansum*, *Rhodotorula spp*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Alicyclobacillus acidoterrestris* (Rezek *et al.* 2017). Por último, se han aislado *Saccharomyces spp*, *Candida spp* y *Alicyclobacillus spp* en la pulpa de maracuyá (Mcknight *et al.* 2001). En general, los microorganismos asociados a estas tres frutas son las levaduras, bacterias lácticas, bacterias gram negativas de los suelos, bacterias esporuladas y mohos. La diversidad de microorganismos suele variar de acuerdo a la geografía, temporada y técnicas de postcosecha (ICMSF 2005). La mayoría de ellos son susceptibles al calor, por lo tanto, no representa un problema si son sometidas al calor.

Las pulpas de estas tres frutas contienen un alto contenido de compuestos fenólicos ya que estos le confieren esos colores vistosos característicos (Yuan y Badude 2018). Algunos de estos compuestos fenólicos presentan actividad antimicrobiana que pueden ayudar a controlar el desarrollo de los microorganismos: se detectó quercetina y ácidos fenólicos (ácido gálico y felúrico) en la pulpa de arándano (Chen *et al.* 2010); ácido hidrobenczoico y derivados del ácido felúrico en los jugos de maracuyá (Talcott *et al.* 2003) y catequina, quercetina, ácido hidrobenczoico y felúrico en los jugos de fresa (Fernández *et al.* 2012). Estos compuestos fenólicos están asociados a la actividad antimicrobiana observada en diversos extractos (Lima *et al.* 2019). A pesar de eso, las pulpas favorecen el crecimiento de levaduras, bacterias acéticas y lácticas debido al alto contenido de azúcares (>5 por ciento). Hay que añadir que es necesario una concentración superior al 10 mg/mL de un compuesto antimicrobiano para observar un efecto significativo en el jugo (Pandey y Negi 2018). Se presenta la siguiente tabla:

**Tabla 3: Composición centesimal de tres jugos de frutas**

Fruta	Azúcares (g/100g)	Agua (g/100g)	Brix a 20°C	Compuestos fenólicos (mg GAE/100mL)
Maracuyá	11,2	72,93	12	36,2
Arándano	9,96	84,21	10	96,3-198,1
Fresa	4,89	90,95	7,5	192

**Fuente:** USDA (2019) e Yuan y Badude (2018).

### 2.5.3. Bebida con pulpa de fruta pasteurizada

#### a. Mesófilos aerobios

Toda bacteria que se desarrolle entre 30 a 40°C necesita oxígeno para sobrevivir. Altos números no necesariamente representa un peligro para la salud humana; está más relacionado con la inocuidad de los ingredientes y manipulación de ellos, incluso se dice que poblaciones menores a  $10^6$  Ufc/g no estropean el producto (Fonseca y Giovanna 2008). La DIGESA (2008) exige una población microbiana menor a  $10^2$ Ufc/g. La preocupación se debe a la posible presencia de bacterias patógenas. A continuación, algunas bacterias patógenas halladas en bebidas:

- *E. coli O157:H7*: variante de la *E. coli*, es un bacilo gram negativo y oxidasa negativa, Destacan por producir la verotoxina I y II. Se le considera la principal causante de

enfermedades por infección de alimentos. Asimismo, se desarrolla con facilidad en bebidas sin pasteurizar (Burnett y Beuchat 2000; Duffy *et al.* 2008).

- *Salmonella spp*: es un bacilo gram negativa y oxidasa negativa. Responsable de la Salmonelosis. Se les asocia a los jugos sin pasteurizar y reconstituidos. Se recomienda un tratamiento térmico para eliminarlo puesto que es sensible al calor (Danyluk *et al.* 2012).
- *Listeria monocitogenes*: es un bacilo gram positivo catalasa positiva. Responsable de listeriosis. No existen casos relacionados a estas bacterias en bebidas; no obstante, existen una preocupación por su capacidad de poder sobrevivir a temperatura bajas y en superficies de equipos (Caggia *et al.* 2009)
- *Staphylococcus aureus*: es un coco gram positiva catalasa positiva. Su infección se asocia a las enterotoxinas, estas destacan por su resistencia al tratamiento térmico e irradiación. Se relaciona su presencia a la falta de limpieza de instrumentos o ambientes sucios y se hallan en jugos frescos de naranja (Argudin *et al.* 2010)
- *Vibrio cholerae*: es un bacilo gram negativa móvil. Responsable del cólera y la diarrea. Es un microorganismo habitual en moluscos, mariscos, plantas del mar, ríos y reservorios (APHA 2001). Aun así, se ha reportado en jugos y néctares de naranja sin pasteurizar, su presencia se ha relacionado a problemas de salubridad del agua empleada o frutas del suelo mal limpiadas (Mahade *et al.* 2008).

#### **b. Bacterias ácido lácticas**

Son un grupo de bacterias productoras de ácido láctico, benéficas a la industria alimentaria y la medicina. El pH ácido de los jugos favorece su crecimiento, destacan entre ellas, los *Lactobacillus spp* y *Leuconostoc spp* (Hui 2006). Arruinan el sabor de las bebidas a través de la producción del acetilmetilcarbonil, diacetil y dextranos, estos otorgan un sabor similar a la mantequilla. Su detección señala falta de limpieza en los aparatos y su eliminación se recomienda con tratamientos térmicos (Aneja *et al.* 2014; Tribst *et al.* 2009).

#### **c. Bacterias acéticas**

Son bacilos gram negativos, móviles, aerobios estrictos que destacan por la capacidad de convertir lactato a acetato, pueden crecer a pH bajos y condiciones hostiles. Se ha detectado su presencia en las superficies de equipos debido a ello son contaminantes frecuentes de los

jugos de frutas (Worobo y Splittstoesser 2005). Son las responsables del olor y sabor agrio similar al vinagre, este se relaciona al ácido acético producido por estas bacterias (Woodroof 2012). Los más reportados son *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* y el *Gluconobacter spp* (ICMSF 2005).

#### **d. Esporulados**

Son bacterias que se distinguen por su reproducción por esporas. Los géneros más destacados son *Bacillus*, *Clostridium* y *Alicyclobacillus spp*. Estos últimos son esporulados acidotermófilo y, son los principales deterioradores de diversos jugos. Entre ellos, *Alicyclobacillus acidoterrestris* es el más citado, ya que puede crecer entre temperatura de 26 a 55°C y pH de 2,5 a 6.0; esto le permite desarrollarse con facilidad en diversos jugos de frutas (Chen *et al.* 2006). Daña el producto por medio de la formación del 2-metoxi fenol y halo fenoles que le dan un olor medicinal (Pettipher *et al.* 1997; Yamazaki *et al.* 1996).

#### **e. Mohos Termófilos**

Son ascomicetos, cuya reproducción se da por asco, una célula productora de ochos esporas. Pueden deteriorar los jugos pasteurizados ya que sus esporas son resistentes al calor y se desarrollan a bajos niveles de oxígeno (Pit y Hocking 2009; Kotzekidou 1997). Se detecta al observar la presencia de micelios, aun así, los reportes señalan que no son una amenaza significativa. Las especies más mencionadas son *Byssochlamys nivea*, *B fulva*, *Talaromyces flavus*, *Neosartorya fischery* y *Eupenicillium spp* (ICMSF 2005).

#### **f. Levaduras**

Las levaduras son hongos ascomicetos o basidiomicetos, anaerobios facultativos y ácido tolerantes, esto les permite crecer en los jugos de frutas con relativa facilidad. Estas provienen de las huertas y granjas. Diversas frutas pueden contener desde  $10^3$  a  $10^5$  UFC/g de levaduras (Salamao *et al.* 2014). Su crecimiento va acompañado de la formación de glicerol, ácido  $\alpha$  cetoglutarico, etanol, ácido pirúvico y dióxido de carbono; estos compuestos ocasionan turbidez, floculación y fermentación en las bebidas (ICMSF 2005). Las especies más reportadas son la *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* y *Zygosaccharomyces rouxii* (Deak y Beuchat 1993).

La contaminación de levadura en jugos de frutas está relacionada a la falta de higiene, materiales contaminados y, sobre todo, a una pasteurización fallida, ya que las levaduras no son resistentes al calor (ICMSF 2005). Si bien, los conservantes tienden a inhibir la mayoría

de ellos; algunas levaduras pueden proliferar e incluso descomponerlo para usarlo como fuente de nutrientes (Sasaki *et al.* 2002). Entre ellos, se mencionan a la *Zygosaccharomyces bailii*, un osmotolerante, fermentador excesivo, su presencia se asocia a la deformación de la botella por producción de gas (Pit y Hocking 2009).

## **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

- La evaluación microbiológica y sensorial de la semilla de chía y de las tres bebidas se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos, y su elaboración en el Laboratorio de Tecnología de Alimentos y Productos Agropecuarios (TAPA), Universidad Nacional Agraria La Molina.

### **3.2. MATERIA PRIMA, INSUMOS Y UTENSILIOS**

- Vaina de tara
- Semilla de airampo
- Hoja de moringa
- Semilla de Chía irradiada
- Stevia (ArtPack)
- Ácido cítrico (Frutarom Founded)
- CMC Marca (Frutarom Founded)
- Goma Xantana (Frutarom Founded)
- Concentrado de maracuyá (La Cosecha)
- Colorante Montecarmin 11325 (Frutarom Founded)
- Esencia Fresa 04382 (Frutarom Founded)
- Esencia Blueberry 28720 (Virgina Dore)
- Pulpa congelada de arándano Grado Brix 10, fresa Grado Brix 9,5 y maracuyá Grado Brix 14 (Del frutto)
- Olla
- Cocina

### **3.3. MATERIALES Y EQUIPOS**

#### **3.3.1. Materiales**

- Tubo de vidrio de boca ancha con tapa rosca
- Probeta de vidrio de 100mL
- Botella de vidrio de Tapa rosca 100, 250 y 500 mL (BOECO)
- Vaso precipitado de vidrio de 100,250 y 500 mL (BOECO)
- Caja de 100 hisopo estéril (Laboratorio Carmen)
- Placa de plástico estéril (Himedia)
- Placa de 96 pocillo de fondo en U (Himedia)
- Micropipeta de 1-10uL (DragonLab)
- Micropipeta de 20-200uL (DragonLab)
- Micropipeta de 100-1000uL (DragonLab)
- Micropipeta de 1000-5000uL (DragonLab)

#### **3.3.2. Equipos**

- Cámara de incubación (Kossodo Modelo BIO0318)
- Baño maría (ThemorFisher)
- Autoclave (Myynti ja Hijolto Modelo Vitikka)
- Micropozo (Biotek Modelo Power Wave XS2)
- Potenciómetro (Hanna Modelo Microprocesor 2.11)
- Balanza. Analítica (Adventure Ohaus Corp. Modelo AR210)
- Balanza (Sartorius. Modelo TE412N)
- Cámara de flujo laminar Clase II Tipo A2 (Isocide)
- Centrifuga (Boeco Modelo U326R)
- Stomacher 400 Circulated
- Vortex Gene 2 (Scientific Industries)

- Fluorescent Quantitative Detection System (Bioer. Modelo FOD96A9)

### **3.3.3. Medios de cultivo**

- Agar OGY (Himedia)
- Agar PC (Himedia)
- Agar Extract Glucose Triptone (Biolife)
- Agar MRS (Biolife)
- Agar Sauborand (Biolife)
- Caldo Mueller-Hilton (Biolife)
- Agar Mueller-Hilton (Biolife)
- Peptone Water (Himedia)
- MYP (Himedia)
- BAT (Himedia)
- Agar Thermoacidurans (Himedia)
- Agar M-BCG Yeast and Mould (Himedia)
- Agar Lactic (Himedia)
- Agar Brettanomyces (Himedia)
- Agar Preservative Resistant yeast (Himedia)
- Agar Acetobacter (Himedia)
- Agar Bromocresol Purple glucose (Biolife)
- Agar DRBC Chloramphenicol (Biolife)
- Agar Potato Dextrose (Biolife)
- Agar Czapek Pack (Biolife)
- Agar Baird Parker (Biolife)
- Agar Malt Extract (Biolife)

### 3.3.4. Reactivos

- Set de cebadores para *Saccharomyces spp* (Macrogen)
- Set de cebadores para *Saccharomyces cerevisiae* (Macrogen)
- Set de cebadores para *Lactobacillus spp* (Macrogen)
- Nucleo Spin Microbial DNA (Macherey Nagel)
- Nucleospin Bead tube Type C (Macherey Nagel)
- Agua Grado Molecular (Macherey Nagel)
- Sybergreen 2X Master Mix (Bioline)
- Rap ID Yeast Plus System (Thermo Fisher)
- Rap ID One System (Thermo Fisher)
- Rap ID Sthap plus System (Thermo Fisher)

## 3.4. MÉTODOS DE ANÁLISIS

### 3.4.1. Métodos Microbiológicos

#### a. Determinación de la actividad antimicrobiana

Se realizó la determinación de la actividad antimicrobiana de acuerdo a los lineamientos del Clinical Laboratory Standards Institute (2003).

- Método de difusión en agar

Las cepas de bacterias se cultivaron en agar nutritivo por 24 horas a 37°C; mientras que los hongos se cultivaron en agar sauborand por 48 horas a 25°C. Se preparó un inóculo de 10<sup>6</sup> Ufc/mL: se tomó con un hisopo estéril tres colonias de las cepas cultivadas anteriormente y se las diluyó en un tubo con solución salina al 0,85 por ciento. Para las bacterias a 625nm, la absorbancia debe situarse entre 0,09-0,13; esto se ajusta a una concentración de 10<sup>8</sup> UFC/mL y se diluyó en 1:100 para alcanzar la concentración deseada. Para los hongos a 530nm, la absorbancia debe situarse entre 0,12-0,15; esta se ajusta a la concentración de 10<sup>6</sup> UFC/mL.

Se tomaron 100uL de cada cepa y se esparció con un hisopo estéril en placas Petri con agar Mueller-Hilton para bacterias y agar Sauborand Dextrose para levaduras y mohos. Se hizo seis hoyos con un sacabocado de 5 mm de diámetro. Cuatros hoyos se llenaron con 50uL de

extracto. Mientras que uno se llenó con agua y otro con alcohol. Se incubó por 24 horas para bacterias y 48 horas para hongos; se midió el halo de inhibición.

- Método de Microdilución en caldo

Se llenó con 90 uL caldo Mueller-Hilton a los 96 pocillos de la placa. A la segunda columna, se le añadió 90 uL de extracto y a partir de esta se realizó diluciones seriadas hasta la columna 11. La concentración de extracto fue de 16 -0,03 mg/mL para airampo, de 61,2-0,10 mg/mL para tara y 98,6-0,38 mg/mL para moringa. Posteriormente, se añadió 10 uL de inóculo de  $10^6$  UFC/mL de cada cepa desde la columna 2 hasta la 12. Se incubó a 37 °C por 24 horas.

### **b. Recuento de microorganismo**

Para el tratamiento descontaminante, se realizó el recuento de bacterias aerobias mesófilas, esporuladas totales, lácticas, mohos y levaduras de la semilla de chía según el método de la ICMSF (2005) antes y después de la aplicación del ozono, la irradiación y a sus respectivas dosis.

Para la estabilidad microbiológica, se realizó un recuento de marcadores de deterioro (mohos, levaduras, aerobios mesófilos y coliformes) según el método del APHA (2015) a las bebidas de pulpa de fruta con extracto y chía. Al principio, se evaluaron dos lotes de bebida de maracuyá de 0.0 (Control) y 0.5% de extracto antimicrobiano cada 7 días hasta que supere el límite de DIGESA (2008). Ante los resultados positivos, se evaluaron estos marcadores de deterioro a seis lotes de bebidas de maracuyá, fresa y arándano al 0.5 y 0.7% de extracto antimicrobiano, cada 10 días hasta su deterioro.

### **c. Aislamiento e Identificación de los Microorganismos Sobrevivientes**

Para la identificación de sobrevivientes, se realizó el aislamiento y la identificación morfológica, bioquímica y molecular de los microorganismos sobrevivientes aisladas de las bebidas sobrantes de la determinación de la estabilidad microbiológica. Solo fueron sometidas a este proceso aquellas bebidas que presentaron rasgos visibles de deterioro (hinchamiento, turbidez, floculación, coloración).

#### **c.1. Identificación de Levadura**

El aislamiento y la identificación bioquímica de las levaduras se realizaron de acuerdo al ICMSF (2005).

- **Aislamiento de levadura**

Se pesaron 10 mL de muestra y se diluyeron en 90mL de solución peptonada. Se realizaron diluciones hasta  $10^{-3}$ . Se sembró en agar DBRC y se cultivó a 25°C por 5 días. Asimismo, se sembró en agar *Brettanomyces* y PRY para identificar levaduras del género *Brettanomyces spp* y *Zygosaccharomyces spp*, respectivamente. Estos medios fueron cultivados a 25° C por 5 días. Aquellas colonias con apariencia cremosa fueron sembradas por estrías en agar sauborand a 30°C por 3 días. Las levaduras fueron agrupadas según su forma y color.

- **Identificación bioquímica**

Las colonias fueron cultivadas en agar sauborand a 30 °C por 3 días. Se cogió con un hisopo estéril un poco de colonia y se diluyó en un tubo con solución salina hasta alcanzar la turbidez recomendada. Posteriormente, se empleó el RapID Yeast Plus y se identificó a las levaduras.

- **Identificación molecular de *Saccharomyces cerevisiae***

La identificación molecular se realizó de acuerdo a la guía de instrucciones de la empresa Bioline. Se cultivaron aquellas levaduras sospechosas en caldo Sauborand a 30 °C por 3 días. Se centrifugó 2 mL de cultivo a 14000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se extrajo ADN de acuerdo al Kit de extracción Nucleo Spin Microbial DNA. Se empleó la siguiente proporción para el mix de PCR: Sybergreen 2X Master Mix (10 uL), ADN (5 uL), cebador (1,6 uL) y agua (3,4 uL). El contenido final fue 20uL y la concentración de cada primer fue 200nM. La programación de la PCR en tiempo real fue: un ciclo de dos minutos a 95 °C y 40 ciclos que abarca 15 segundos a 95 °C, 5 segundos a 72 °C y 20 segundos a 60 °C cada ciclo. Se empleó los siguientes cebadores:

**Tabla 4: Cebadores para identificación de *Saccharomyces spp***

Microorganismo	Cebadores	Fuente
<i>Saccharomyces spp</i>	5' GAAAACTCCACAGTGTGTTG 3'	Zot <i>et al.</i> (2010)
	5' GCTTAAGTGCGCGGTCTTG 3'	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5' CGCAGAGAAACCTCTCTTTGGA 3'	Hierro <i>et al.</i> (2007)
	5' ATCGAATTTTTGAACGCACATTG 3'	

## c.2. Identificación de bacterias lácticas

Para la identificación de sobrevivientes, se realizó el aislamiento y la identificación bioquímica de las bacterias lácticas de las bebidas sobrantes de la determinación de la estabilidad microbiológica según ICMSF (2005). Solo fueron sometidas a este proceso aquellas bebidas que presentaron rasgos visibles de deterioro (hinchamiento, turbidez, floculación, coloración). Mientras que la identificación molecular se hizo según el protocolo de la Empresa Bioline.

### • Aislamiento de bacterias lácticas

Se pesaron 10 mL de muestra y se diluyeron en 90mL de solución peptonada. Se realizaron diluciones hasta  $10^{-2}$ . Se sembró en agar lactic y MRS, y se cultivó a 37°C por 3 días. Asimismo, se sembró en agar MSE para identificar las bacterias del género *Leuconostoc spp*, a 25° C por 5 días. Aquellas colonias blancas fueron sembradas por estrías en agar MRS a 37°C por 3 días. Cada placa fue identificada por un código.

### • Identificación molecular de *Lactobacillus spp*

Se cultivaron aquellas bacterias sospechosas en caldo MRS a 37°C por 3 días. Se centrifugó 2mL de cultivo a 14000 rpm y se desechó el sobrenadante. Se extrajo ADN de acuerdo al Kit de extracción Nucleo Spin Microbial DNA. Se empleó la siguiente proporción para el mix de PCR: Sybergreen 2X Master Mix (10uL), ADN (5uL), cebador (1,6uL) y agua (3,4uL). El contenido final fue 20uL y la concentración de cada primer fue 200nM. La programación de la PCR en tiempo real fue: un ciclo de dos minutos a 95 °C y 40 ciclos que abarca 15 segundos a 95°C, 5 segundos a 72 °C y 20 segundos a 60°C cada ciclo. Se empleó los siguientes cebadores:

**Tabla 5: Cebadores para identificación de *Lactobacillus spp***

Microorganismo	Cebadores	Fuente
<i>Lactobacillus spp</i>	5' AGCAGTAGGGAATCTTCCA	3'
	5' CACCGCTACACATGGAG	3'

### **c.3. Identificación de bacterias mesófilas bacilos gram (-) y coco gram (+)**

Para la identificación de sobrevivientes, se realizó el aislamiento y la identificación bioquímica de las bacterias mesófilas de las bebidas sobrantes de la determinación de la estabilidad microbiológica según ICMSF (2005). Solo fueron sometidas a este proceso aquellas bebidas que presentaron rasgos visibles de deterioro (hinchamiento, turbidez, floculación, coloración).

- **Aislamiento de bacterias mesófilas**

Se pesaron 10mL de muestra y se diluyeron en 90 mL de solución peptonada. Se realizaron diluciones hasta  $10^{-4}$ . Se sembró en agar Baird Parker, VRBA, MYP y acetobacter, y se cultivó a 37°C por 2 días. Las colonias fueron agrupadas según su morfología y color que manifestaron durante su crecimiento. Aquellas colonias distintivas fueron sembradas por estriás en agar nutritivo a 37°C por 24 horas. Cada placa fue identificada por un código. Se realizó una prueba de tinción gram para identificar su forma y tipo. Se decidió identificar aquellas bacterias bacilos gram (-) y cocos gram (+).

- **Identificación bioquímica**

Las colonias fueron cultivadas en agar nutritivo a 37°C por 24 horas. Se cogió con un hisopo estéril un poco de colonia y se diluyó en un tubo con solución salina hasta alcanzar una turbidez de 2 McFarland. Posteriormente, se empleó el RapID one y RapID Sthap plus para identificar las bacterias bacilos gram (-) y cocos gram (+), respectivamente.

### **c.4. Identificación de microorganismos termófilos**

Para la identificación de sobrevivientes, se realizó el aislamiento y la identificación bioquímica de los termófilos de las bebidas sobrantes de la determinación de la estabilidad microbiológica según ICMSF (2005) y, Pit y Hocking (1987). Solo fueron sometidas a este proceso aquellas bebidas que presentaron rasgos visibles de deterioro (hinchamiento, turbidez, floculación, coloración).

- **Aislamiento e identificación de microorganismos termófilos**

Se pesaron 10 mL de muestra y se diluyeron en 90 mL de solución peptonada. Se sembró en agar BAT y thermoaciduran, y se cultivó a 55 °C por 3 días. Las colonias fueron agrupadas

según su morfología y color que manifestaron durante su crecimiento. Aquellas colonias distintivas fueron sembradas por estrías en agar nutritivo a 37 °C por 24 horas. Cada placa fue identificada por un código. Se realizó una prueba de tinción gram para identificar si era bacilos gram (+).

Para identificar a los mohos termófilos, se tomaron 100 mL de muestra. Esta fue sometida a baño maría a 80 °C por 30 minutos. Se distribuyeron los 100 mL de muestra en 8 placas Petri; se le incorporó 12,5 mL de agar Malt Extract para 4 placas y 12,5 mL de agar Czapec Dox para 4 placas. Dos de cada grupo fueron cultivadas a 25 °C y las otras dos a 30 °C, ambas por dos semanas. Se identificó por el color del micelio y las hifas.

### **3.4.2. Método Fisicoquímico**

#### **a. Determinación del pH y los grados Brix de las tres bebidas**

Se determinó el pH según la ISO 1842:1991 y los grado brix según la ISO 2173:2003. Ambos según la Norma Técnica Peruana 203.110. de INDECOPI (2009).

### **3.4.3. Método sensorial**

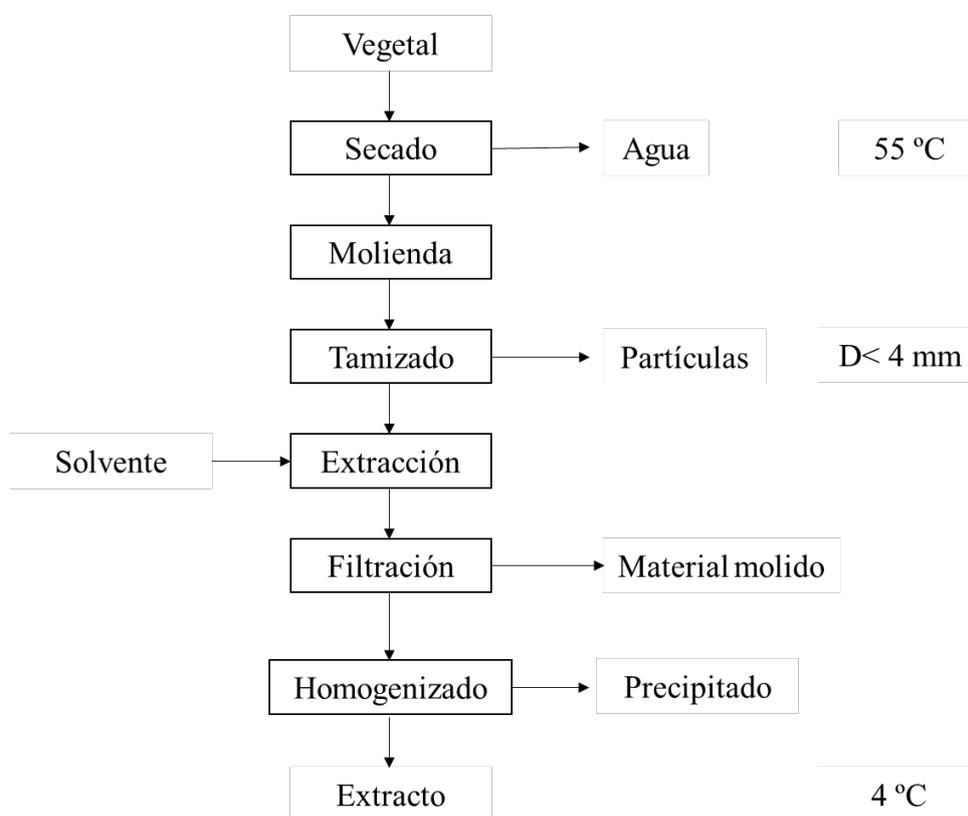
#### **a. Aceptabilidad de tres bebidas con pulpa de fruta y extracto antimicrobiano**

Se utilizó la metodología recomendada por Giovanni y Pangborn (1983). Se midió la aceptabilidad a través del grado de satisfacción; se empleó una escala o regla no estructurada de 10 cm con extremo (0 y 10) en la cual el 0 representa “Me desagrada mucho” y el 10, “Me agrada mucho”. Se convocó aleatoriamente a 50 consumidores de los alrededores de la Universidad Nacional Agraria La Molina, cuyas edades fueron de 18 a 30 años. Cada prueba se realizó por triplicado. Se muestra la ficha de evaluación sensorial en el Anexo 1.

### 3.5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### 3.5.1. Obtención del extracto

Se usó la vaina de tara, la semilla de ayrampo y las hojas de moringa para obtener un extracto. La Figura 7 muestra el flujo de proceso para obtener estos tres extractos



**Figura 7: Flujo de proceso para la obtención de extracto de tara, moringa y ayrampo**

- **Secado**: se deshidrató los vegetales a 60 °C por 04 horas en una estufa.
- **Molienda**: se molieron los vegetales para facilitar la extracción de metabolitos.
- **Tamizado**: se tamizó el material molido con una malla mesh N°5 para separar partículas grandes y uniformizar la muestra.
- **Extracción**: se siguió el siguiente método:

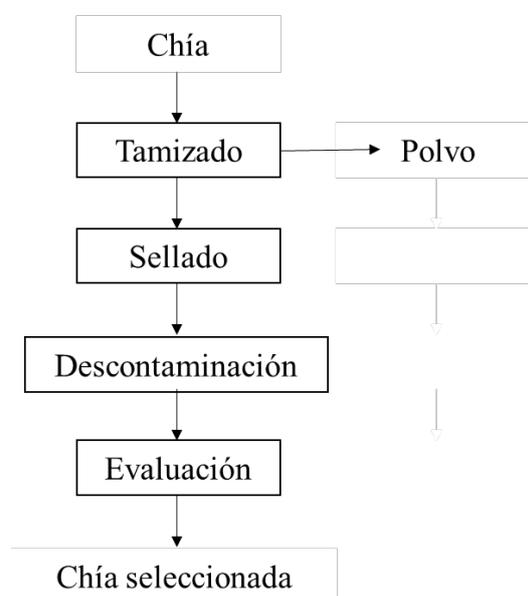
**Solventes estudiados**: se empleó agua destilada y etanol al 96°C.

- **Extracto acuoso**: 1g Material molido: 10mL<sub>agua</sub>. La solución se sometió a baño maría a 80°C por una hora. Se usó para la tara.

- Extracto etanólico: 1g Material molido: 10mL<sub>etanol</sub>. La solución se cubrió con papel aluminio para evitar la degradación de compuestos por la luz y se guardó por cuatro días a 10°C. Se usó para la moringa y el ayrampo.
- **Filtración:** se filtró la solución con un papel whatman N°4 para separar la fase sólida de la líquida.
- **Homogeneización:** la solución fue homogenizada a 4000 rpm por 10 minutos. Se descartó el precipitado y se guardó el sobrenadante a 4° C. Aparte, se determinó la concentración inicial de cada extracto por medio de la estimación de sólidos totales: se colocó 10 mL de extracto en una placa Petri de peso conocido, se la dejó a 60° C por cuatro horas y se volvió a pesar. La diferencia de peso permitió determinar la concentración.

### 3.5.2. Descontaminación de la semilla de chía

Se usó la irradiación y el ozono para descontaminar la semilla de chía. Se siguió los lineamientos de El-Desouky *et al.* (2012). En la Figura 8, se puede apreciar el flujo de proceso.



**Figura 8: Flujo del proceso de la descontaminación de la semilla de chía**

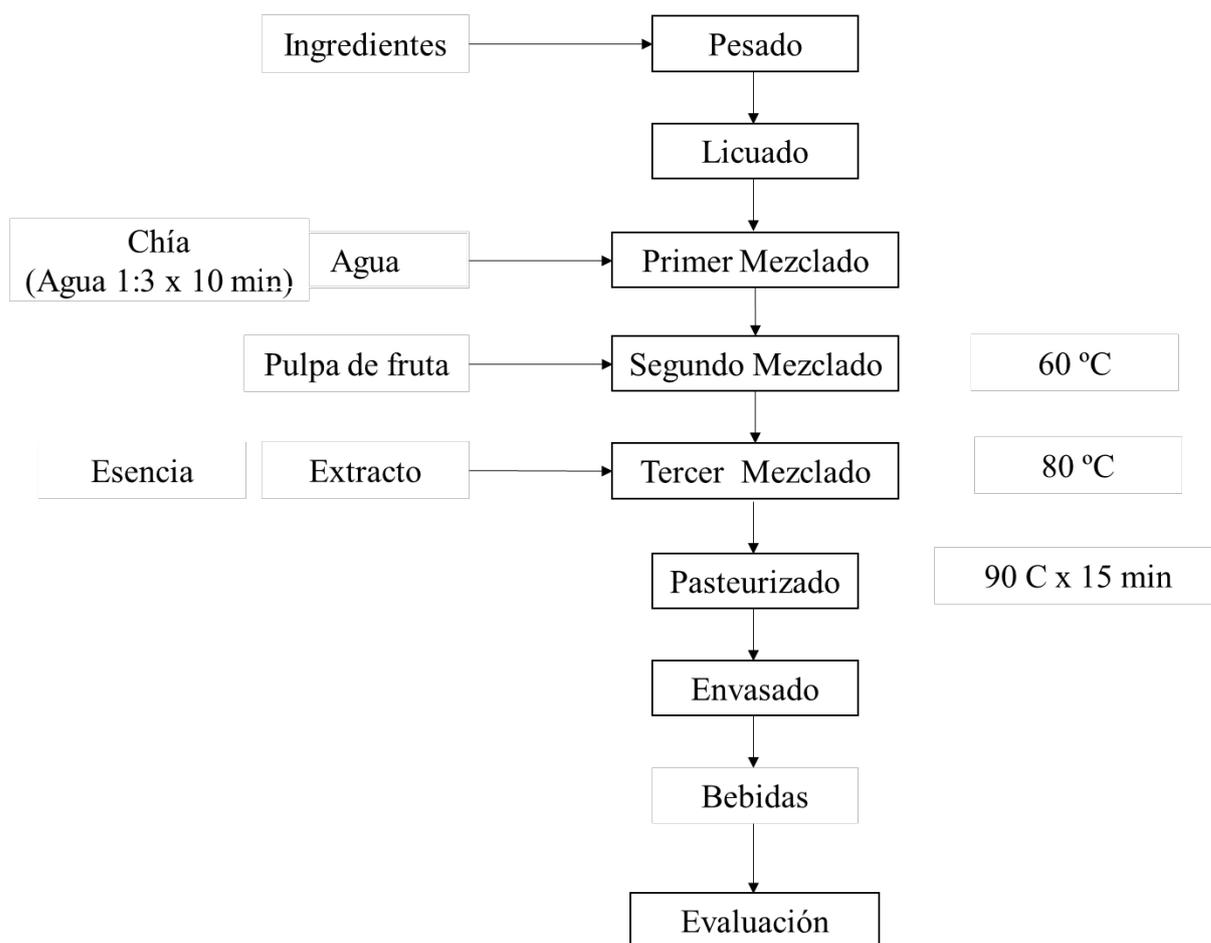
**Fuente:** El-Desouky *et al.* (2012).

- **Tamizado:** se zarandeó la semilla de chía con un tamiz Mesh N°2 y N°20 para eliminar el polvo y las partículas.

- **Sellado:** se pesaron 400 g de chía y se le selló en una bolsa de polietileno de alta densidad.
- **Descontaminación:** esta consistió en:
  - Irradiación: se irradiaron las bolsas de chía en un Irradiador Gamma circular (Gammacell 220, C-198) en el Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN) con una fuente de cobalto 60 a una tasa de dosis de 1,7 KGy/h (IPEN, 2019). Se sometió a la semilla de chía a una dosis de 4, 7 y 10 kGy.
  - Ozonización: se colocó la chía en una cámara de vidrio (0,5350 x 0,8350 x 0,52 m, largo x altura x ancho). El ozono fue generado por un generador de ozono a escala piloto, con un flujo de 500 mg/h. Las semillas de chía fueron expuestas al ozono por un tiempo de 20 minutos a tres concentraciones de 30, 60 y 100 mg/Kg.
- **Evaluación:** se evaluó la carga microbiana de la semilla tratada por medio de pruebas de recuento microbiano:
  - Recuento de esporulados.
  - Recuento de bacterias lácticas.
  - Recuento de mesófilos aerobios.
  - Recuento de mohos y levaduras.

### 3.5.3. Elaboración de las bebidas de pulpa de fruta con extractos y semilla de chia

Se elaboraron tres bebidas diferentes con dos formulaciones distintas de extracto: dos bebidas con pulpa de fresa y chia; dos bebidas con pulpa de arándano y chia, y dos bebidas con pulpa de maracuyá y chia, en total se obtuvo seis tratamientos de 0.5 y 0.7 por ciento de extracto. En la Figura 9, se observa el flujo del proceso general. Se detalla la formulación usada para cada pulpa de fruta en el Anexo 2; se usó una concentración de 16 mg/mL de extracto de ayrampo. Asimismo, el proceso de elaboración se basó en las instrucciones de la empresa New Market Latin American.



**Figura 9:** Flujo de proceso de elaboración de las bebidas de pulpa de fruta y con extractos y semilla de chia

**Fuente:** New Market Latin American (2016).

- **Pesado:** Usando una balanza se pesaron la chia descontaminada, la pulpa de fruta pasteurizada (fresa, arándano y maracuyá), estevia, ácido cítrico, Carboximetilcelulosa (CMC), goma xantana.

- **Licuada:** se realizó un licuado de la goma xantana, CMC, estevia y ácido cítrico con agua tratada en una relación 1:2 (p/v), esto para realizar una homogeneización de los insumos.
- **Primer Mezclado:** se adicionó chía hidratada (1:3 p/v x 10 minutos), el licuado y agua. Una vez pesados todos los insumos, se realizó la dilución con agua y mezclado todos los insumos de acuerdo a la formulación de la bebida.
- **Segundo Mezclado:** cuando se llegó a los 60 °C, se adiciona la pulpa de fruta (fresa, arándano y maracuyá en cantidades de acuerdo a la formulación del Anexo 2).
- **Tercer Mezclado:** cuando se llegó a los 80 °C, se adiciona dos dosis de extracto de ayrampo a una concentración de 16mg/mL para cada formulación (Anexo 2). Aparte, se adicionó el colorante Montecarmin 11325 y la esencia de Fresa 04382 al mezclado cuando se preparó la bebida de pulpa de fresa con chía. Por otro lado, se añadió la esencia de Blueberry 28720 al mezclado cuando se preparó la bebida de pulpa de arándano con chía. Las esencias y el colorante presentan su registro sanitario y formulación en su respectivo empaque.
- **Pasteurización:** se realizó a 90 °C por 15 minutos con esta etapa se asegura la inocuidad de la bebida (Rajauria y Tiwari 2018).
- **Envasado:** se realizó en envases de vidrio de 320 ml, a una temperatura no menor de 80 °C y evitando la formación de espuma. Posteriormente, las bebidas se almacenaron en un lugar limpio y seco a 20 °C.
- **Evaluación:** se evaluó la aceptabilidad y la estabilidad microbiológica de las tres bebidas.

### 3.5.4. Diseño Experimental

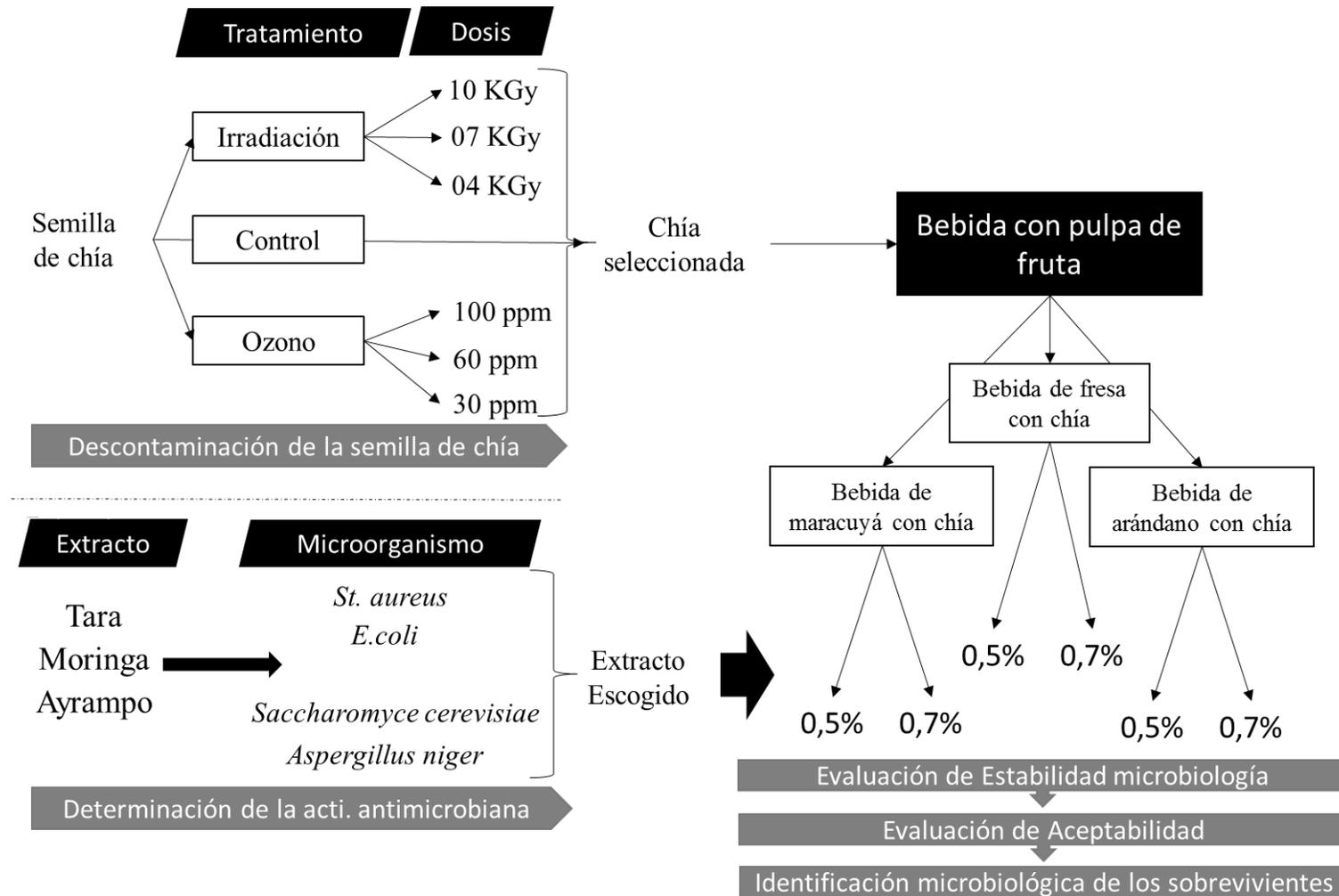


Figura 10: Diseño experimental

### **3.5.5. Análisis estadístico**

Se utilizó un diseño factorial con dos factores respecto al tratamiento de bebidas con extractos antimicrobianos. Se hizo un análisis de varianza y la prueba de Tukey HSD a un nivel de confianza del 95 por ciento para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos. Se utilizó el programa Statgraphics VX Centurión XV.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. DESCONTAMINACIÓN DE LAS SEMILLA DE CHIA

#### 4.1.1. Efecto de la irradiación

En la Tabla 6, se muestra el efecto de la irradiación en la población microbiana de la semilla de chí. Los resultados señalan que las dosis de 4, 7 y 10 KGy eliminan a los tres grupos de microorganismos. La evidencia estadística fue significativa entre los tres tratamientos de irradiación comparando con el control y no significativas entre ellos, es decir, se puede emplear cualquier de las tres dosis y se obtendrá una reducción similar de la población microbiana inicial.

**Tabla 6: Efecto de la irradiación en la población microbiana de la semilla de chí**

Dosis	Grupo de Microorganismo (UFC/g)		
	Mesófilo	Esporulados	Levadura
Control (0 KGy)	17±0,7 <sup>b</sup>	168±10,6 <sup>b</sup>	3,4 x 10 <sup>4</sup> ±11,4 <sup>b</sup>
4 KGy	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>
7 KGy	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>
10 KGy	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>

<sup>a b</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas.

Respecto a la efectividad; las tres dosis son efectivas contra los tres grupos: Vargas (2010) reportó que una dosis de 3 KGy redujo de  $2,9 \times 10^2$  UFC/g a  $<10$  UFC/g de aerobios mesófilos en espárrago y Vargas *et al.* (2010) indicaron que con una dosis de 4 KGy las cantidades iniciales de  $10^3$  UFC/g de mohos y  $10^2$  UFC/g de levaduras se redujeron a  $<10$  UFC/g en pimienta negra para ambos microorganismos. Gracias a ellos, se corrobora con los resultados obtenidos que los tres grupos son susceptibles a dosis de 4 KGy o mayores. Incluso, se señala que dosis de 1 a 2,3 KGy es suficiente para eliminar la población microbiana mas no las levaduras (Suarez 2001). Se observó que la dosis de 4 KGy es la adecuada para reducir a estos microorganismos a niveles indetectables.

En esta investigación, se empleó diferentes dosis de irradiación en la semilla de chía para observar su efectividad frente a los esporulados puesto que las semillas albergan una gran cantidad de esporas de *Bacillus spp* (ICMSF 2005). Algunas especies pueden sobrevivir a la pasteurización y por ende desarrollarse en una bebida pasteurizada (Chen *et al.* 2006). Asimismo, Rossy *et al.* (2009) y Suarez (2001) reportaron que las esporas de los bacilos esporulados son resistentes a la irradiación y por ello recomiendan usar dosis de 8 KGy o mayores para eliminarlos. En cambio, los resultados obtenidos demostraron que la dosis de 4 KGy fue suficiente. Un factor a tomar en cuenta es el número inicial de esporulados, Suarez (2001) menciona que su efectividad puede disminuir si la carga microbiana es alta: Vargas *et al.* (2010) reportó que los números iniciales de mohos, levaduras y *Clostridium sulfito* (alrededor de  $10^3$  UFC/g) fueron reducidos a  $<10$  UFC/g en pimienta negra a una dosis de 4KGy, pero el número inicial de mesófilo de  $9,8 \times 10^6$  UFC/g se redujo a  $2,6 \times 10^4$  UFC/g con la misma dosis. A pesar de que las bacterias son susceptibles a esta dosis, su reducción no fue muy considerable. Capaz sea este el motivo de la efectividad observada en esporulados ya que su número inicial fue inferior a  $10^3$  UFC/g.

Desde una perspectiva microbiológica, las tres dosis cumplen con el objetivo establecido, reducir la carga microbiana a sus niveles mínimos. Por la tanto, la dosis de 4 KGy es la más indicada puesto que se expone al alimento a una mínima dosis de radiación de la requerida (Suarez 2001; Chitho 2018).

#### **4.1.2. Efecto de la Ozonización**

En la Tabla 7, se demuestra el efecto del ozono en la población microbiana en la chía, los resultados señalan que las tres dosis utilizadas de ozono disminuyeron el número de levaduras y mesófilo, la dosis de 30 mg/Kg no disminuyó el número inicial de esporulados. La evidencia estadística fue significativa entre los tratamientos de ozono y el control, y no significativa entre ellos respecto al número de levaduras y mesófilos aerobios; por lo tanto, se podría emplear cualquier dosis para lograr un resultado similar.

**Tabla 7: Efecto del ozono en la población microbiana de la semilla de chía**

Dosis	Grupo de Microorganismo (UFC/g)		
	Mesófilo	Esporulados	Levadura
Control (0 mg/Kg)	17±0,7 <sup>b</sup>	168±10,6 <sup>b</sup>	3,4 x 10 <sup>4</sup> ±11,4 <sup>b</sup>
30 mg/Kg	<10 <sup>a</sup>	140±7,3 <sup>c</sup>	<10 <sup>a</sup>
60 mg/Kg	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>
100 mg/Kg	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>

<sup>a b</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas.

Oner y Demirc (2016) y Bataller-Venta *et al.* (2010) mencionan que las levaduras y las bacterias mesófilas son susceptibles al ozono a concentraciones de 40 mg/Kg o menores. Los resultados obtenidos coinciden ya que se aprecia una reducción significativa de 17 UFC/g de mesófilo y 3,4 x 10<sup>4</sup> UFC/g de levaduras a <10 UFC/g en semilla de chía para ambos grupos de microorganismos. Ante ello, una dosis de 30 mg/Kg bastaría para completar el objetivo propuesto sino fuera por los esporulados.

Por otro lado, no se observa una reducción significativa de los esporulados en la chía con la dosis de 30 mg/Kg; Novak y Yuhan (2004) redujeron 0,87 log (UFC/g) de esporas de *Clostridium perfringens* en superficie de carne de res con 5 mg/Kg de ozono; y Akdas y Ozdemir (2008) redujeron 1,5 log (UFC/g) de esporas de *Bacillus cereus* en ají rojo con 9 mg/Kg de ozono por 360 minutos; gracias a ellos, se corrobora que las esporas suele ser más resistente y requieren mayores tiempos para lograr una eliminación completa. Se podría añadir que la efectividad del ozono disminuye cuando la humedad relativa suele ser muy baja. A una alta humedad, el ozono interacciona con ella y se manifiesta en su forma acuosa, aumentando su letalidad (Chawla *et al.* 2012). Si se hubiera humedecido ligeramente la chía antes de someterla al tratamiento, capaz se podría haber obtenido mejores resultados.

En la semilla de chía, el interés es la eliminación de los bacilos esporulados, en consecuencia, se selecciona la dosis de 60 mg/Kg ya que una baja concentración de ozono es más económicamente viable (Chawla *et al.* 2012).

Los tratamientos descontaminantes buscan reducir la carga microbiana en la semilla de chía para facilitar la actividad antimicrobiana del extracto en la población microbiana sobreviviente (Ravindran *et al.* 2019). A la luz de los resultados, los tratamientos de ozono e

irradiación han demostrado una gran efectividad para la reducción de la carga microbiana; no obstante, la irradiación es una tecnología más accesible y estandarizada en Perú que el ozono. Por lo tanto, la irradiación a una dosis de 4GKy como método de desinfección sería la opción más viable y adecuada (Suarez 2001).

## 4.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

### 4.2.1. Actividad antimicrobiana de tres extractos

En la Figura 11, se muestra la actividad antimicrobiana de tres extractos sobre *E.coli* y *St. aureus*, se observó seis halos de inhibición de los tres extractos en estas dos bacterias. Solo los extractos cuyos diámetros de halo fueron superiores a 8 mm, fueron considerados aceptables. Los resultados indican que los tres extractos presentan actividad antibacteriana frente a estas dos bacterias.

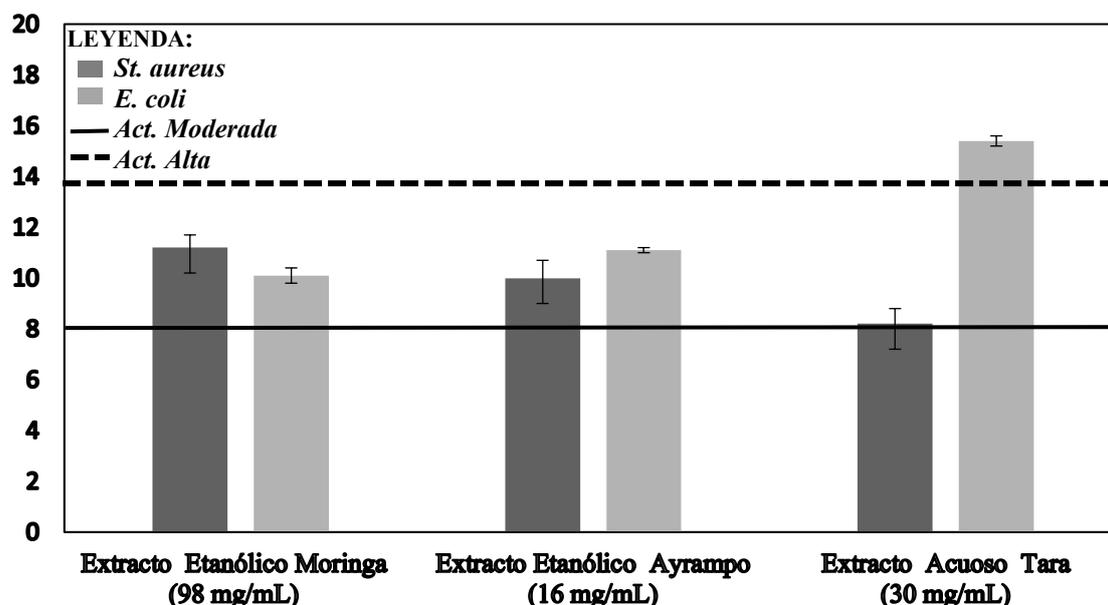


Figura 11: Actividad antibacteriana de extracto de moringa, ayrampo y tara sobre *E. coli* y *St. aureus*

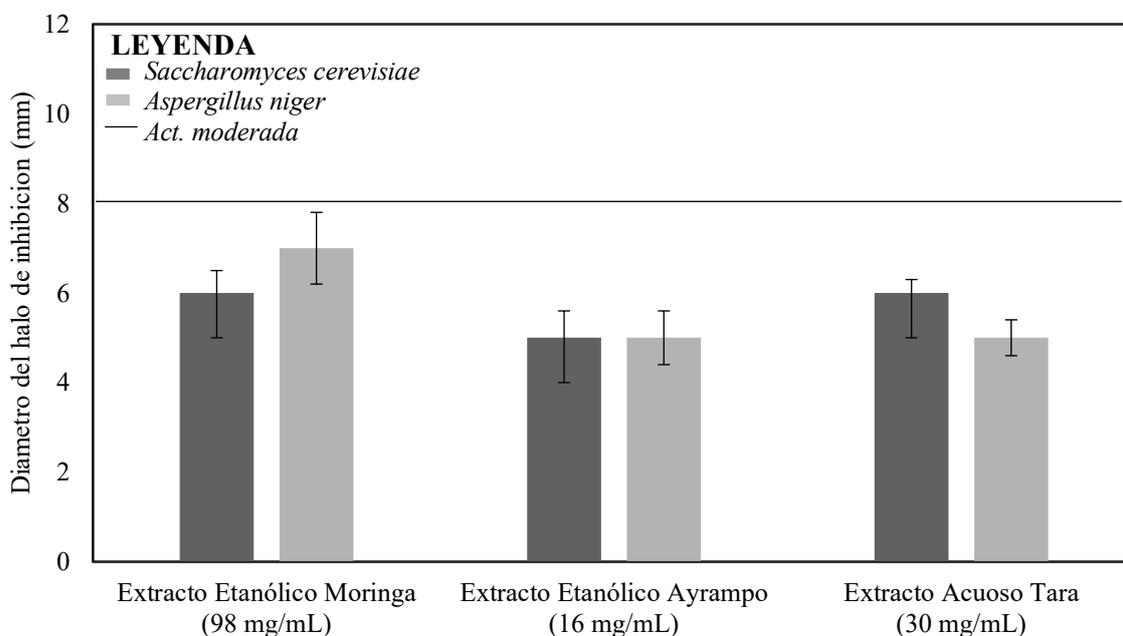
Mothana y Lindequist (2005) señalaron que la actividad antimicrobiana de los extractos se evalúa de acuerdo al diámetro del halo, por lo que cinco de ellos su actividad es moderada al superar los 8 mm de diámetro; mientras que la actividad de la tara en *St. aureus* es alta por superar los 14 mm de diámetro.

En general, los diámetros de los halos de inhibición obtenidos se hallan entre 9 a 11 mm para *E.coli* y de 10 a 15 mm para *St. aureus*. Estos valores obtenidos están dentro de esos rangos

de la literatura: el extracto de tara ocasiona halos de inhibición de 10 a 28 mm de diámetro en *St. aureus* y *E.coli* (Guevara *et al.* 2014; Zarate 2015); mientras que los halos del extracto de moringa se sitúan entre 10 a 12 mm para ambas bacterias (Yetunde y Comfort 2015), por último, Soto (2014) reportó halos de diámetros de 13 a 26 mm con el extracto de ayrampo. En suma, se afirma que los tres extractos poseen actividad antimicrobiana.

Adicionalmente, los tamaños de los diámetros demuestran una buena actividad antimicrobiana (Mothana y Lindequist 2005). Esto resulta bueno ya que se planea usar estos extractos como conservantes en la formulación de las tres bebidas con la chia. Una de las preocupaciones es la proliferación de mesofilos aerobios (ICMSF 2005). El extracto escogido debe controlar a los *Staphylococcus spp*, coliformes y bacilos esporulados puesto que están presente en los ambientes de trabajo, por lo tanto, su contaminación con las bebidas es muy probable (Kaczmarek *et al.* 2019). Los resultados obtenidos demuestran que los tres extractos pueden inhibir a estos dos primeros grupos y por lo tanto retardar su desarrollo. Esto repercutirán en el tiempo de almacenamiento de la bebida (Pandey y Negi 2018)

En la Figura 12, se muestra la actividad antifúngica del extracto de los tres extractos en *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus niger*. Se observó halos de inhibición de 6 mm de diámetro, como no superan los 8mm de diámetro, la actividad antimicrobiana es nula.

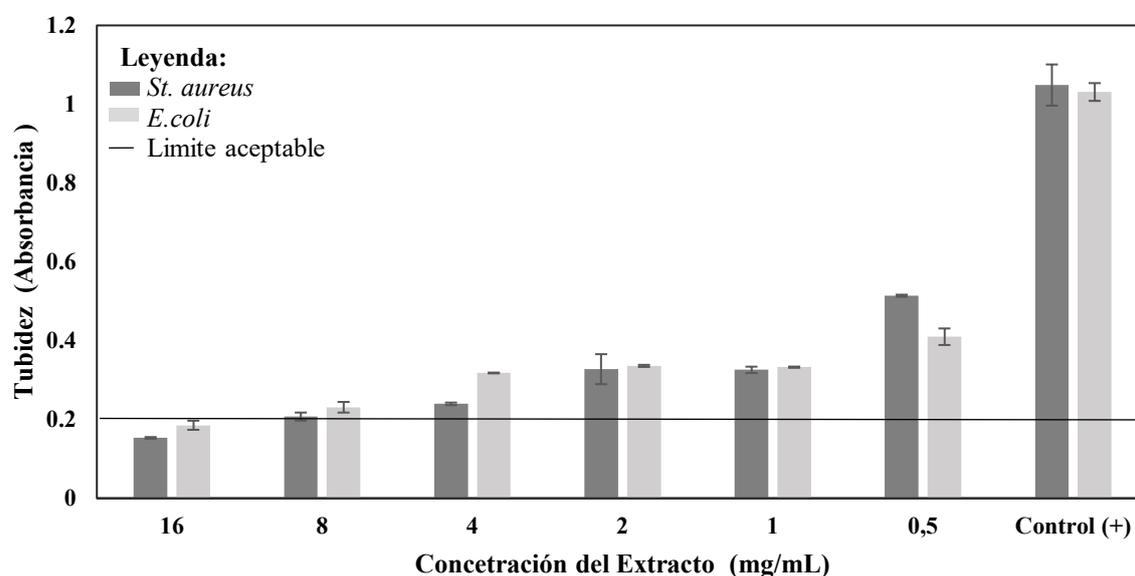


**Figura 12:** Actividad antifúngica del extracto de moringa, ayrampo y tara sobre *Saccharomyces cerevisia* y *Aspergillus niger*

Lamentablemente, los resultados obtenidos corroboran que las levaduras y mohos ofrecen una mayor resistencia a los extractos al observar que ninguno de los tres inhibió a estos dos hongos. Si bien el extracto de tara inhibe a estos dos, López *et al.* (1998) mencionaron que la efectividad del extracto de tara varía de acuerdo a la zona de cultivo y la altitud para *Saccharomyces spp* y *Aspegirllus spp*; la tara cultivada en zonas bajas era menos efectiva. Esto explicaría los resultados ya que la tara usada se cultivó en las zonas bajas de la costa. Hubiera sido prometedor que los otros dos extractos tuviesen actividad antifúngica contra las levaduras porque son consideradas una de las principales amenazas a este experimento (ICMSF 2005). Esto implica tener más cuidado en otros aspectos de inocuidad para disminuir su aparición en la bebida y así asegurar un tiempo de almacenamiento largo.

#### 4.2.2. Concentración mínima inhibitoria de los extractos

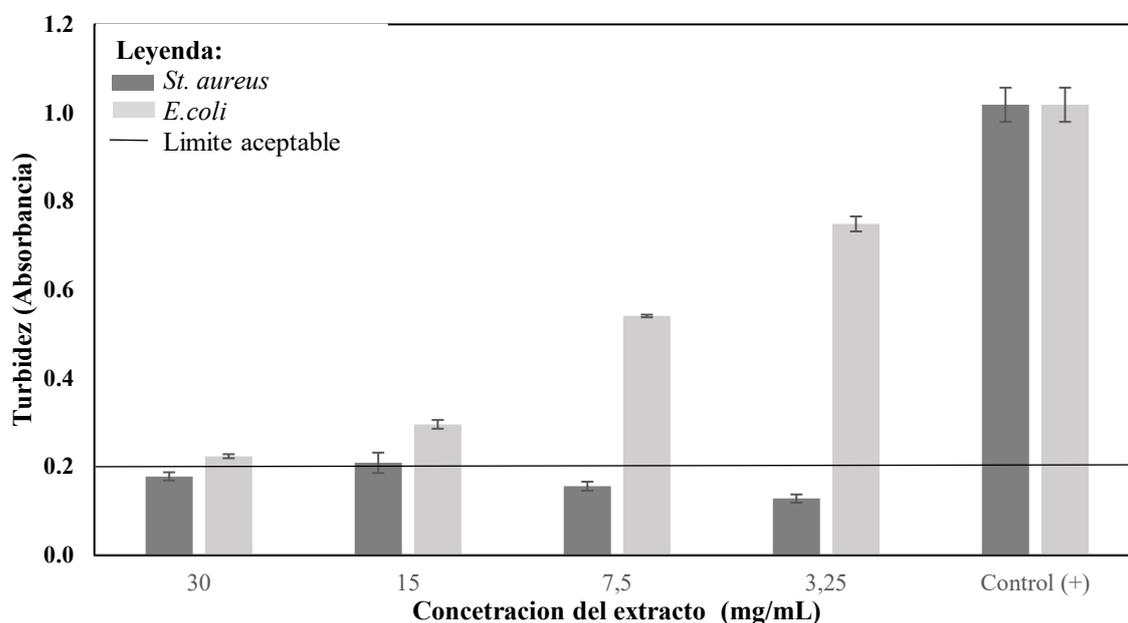
En la Figura 13, se muestra la concentración mínima inhibitoria del extracto de ayrampo. Se observa una relación inversamente proporcional entre la concentración y la turbidez. CLSI (2003) mencionó que la concentración mínima debe ser aquellas que disminuyan en 80 por ciento la turbidez comparando frente a un control positivo. De acuerdo a ello, la concentración mínima fue 8 y 16 mg/mL para *St. aureus* y *E.coli*, respectivamente.



**Figura 13: Concentración mínima inhibitoria del extracto de ayrampo a 24 horas**

Los resultados obtenidos están dentro del rango de 18 a 02 mg/mL que reportaron Christina *et al.* (2019) para inhibir a la *E.coli* y *St. aureus*. Aparte, se obtuvo un resultado similar 25 mg/mL de extracto de pulpa de ayrampo en actividad antimicrobiana (Soto 2014); señalando que la semilla de ayrampo concentra en mayor proporción el principio activo que la pulpa.

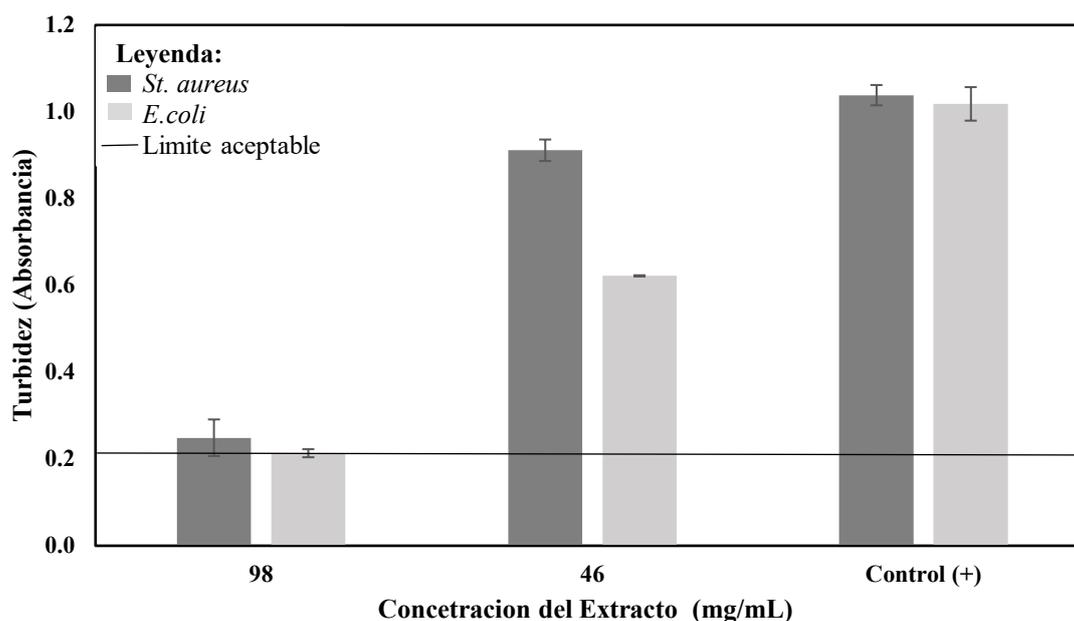
En la Figura 14, se muestra la concentración mínima inhibitoria del extracto de tara, se observa una relación inversamente proporcional entre la turbidez de *E. coli* y la concentración. La concentración mínima fue 3,25 y 30 mg/mL para *St. aureus* y *E. coli*, respectivamente.



**Figura 14: Concentración mínima inhibitoria del extracto de tara a 24 horas**

El rango de inhibición hallada (30 a 3,25mg/mL) se sitúa dentro del rango (16 a 0,16mg/mL) de Añanca (2009) para *St. aureus*. La concentración mínima obtenida es buena ya que es una concentración baja y adecuada para usarlo como conservante. Por el contrario, se requiere mayores dosis para inhibir a *E. coli* que si bien concuerdan con López *et al.* (1998) y Zárate (2015), podría ser un problema pues la tara se le reconoce por su astringencia, dosis moderadas puede ser percibida por el paladar y afectar negativamente el producto.

En la Figura 15, se muestra la concentración mínima inhibitoria del extracto de moringa, la concentración inicial del extracto de moringa inhibió a estas bacterias. La concentración mínima inhibitoria fue 98 mg/mL para *St. aureus* y *E. coli*.

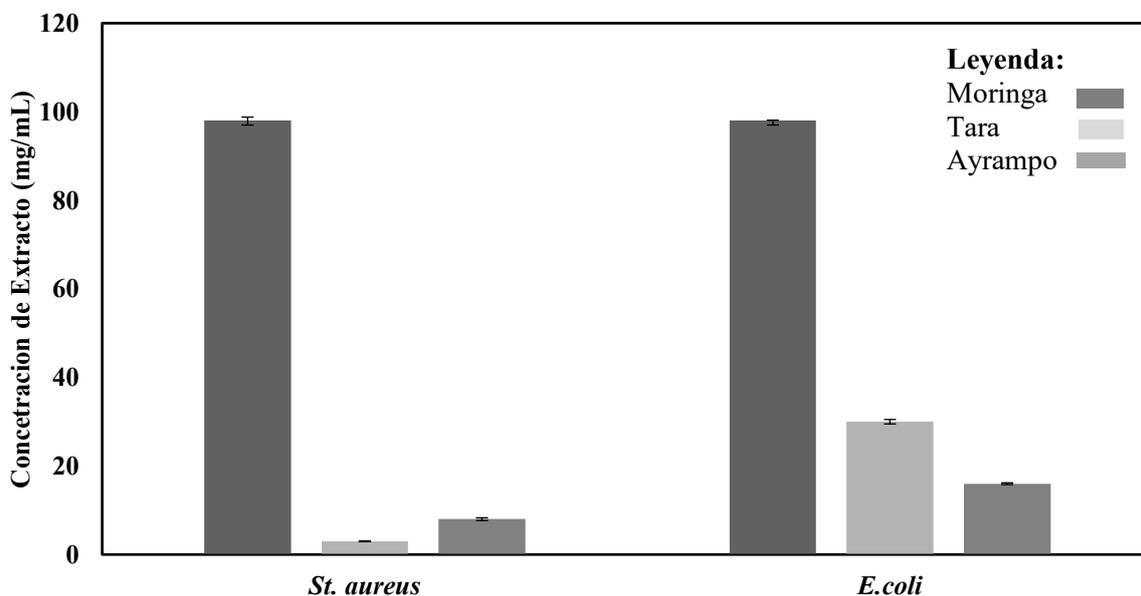


**Figura 15: Concentración mínima inhibitoria del extracto de moringa a 24 horas**

Se requiere una concentración de 98 mg/mL para inhibir a estas bacterias. Esta concentración es alta en comparación de los otros resultados; aún así, coincide con la literatura para estas dos bacterias: Yetunde y Confort (2015) menciona una dosis mínima de 200mg/mL, Peixoto *et al.* (2011) reportan 120mg/disco y Pal *et al.* (1995) señalan una dosis de 55mg/mL. En definitiva, el extracto de moringa inhibe a estas bacterias, lamentablemente, a dosis muy altas dificultando su aplicación como conservante.

Se desprende de las tres Figuras que se requiere concentraciones mayores para inhibir a las bacterias gram negativas comparando a las gram positiva. Respecto a este punto, se menciona que la composición de la pared celular de las gram negativas provee una mayor resistencia frente a la actividad antibacteriana de diversos compuestos (Tribst *et al.* 2009; Guimarães *et al.* 2010). Aparte, se observa que los rangos de inhibiciones obtenidos y citados difieren; estas diferencias se atribuyen a la zona de cultivo, prácticas agronómicas y geografía. Esto implica la necesidad de uniformizar criterios agronómicos de cultivo para obtener una concentración estándar al momento de extraer si se quiere producir en escala (Bedascarrasbure *et al.* 2004; Moulehi *et al.* 2012).

En la Figura 16, se muestran las concentraciones mínimas inhibitorias del extracto de los tres extractos en *St. aureus* y *E.coli*, se observa diferencias entre los tres extractos respecto a la concentración mínima para ambas bacterias. El extracto de tara es el más efectivo para inhibir el *St. aureus*; mientras que el extracto de ayrampo es más efectivo para la *E. coli*.



**Figura 16:** Concentraciones mínimas inhibitorias del extracto de moringa, tara y ayrampo en *St. aureus* y *E. coli*

Un extracto debe ser económico, imperceptible al paladar, efectivo a bajas concentraciones y con un amplio espectro de inhibición (Davidson *et al.* 2013). A base de eso, se descarta el uso del extracto de moringa debido que se requiere concentraciones altas para demostrar su efectividad, esto puede repercutir en el aspecto sensorial y en la presentación de las bebidas (Thielmann *et al.* 2017). Además, el extracto de tara tampoco sería la opción adecuada, a una concentración de 30 mg/mL se puede detectar su astringencia y su efectividad está limitada a *Staphylococcus spp* (López *et al.* 2011). En tal caso, se seleccionó el extracto de ayrampo ya que sus concentraciones son bajas y su adicción solo aumentaría el dulzor en la bebida.

### 4.3. ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA DE LAS BEBIDAS CON EXTRACTO

#### 4.3.1. Obtención de tres bebidas de pulpa de fruta con extracto y chía

En la Figura 17, se muestran las tres bebidas obtenidas de pulpa de frutas con extracto y chía. Asimismo, en la Tabla 8 se presentan los parámetros fisicoquímicos de las tres bebidas. Se observa como las tres bebidas adquieren el color de la pulpa de fruta empleada y la semilla de chía se concentra en la parte superior e inferior de la bebida.



**Figura 17: Bebidas obtenidas de pulpa de fruta con extracto de ayrampo y chía**  
De izquierda a derecha. Bebida de pulpa de arándano, maracuyá y fresa.

**Tabla 8: Parámetros fisicoquímicos de las tres bebidas**

Pulpa de Fruta	Parámetros Fisicoquímicos	
	pH	Grado Brix
Maracuyá	3,9±0,2	16
Fresa	3,8±0,3	10
Arándano	4,0±0,1	12

Guevara-Cruz *et al.* (2012) y Rendon-Villalobos *et al.* (2018) mencionan como el uso de la semilla de chía como ingrediente adicional aumenta el valor nutricional que perciben los consumidores, por ello, se utilizó el CMC y la goma xantana para favorecer la presencia de la semilla de chía en las tres bebidas para generar un efecto positivo en la apreciación del consumidor peruano. Se ha advertido que el uso de los extractos antimicrobianos, a veces, suele afectar la presentación del producto; en este caso, no se observa un efecto notorio en la bebida (Thielman *et al.* 2017).

Respecto a los parámetros fisicoquímicos, DIGESA (2008) exige que el pH máximo sea 4,5 y los grados Brix mínimos sea 12, 10 y 7,5 para maracuyá, arándano y fresa, respectivamente. En este caso, se cumple los requisitos y las variaciones observadas se debe a la época de cosecha y criterios agronómicos (Rajauria y Tawari 2018). Los grados brix son una representación de los azúcares disponibles que son una fuente de alimentos para las levaduras y bacterias lácticas. Mas, esto no representa una preocupación gracias al pH puesto que los

tres pH obtenidos son menores a 4,5 dificultando el crecimiento de bacterias mesófilos, especialmente las coliformes (ICMSF 2005). En definitiva, se afirma que las tres bebidas obtenidas cumplen los requisitos de calidad.

#### 4.3.2. Estabilidad microbiológica de bebidas de pulpa de fruta con extracto de ayrampo y chia

En la Tabla 9, se muestra el recuento de mesófilos aerobios, levaduras y coliformes en bebidas de maracuyá y semilla de chíá con o sin extracto. El número de mesófilo y levadura aumenta conforme al tiempo en la bebida sin extracto antimicrobiano. Por otro lado, el extracto añadido mantiene a niveles indetectables a los mesófilos y levaduras durante el periodo de prueba. Existen evidencias estadísticas significativas entre las bebidas con o sin extracto añadido respecto al número de estos grupos y no significativas respecto a la coliforme. Se afirma que el extracto de ayrampo controla el número de aerobios mesófilos y levaduras.

**Tabla 9: Recuento de mesófilo aerobio, levadura y coliforme en bebidas de maracuyá y semilla de chíá con extracto o sin extracto de ayrampo**

Grupo de Microorganismo	Extracto (%)	Tiempo (Días)		
		0	14	21
Mesófilo aerobio	0.5	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>
	0.0	<10 <sup>a</sup>	64±2,5 <sup>b</sup>	144±5,8 <sup>b</sup>
Levadura	0.5	<1 <sup>a</sup>	<1 <sup>a</sup>	<1 <sup>a</sup>
	0.0	<1 <sup>a</sup>	<1 <sup>a</sup>	14±1,2 <sup>b</sup>
Coliforme	0.5	<3 <sup>a</sup>	<3 <sup>a</sup>	<3 <sup>a</sup>
	0.0	<3 <sup>a</sup>	<3 <sup>a</sup>	<3 <sup>a</sup>

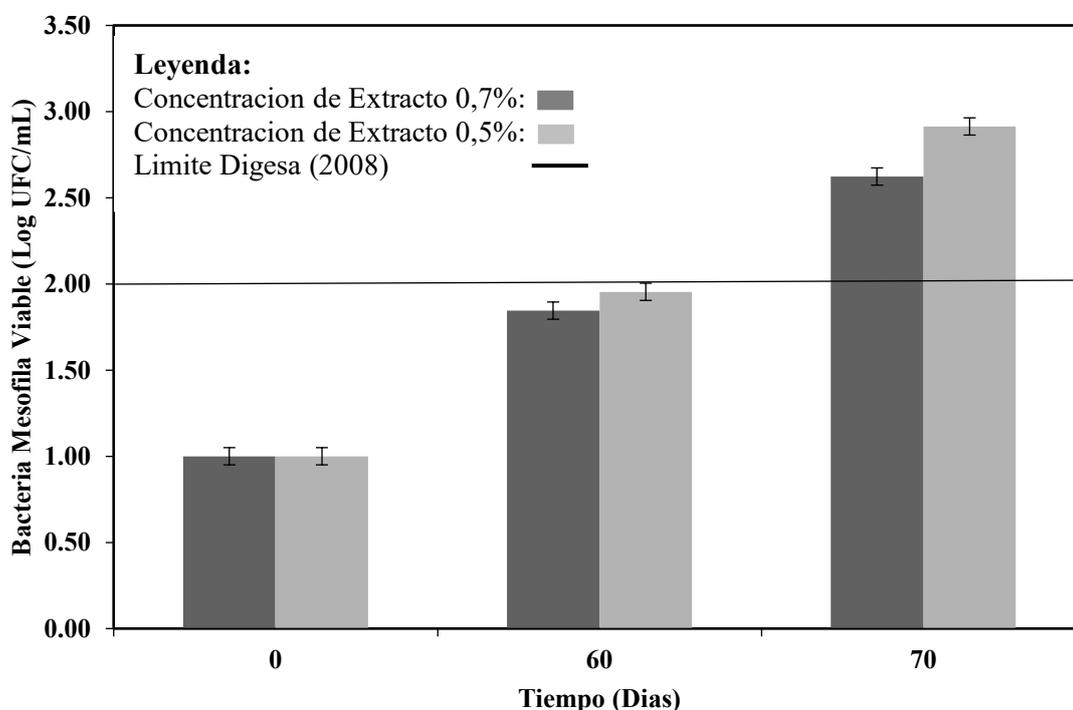
<sup>a b</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas.

Giner *et al.* (2012) controlaron la población microbiana en jugo de tomates por 12 días usando extractos de plantas, mientras que Kanako *et al.* (1998) controlaron la población microbiana en el jugo de manzana por un mes con el empleo del extracto de limón y clavo. Sus resultados demostraron que el uso de extractos antimicrobianos puede ampliar significativamente el tiempo de almacenamiento comparando a una contraparte sin conservante tradicional (Friedman *et al.* 2004). En concordancia con ello, se comprobó que el uso del extracto de ayrampo influye positivamente en el almacenamiento de bebidas con pulpa de fruta y semilla de chíá. Aparte, Pandey y Negi (2018) atribuyen esta capacidad de mantener la estabilidad microbiológica a los compuestos fenólicos presentes en el extracto. Es más Soto (2014) reportó la presencia de compuestos fenólicos en el extracto de ayrampo, al mismo que atribuyó actividad antimicrobiana para *St. aureus*, *E. coli* y *Candida albicans*. Esto ayuda a comprender cómo el extracto usado pudo controlar la población microbiana por 21 días.

El uso de extracto de ayrampo revela potencial como una posible alternativa para reemplazar a los conservantes tradicionales (Bevilacqua *et al.* 2011; Pandey y Negi 2018). Esto se aprecia al comparar la población de levaduras y mesófilo respecto a sus pares sin extracto, asimismo, mantener los niveles microbiológicos exigidos por DIGESA (2008) por 21 días. Hay que tener en cuenta que la composición y propiedades de los mismos ingredientes influyen en la actividad antimicrobiana; en este caso, se ha facilitado la actividad antimicrobiana, puesto que el producto es una bebida con un pH menor a 4,5 (Pandey y Negi 2018; Gyawali *et al.* 2015). En definitiva, el extracto de ayrampo está demostrando resultados prometedores para una mayor evaluación en el tiempo.

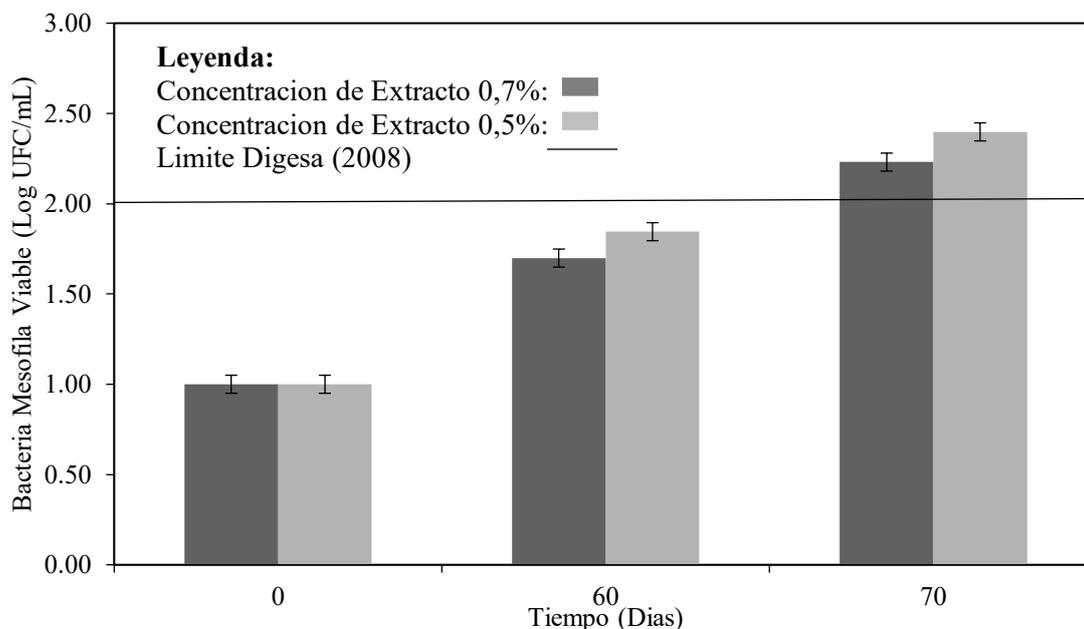
#### 4.3.3. Efecto de la dosis del extracto en la estabilidad microbiológica

En la Figura 18 se muestra el recuento de mesófilo de una bebida de pulpa de maracuyá con chí y extracto. Se observó que las bebidas con pulpa de maracuyá con extracto mantuvieron los niveles microbiológicos exigidos por DIGESA (2008) por 60 días. Se observa un aumento de la población de mesófilos respecto al tiempo de almacenamiento. Existen evidencias estadísticas significativas entre las bebidas con concentraciones distintas de extracto a los 60 y 70 días. El control sin extracto antimicrobiano solo duró 21 días.



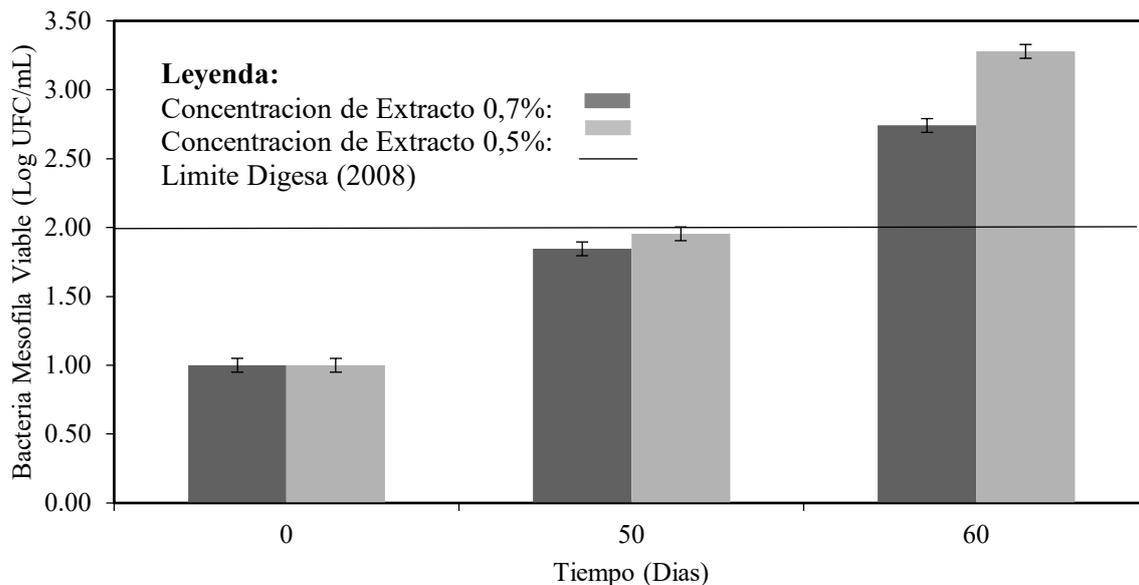
**Figura 18:** Recuento de mesófilos aerobios de una bebida de pulpa de maracuyá con chí y extracto de ayrampo

En la Figura 19 se muestra el recuento de mesófilo de una bebida de pulpa de arándano con chía y extracto. Tal como en el anterior, se observa un aumento de la población de mesófilos respecto al tiempo de almacenamiento. Existen evidencias estadísticas significativas entre las bebidas con concentraciones distintas de extracto a los 60 y a los 70 días. El control sin extracto antimicrobiano solo duró 20 días.



**Figura 19: Recuento de mesófilos aerobios de una bebida de pulpa de arándano con chía y extracto de ayrampo**

De la Figura 20 se muestra el recuento de mesófilo de una bebida de pulpa de fresa con chía y extracto. Se observó que las bebidas de arándano con extracto mantuvieron los niveles por 50 días. Se observa un aumento de la población de mesófilo respecto al tiempo, esto ya se observó anteriormente. Existen evidencias estadísticas significativas entre las bebidas con concentraciones distintas de extracto a los 60 y 70 días. El control duró 21 días.



**Figura 20: Recuento de mesófilos aerobios de una bebida de pulpa de fresa con chíá y extracto de ayrampo**

De la Tabla 10, se muestra el recuento de levaduras y coliformes de tres bebidas de pulpa de fruta con chíá y extracto. No se observó ninguna variación significativa del número de coliformes respecto al tiempo de almacenamiento o por la pulpa. Respecto a levaduras, a los 70 días, los valores de levadura eran inferiores a 10 ufc/mL; por lo tanto, conformes según la norma de DIGESA (2008).

**Tabla 10: Recuento de levadura y coliforme de tres bebidas de pulpa de fruta con chíá y extracto de ayrampo**

Grupo de Microorganismo	Pulpa de Fruta	Extracto	Tiempo (Días)		
			0	60	70
Levadura	Fresa	0,7%	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>
		0,5%	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>
	Arándano	0,7%	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>
		0,5%	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>
	Maracuyá	0,7%	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>
		0,5%	<10 <sup>a</sup>	<10 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>
Coliforme	Fresa	0,7%	<3 <sup>a</sup>	<3 <sup>a</sup>	<3 <sup>a</sup>
		0,5%	<3 <sup>a</sup>	<3 <sup>a</sup>	<3 <sup>a</sup>
	Arándano	0,7%	<3 <sup>a</sup>	<3 <sup>a</sup>	<3 <sup>a</sup>
		0,5%	<3 <sup>a</sup>	<3 <sup>a</sup>	<3 <sup>a</sup>
	Maracuyá	0,7%	<3 <sup>a</sup>	<3 <sup>a</sup>	<3 <sup>a</sup>
		0,5%	<3 <sup>a</sup>	<3 <sup>a</sup>	<3 <sup>a</sup>

<sup>a b</sup> Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas.

Si bien el uso de extractos antimicrobianos aumentó el tiempo de almacenamiento, este tiempo no suele ser muy largo (Rajauria y Tiwari 2018). En este caso, se mantuvo la estabilidad microbiológica por 50 a 60 días; mientras que el control de las tres bebidas duró solo 21 días. Se alcanzó este logro gracias a la combinación de tres factores: chía irradiada, pasteurización y extracto antimicrobiano. Los dos primeros disminuyeron a niveles mínimos la población microbiana; en consecuencia, el extracto de ayrampo pudo controlar a los sobrevivientes con mayor facilidad (Negi 2012). Esta combinación de tratamientos descontaminantes y extractos es una nueva alternativa para reemplazar a los conservantes tradicionales y está dando buenos resultados (Belickaqua *et al.* 2011; Espina *et al.* 2013). Pinaz-Pérez y Martínez-López (2012) lograron una disminución efectiva de la *Cronobacter sakazakii* en leche para infante por 12 horas con la combinación de polvo de cocoa y campos de pulso eléctricos; Ouattara y Mafu (2003) reportaron un aumento en el tiempo de almacenamiento de langostas al emplear la combinación de irradiación a 3KGy y empaque de proteína, aceite esencial de timol 0,9 por ciento y trans-cinnamaldehído 1,8 por ciento; Belickaqua *et al.* (2011) recopilaron como la combinación de preservantes naturales (chitosano, nicina, extracto de limón) y altas presiones hidrostáticas lograron reducir significativamente la población de levaduras y bacterias en jugos de zanahoria, manzana y ciruela. Esto refuerza la idea que el uso del extracto y la irradiación mantuvieron la estabilidad microbiológica en las tres bebidas por un buen periodo de tiempo.

El extracto de ayrampo mantuvo los niveles exigidos por DIGESA (2008) durante un periodo de 60 días para maracuyá y arándano, mientras que la de fresa por 50 días. De acuerdo a eso, la pulpa de fruta usada influye en el desarrollo de los mesófilos e impacta en el tiempo de almacenamiento. Esto concuerda con Negi (2012) y Davidson (2001) quienes advierten que las composiciones de los alimentos influyen en la actividad antimicrobiana de los extractos.

Por último, se aprecia que las bebidas con extracto de 0,7 por ciento tenían un menor número de mesófilos aerobios a comparación de las bebidas con 0,5 por ciento. Es decir, la concentración de extracto influye en la población microbiana, por ende, capaz si se usa concentraciones mayores al 0,7 por ciento se podrían alargar más el tiempo de almacenamiento. Hay que tener en cuenta que el uso de extractos no suele alargar el tiempo de almacenamiento significativamente comparada con su versión tradicional (Negi 2012). Así y todo, se afirma que se logró un resultado satisfactorio; sin embargo, no suficiente para proponer una posible sustitución del sorbato de potasio utilizado en la industria peruana.

#### 4.4. ACEPTABILIDAD DE TRES BEBIDAS CON PULPA DE FRUTA, CHÍA Y EXTRACTO ANTIMICROBIANO

De la Tabla 11, se muestran las calificaciones del grado de aceptabilidad de las tres bebidas con la adición de dos dosis de extracto de ayrampo. Se puede observar que la adición del extracto genera un efecto positivo en la satisfacción que proporcionan las bebidas de arándano, fresa y maracuyá sobre percepción de los consumidores. No se halló evidencias de diferencias significativas en las bebidas con 0.5 y 0.7 por ciento de extracto. En consecuencia, se elaboró un lote de las tres bebidas de 1.6 por ciento de extracto para observar el efecto de un mayor aumento del extracto en la aceptabilidad; se aprecia que esta incorporación genera significativamente un efecto de mayor satisfacción, especialmente en las bebidas de fresa y maracuyá. Se observa que el aumento de porcentaje del extracto afecta favorablemente la aceptabilidad de las dos bebidas.

**Tabla 11: Aceptabilidad de tres bebidas**

Pulpa de Fruta	Puntaje de aceptabilidad	
	Porcentaje de Formulación (%)	
	0,5	1,6
Maracuyá	6,6±1,7 <sup>a</sup>	7,4±1,6 <sup>b</sup>
Fresa	6,2±1,9 <sup>a</sup>	7,3±1,3 <sup>b</sup>
Arándano	7±1,9 <sup>a</sup>	7,3±1,5 <sup>a</sup>

<sup>a b</sup> Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas significativas.

La adición de extractos a un alimento no suele influir significativamente en los parámetros físicoquímicos; no obstante, suele tener una cierta repercusión en la presentación y el aspecto sensorial, en este caso su incorporación ha influenciado positivamente al aumentar la aceptabilidad de la bebida (Thielmann *et al.* 2017). El puntaje obtenido (>6) resulta prometedor para la aceptación del público en general, asimismo, da garantías que por lo menos el sabor es aceptable y pueda ser vendida al público.

Los resultados obtenidos demostraron que un aumento del extracto de ayrampo tiene efecto positivo en el aspecto sensorial. Hay que destacar que se requiere concentraciones altas de extractos antimicrobianos a comparación de un conservante tradicional para lograr resultados aceptables, esto repercute en el aspecto sensorial (Burt 2004). Para evitar eso, se disminuye la concentración del extracto; esto disminuye considerablemente el tiempo de almacenamiento del producto y por consiguiente ya no resulta viable (Negi 2012). En este caso, se percibe una oportunidad puesto que el aumento de las concentraciones usadas afectó positivamente la aceptabilidad del consumidor. Entonces, se puede añadir un poco más de extracto a la bebida

sin preocuparse por el aspecto sensorial. Esto podría aumentar el tiempo de almacenamiento comparando con la bebida de 0,7 por ciento de extracto.

## 4.5. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE SOBREVIENTES

### 4.5.1. Aislamiento y caracterización morfológica de bacterias sobrevivientes

De la Tabla 12, se presenta la forma presuntiva y reacción de coloración gram de acuerdo al medio de cultivo de las bacterias sobrevivientes de la bebida de fresa. Se aislaron bacterias lácticas, termófilas y acéticas en la bebida con pulpa de fresa; las bacterias lácticas son el mayor grupo representativo hallado en esta bebida. No se halló bacterias del género *alicyclobacillus spp ni leuconostoc spp ni Bacillus spp* al no observar crecimiento de colonias en el agar BAT, MSE y MYP, respectivamente. Por último, se halló los mismos microorganismos independientemente de la concentración del extracto.

**Tabla 12: Forma Presuntiva y reacción de coloración gram de acuerdo al medio de cultivo de bacterias sobreviviente de bebidas pasteuriza de pulpa de fresa y extracto antimicrobiano**

Medio	Presunción	Coloración Gram	Morfología	Código Cepa	Incidencia
Agar Acetobacter	Bacteria acética	-	Bacilo	BAC <sub>1</sub>	11,11%
Agar Thermoaciduran	Bacilo termófilo	+	Bacilo	BTE <sub>1</sub>	22,22%
Agar VRBA	Coliforme	-	Bacilo	COL <sub>1</sub> /COL <sub>2</sub>	11,11%
Agar Baird Parker	<i>Staphylococcus spp</i>	+	Coco	STA <sub>1</sub>	11,11%
Agar MRS	Bacteria láctica	+	Bacilo	BLB <sub>1</sub>	22,22%
Agar Lactic	Bacteria láctica	+	Coco	BLC <sub>1</sub>	22,22%

\*Incidencia: representa el número de botellas que se halló al microorganismo sobreviviente del total de botellas (Total: 9 bebidas de fresa de 0.5 y 0.75).

De la Tabla 13, se muestra la forma presuntiva y reacción de coloración gram de acuerdo al medio de cultivo de las bacterias sobrevivientes de la bebida de maracuyá. Se aislaron bacterias lácticas, termófilas y acéticas en la bebida con pulpa de fresa; las bacterias lácticas y termófilas son los mayores grupos representativos hallados en esta bebida y la bebida con pulpa de maracuyá presenta un menor número de bacterias lácticas a comparación de la bebida con pulpa de fresa. No se halló bacterias del género *alicyclobacillus spp ni leuconostoc spp ni Bacillus spp* al no observar crecimiento de colonias en el agar BAT, MSE y MYP, respectivamente. Por último, se halló los mismos microorganismos independientemente de la concentración del extracto.

**Tabla 13: Forma Presuntiva y reacción de coloración gram de acuerdo al medio de cultivo de bacterias sobreviviente de bebidas pasteuriza de pulpa de maracuyá y extracto antimicrobiano**

Medio	Presunción	Coloración Gram	Morfología	Código Cepa	Incidencia
Agar Acetobacter	Bacteria acética	-	Bacilo	BAC <sub>2</sub>	16,67%
Agar thermoaciduran	Bacilo termófilo	+	Bacilo	BTE <sub>2</sub>	33,33%
Agar Baird Parker	<i>Staphylococcus spp</i>	+	Coco	STA <sub>2</sub>	16,67%
Agar MRS	Bacteria láctica	+	Bacilo	BLB <sub>2</sub>	16,67%
Agar Lactic	Bacteria láctica	+	Coco	BLC <sub>2</sub>	16,67%

\*Incidencia: representa el número de botellas que se halló al microorganismo sobreviviente del total de botellas (Total: 11 bebidas de Maracuya de 0.5 y 0.75).

De la Tabla 14, se muestra la forma presuntiva y reacción de coloración gram de acuerdo al medio de cultivo de las bacterias sobrevivientes de la bebida de arándano. Se aislaron bacterias lácticas, termófilas y acéticas en la bebida con pulpa de fresa; las bacterias lácticas, termófilas y acéticas presentan cantidades iguales y la bebida con pulpa de arándano presenta un mayor número de bacterias acéticas a comparación de las demás bebidas. No se halló bacterias del género *alicyclobacillus spp ni leuconostoc spp ni Bacillus spp* al no observar crecimiento de colonias en el agar BAT, MSE y MYP, respectivamente. Por último, se halló los mismos microorganismos independientemente de la concentración del extracto.

**Tabla 14: Forma Presuntiva y reacción de coloración gram de acuerdo al medio de cultivo de bacterias sobreviviente de bebidas pasteuriza de pulpa de arándano y extracto antimicrobiano**

Medio	Presunción	Coloración Gram	Morfología	Código Cepa	Presencia
Agar Acetobacter	Bacteria acética	-	Bacilo	BAC <sub>3</sub>	28,57%
Agar Thermoaciduran	Bacilo termófilo	+	Bacilo	BTE <sub>3</sub>	28,57%
Agar Baird Parker	<i>Staphylococcus spp</i>	+	Coco	STA <sub>3</sub>	14,29%
Agar MRS	Bacteria láctica	+	Bacilo	BLB <sub>3</sub>	14,29%
Agar Lactic	Bacteria láctica	+	Coco	BLC <sub>3</sub>	14,29%

\*Presencia: representa el número de botellas que se halló al microorganismo sobreviviente del total de botellas (Total: 10 bebidas de Maracuyá de 0.5 y 0.75).

Los resultados obtenidos son conformes con lo expuesto por la ICMSF (2005); se menciona que las bacterias termófilas, acéticas y lácticas son las responsables del deterioro de diversas bebidas pasteurizadas. Las primeras se hallan en los ambientes de instalaciones; las segundas se hallan en los instrumentos metálicos empleados y equipos de elaboración de jugos y las últimas provienen de las pulpas de maracuyá, arándano y fresa (Kaczmarek *et al.* 2019).

Respecto a las termófilas, representa un peligro por su capacidad de sobrevivir a la pasteurización y poder desarrollarse a pH bajos de los jugos y néctares (Walker y Phillips 2009). Si bien se detectaron estos esporulados termófilos en la semilla de chía; se empleó la irradiación como tratamiento descontaminante para eliminarlos. Aun así, es posible que algunas hayan sobrevivido por su resistencia a la irradiación o la bebida se haya contaminado al estar en contacto con el ambiente durante el llenado de bebidas (Suarez 2001). Los resultados obtenidos demuestran que se aislaron bacilos termófilos en las tres bebidas (Cepa BTE), mas no del *alicyclobacillus acidoterrestris* al no observar crecimiento en el agar BAT. Se presume que las tres cepas BTE aisladas son *Bacillus coagulans* al ser uno de los pocos bacilos termófilos capaz de crecer en condiciones de pH ácidos, altas temperaturas y presente en jugos de frutas (Kaczmarek *et al.* 2019).

Por otra parte, se halló bacterias acéticas y lácticas en las tres bebidas. Ambos grupos pueden desarrollarse a los pH bajos de los jugos y néctares; no obstante, son sensibles a la pasteurización (Aneja *et al.* 2014; Worobo y Splittstoesser 2005). La presencia de bacterias acéticas (Cepa BAC) señala una posible contaminación durante el llenado por el empleo de algún instrumento metálico, mientras que las bacterias lácticas (Cepa BLB y BLC) pueden implicar que la pasteurización no fue uniforme por el mucílago de la chía que engloba a toda la bebida (Tribst *et al.* 2009; Xingú *et al.* 2017)

A la luz de los resultados, es necesario evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de ayrampo en bacterias acéticas y termófilas ya que estos dos grupos representan el mayor peligro para estas bebidas. Uno de los problemas para usar extractos antimicrobianos como conservante es que su espectro de inhibición mayormente suele ser pequeño (Davidson 2001).

#### **4.5.2. Identificación Bioquímica de Bacterias**

De la Tabla 15, se muestra la identificación bioquímica de microorganismos gram negativo y oxidasa negativa; se identificó a *Shigella spp*, *Acinetobacter calcoaceticus* y *Enterobacter clocae*.

**Tabla 15: Identificación Bioquímica de Microorganismos Gram (-) y oxidasa (-)**

Reactivo	Cepa COL <sub>1</sub>	Cepa BAC	Cepa COL <sub>2</sub>
Sorbitol	+	-	+
Ornitina	-	-	+
Malonato	-	-	+
β, D-Xilosido	-	-	+
β, D-Glucosido	-	-	-
β, D-Galactosido	-	-	+
β, D-Glucuronida	-	-	-
Aldehído de azúcar	-	-	+
Ester de ácido graso	-	+	-
Prolina-β-naftilamida	-	-	-
γ-Glutamil-β-naftilamida	-	-	+
N-acetil-β,D-Glucosaminida	-	-	+
	<i>Shigella.</i> <i>spp</i>	<i>Acinetobacter</i> <i>calcoaceticus</i>	<i>Enterobacter.</i> <i>cloacae</i>

Se identificó a la cepa BAC de las tres bebidas como *Acinetobacter calcoaceticus*, una bacteria acética que destaca por su resistencia a los antibióticos (Howard *et al.* 2012). Por ello, esta bacteria pudo resistir la actividad antimicrobiana del extracto de ayrampo y desarrollarse en las tres bebidas sin ningún problema. Ya se mencionó que su presencia se le atribuye por una contaminación con algún instrumento metálico durante el llenado de bebidas (ICMSF 2005). Aparte, se identificó a la cepa COL<sub>1</sub> y COL<sub>2</sub> como *Enterobacter cloacae* y *Shigella spp*, respectivamente. Kaczmarek *et al.* (2019) reportaron que la presencia de coliformes en bebidas no puede eliminarse del todo ya que se hallan en los suelos de las instalaciones. Sin embargo, siempre que se realice una adecuada pasteurización y el pH de la bebida sea menor a 4,5 no representan un problema (ICMSF 2005). Esto se corrobora con los resultados de la Tabla 8 y 9 pues su número no sobrepasó los 3 UFC/mL durante todo el experimento (DIGESA 2008).

De la Tabla 16, se muestra la identificación bioquímica de microorganismos cocos gram positivo y catalasa positiva que crecieron en agar Baird Parker; se identificó a esta bacteria como *Micrococcus spp*.

**Tabla 16: Identificación Bioquímica de Microorganismos Gram (+) y Catalasa (+)**

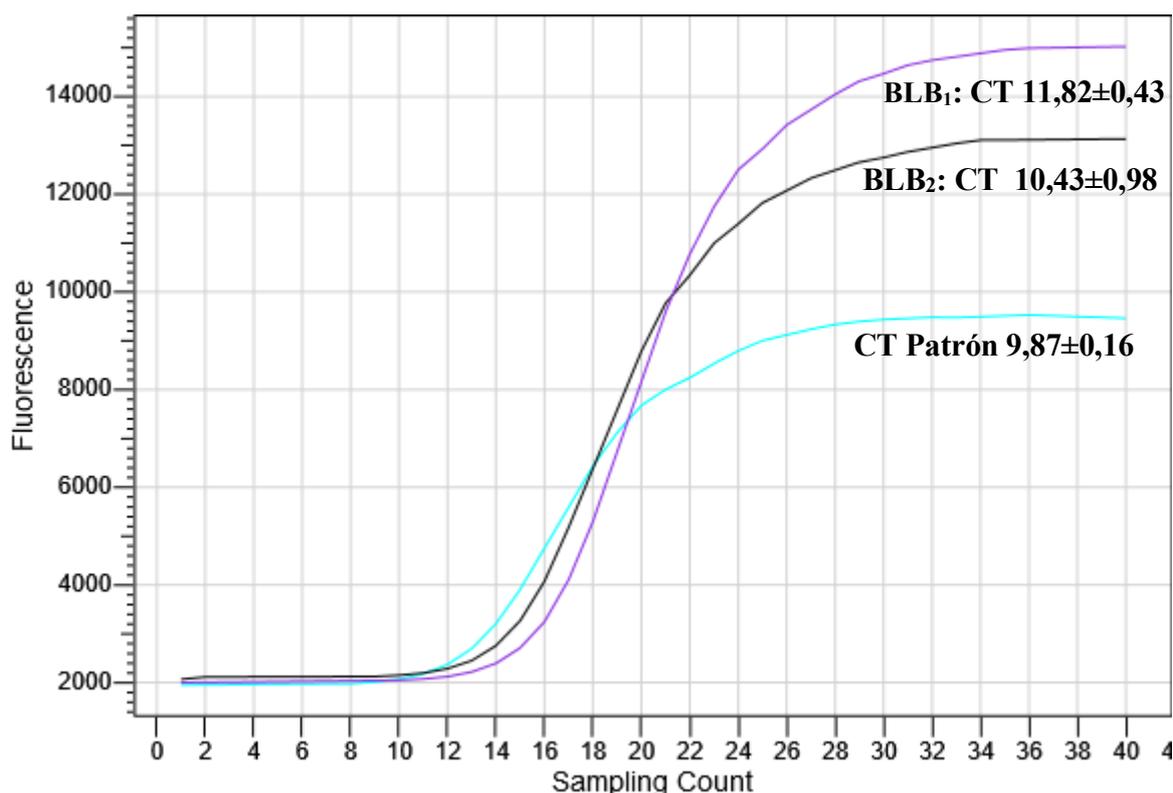
REACTIVO	CEPA STA
Urea	+
Fosfato	-
Alanina	+
Leucina	+
Arginina	+
Sacarosa	-
Pirrolidina	+
Leucil-glicina	+
$\beta$ , D-Glucósido	-
Nitrato de potasio	+
N-acetil- $\beta$ ,D-Glucosaminida	+

*Micrococcus spp*

Según las pruebas bioquímicas, la cepa STA pertenece al género *Micrococcus spp*. Existen dos posibilidades: *Micrococcus lylae* y *Micrococcus luteus* ya que las otras especies de *Micrococcus* se hallan en zonas remotas e inhóspitas. Por el contrario, estas dos especies se hallan en la piel de los mamíferos y de los humanos (Batt y Trotorello 2014). Así y todo, se puede afirmar que la bacteria aislada es *Micrococcus luteus* puesto que es la única que se reporta en alimentos y paredes pintadas de instalaciones. Inclusive, es las más frecuentes aisladas en diversos alimentos a comparación de *Micrococcys lylae*. Kaczmarek *et al.* (2019) no mencionan a esta bacteria como una deterioradora habitual de los jugos pasteurizados, por lo tanto, no representa un peligro y su detección se le atribuye a una contaminación cruzada.

#### **4.5.3. Identificación Molecular de Bacterias Sobrevivientes**

De la Figura 21, se muestra el diagrama de fluorescencia respecto al número de copias de ADN de *Lactobacilos spp*; se identificó a las bacterias lácticas por PCR en tiempo real y se halló que pertenecen al género *Lactobacillus spp*. Se aprecia las curvas de fluorescencia de la Figura 19 de las dos muestras y un control positivo. A partir de ella, se sacó el CT de estas dos muestras y se comparó con el CT control.



**Figura 21: Diagrama de fluorescencia respecto al número de copias de ADN de *Lactobacillus spp***

CT es el ciclo que sobrepasa un límite de detección y es proporcional al número de copias. Se estableció un rango aceptable de CT de 10 a 24. Los CT de las muestras son cercano al CT control y está dentro del rango; por lo tanto, las dos muestras pertenecen al género *Lactobacillus spp* (Uyttendaele *et al.* 2014). Ya Kaczmarek *et al.* (2019) mencionan que el género *Lactobacillus spp* es un deteriorador habitual de diversos jugos. No aparecen en grandes números por su susceptibilidad a la pasteurización (Aneja *et al.* 2014). Su presencia puede obedecer a que la pasteurización no haya sido uniforme (Tribst *et al.* 2009).

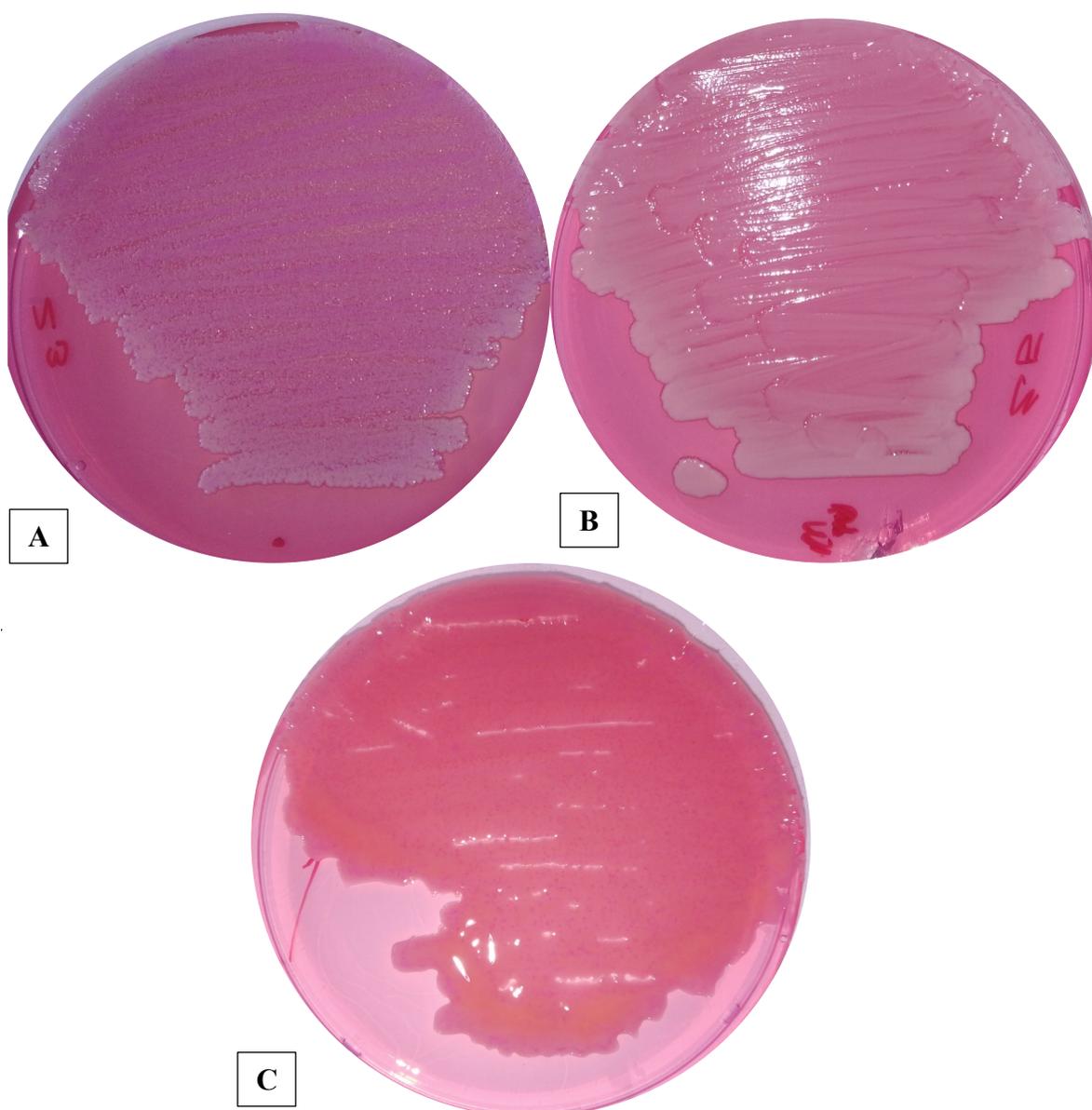
#### 4.5.4. Aislamiento y Caracterización de Levaduras

De la Tabla 17, se muestra el agrupamiento de levaduras en tres bebidas de pulpa de fruta con chía y extracto en la Figura 22, el aislamiento de levaduras en el medio DBRC. Se aislaron 30 muestras representativas de levaduras. Se observó que 29 de ellas presentan una apariencia blanca cremosa, asimismo, algunas presentan bordes granulados. Se halló una colonia cremosa rojiza. La bebida de pulpa de maracuyá concentra el mayor número de levadura.

**Tabla 17: Caracterización Morfológica de las levaduras aisladas de las tres bebidas**

Bebida	Forma	Color	Borde	Código	Incidencia	Foto
Fresa	Oval/Cremosa	Blanco	Continuo	LFC <sub>1</sub> /LFC <sub>2</sub> /LFC <sub>3</sub>	66,67%	B
	Oval/Cremosa	Blanco	Granulado	LFG <sub>1</sub>	33,33%	C
Maracuyá	Oval/Cremosa	Blanco	Continuo	LMC <sub>1</sub> /LMC <sub>2</sub> /LMC <sub>3</sub> /LMC <sub>4</sub>	72,73%	B
	Oval/Cremosa	Blanco	Granulado	LMG <sub>1</sub>	18,18%	A
	Oval/Cremosa	Rojo	Continuo	LMR <sub>1</sub>	9,09%	C
Arándano	Oval/Cremosa	Blanco	Continuo	LAC <sub>1</sub> /LAC <sub>2</sub> /LAC <sub>3</sub> /LAC <sub>4</sub>	80,00%	B
	Oval/Cremosa	Blanco	Granulado	LAG <sub>1</sub>	20,00%	C

\*Incidencia: Total: 30 Botellas; 9 bebidas de Fresa de 0.5 y 0.75%; 11 bebidas de Maracuyá de 0.5 y 0.75%; 10 bebidas de Arándano de 0.5 y 0.75%.



**Figura 22: Aislamiento de levaduras sobrevivientes**

El hábitad natural de las levaduras son los suelos, las pulpas de frutas y diversas regiones de las plantas; por ello, no sorprende su detección en las tres bebidas (Salamao *et al.* 2014). Se

suele emplear la pasteurización para eliminar las levaduras puesto que son susceptibles al calor (ICMSF 2005). A pesar de los cuidados y precauciones asumidas durante el proceso, se constató la presencia de levaduras en las tres bebidas pasteurizadas. Ante ello, Hernández *et al.* (2018) reportaron que las levaduras suelen contaminar a las bebidas en cualquier parte del proceso, algunas de ellas sobreviven a la pasteurización y se mantienen latente, esperando el momento oportuno para surgir. En este caso, se presume que el deterioro inicial causado por las bacterias propició las condiciones necesarias para su proliferación.

Lamentablemente, identificar a las levaduras por su morfología es una tarea complicada puesto que comparten una misma morfología y coloración. Se identificó a *Rhodotorula spp* por su coloración rojiza y crecimiento a temperaturas bajas (<8° C), aun así, es necesario una confirmación con pruebas bioquímicas (Linares y Solis 2007). Se espera que las otras colonias pertenezcan al género *Cándido spp* o *Sacchromyces spp*, deterioradores habituales en las bebidas (ICMSF 2005). Por último, no se halló levaduras del género de *Brettanomyces spp* y *Zygosaccharomyces spp* al no observar crecimiento de colonias en los agares de brettanomyces y PRY.

#### 4.5.5. Identificación Bioquímica de Levaduras Sobrevivientes

De la Tabla 18, se muestra la identificación bioquímica de *Candida lambica*, *Candida Guilliermondii*, *Candida famata*, *Candida parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhodotorula rudra*.

**Tabla 18: Identificación bioquímica de levaduras**

Reactivo	LMR <sub>1</sub>	LAC <sub>4</sub>	LMC <sub>1</sub>	LFC <sub>3</sub> /LMC <sub>3</sub>	LFG <sub>1</sub> /LMG <sub>1</sub> / LAG <sub>1</sub>	LFC <sub>1</sub> /LFC <sub>2</sub> /LMC <sub>2</sub> / LMC <sub>4</sub> / LAC <sub>1</sub> /LAC <sub>2</sub> /LAC <sub>2</sub>
Ester	+	-	-	-	-	+
Fosfato	+	-	+	+	-	+
Glucosa	-	+	-	+	+	+
Maltosa	-	+	-	-	-	+
Sacarosa	+	+	-	+	-	+
Histidina	+	+	+	-	-	+
Trehalosa	-	-	-	+	-	-
Fosforilcolina	+	-	+	-	-	+
Leucil-glicina	+	+	+	-	-	+
α,D-glucósido	+	+	-	-	+	+
<b>Levadura</b>	<i>Rhodotorula. Rudra</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Candida lambica</i>	<i>Candida famata</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida guilliermondii</i>
<b>Incidencia</b>	6,67%	6,67%	6,67%	13,33%	20,00%	46.67%

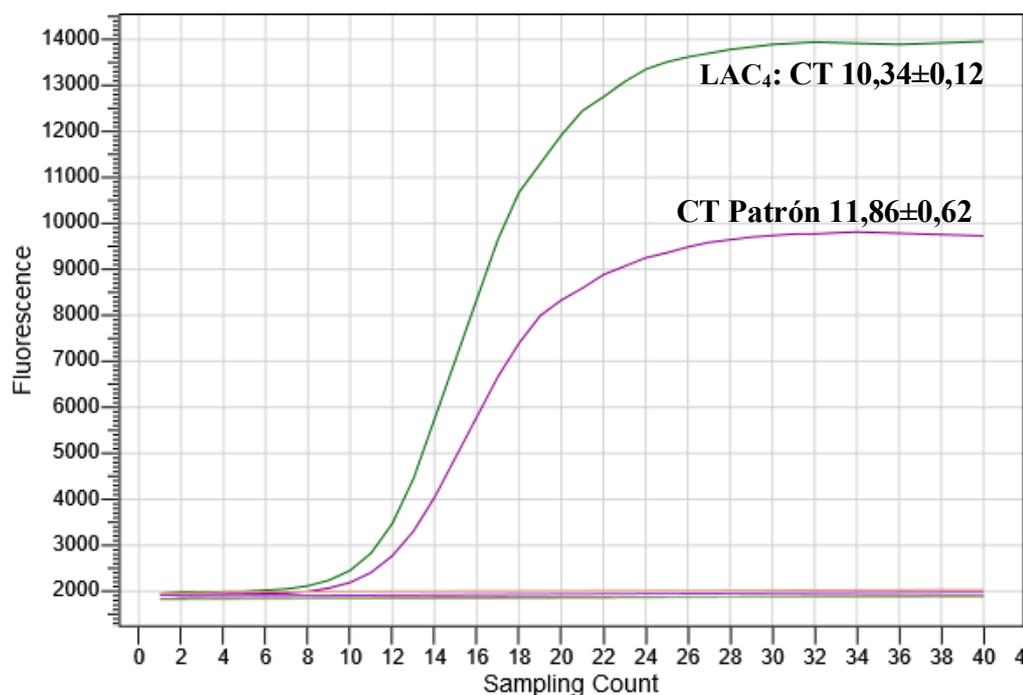
Todas las levaduras identificadas están asociadas al deterioro de varios jugos y bebidas pasteurizadas (Stanford *et al.* 2014). Las *Candidas spp* y *Sacchromyces spp* identificadas están presentes en pulpas de frutas (ICSMF 2005). Asimismo, se identificó como principal deterioradora a la *Candida guilliermondii*, es la levadura de mayor incidencia en las tres pulpas de frutas (14 de 30 botellas); Stanford *et al.* (2014) identificaron que la contaminación de sus jugos pasteurizados fue durante el proceso de llenado por esta misma levadura ya que posee la habilidad de propagarse por el aire en las instalaciones de elaboración. Pues bien, esto explica su alta incidencia en las tres bebidas y la necesidad de tomar mayores controles de higiene respecto a las instalaciones.

Respecto al deterioro en jugos y bebidas, Kaczmarek *et al.* (2019) mencionan que la atención debe enfocarse en los géneros de *Candida spp*, *Saccharomyces spp* y *Pinchia spp*. En este caso, el género *Candida spp* representa un peligro que debe ser atendido de forma inmediata. Si bien no son los responsables iniciales del deterioro, los consumidores las perciben por el ensanchamiento en bebidas, repercutiendo negativamente en su imagen y comercio (ICSMF 2005; Belikcaqua *et al.* 2011). Por otra parte, *Rhodotorula rudra* es una levadura de color rojizo que destaca por su capacidad para sobrevivir a temperaturas menores de 4°C. Aunque esta capacidad sea una amenaza, su detección fue baja (2 de 30 botellas), por ende, no es un peligro para las bebidas (Lawlor *et al.* 2009).

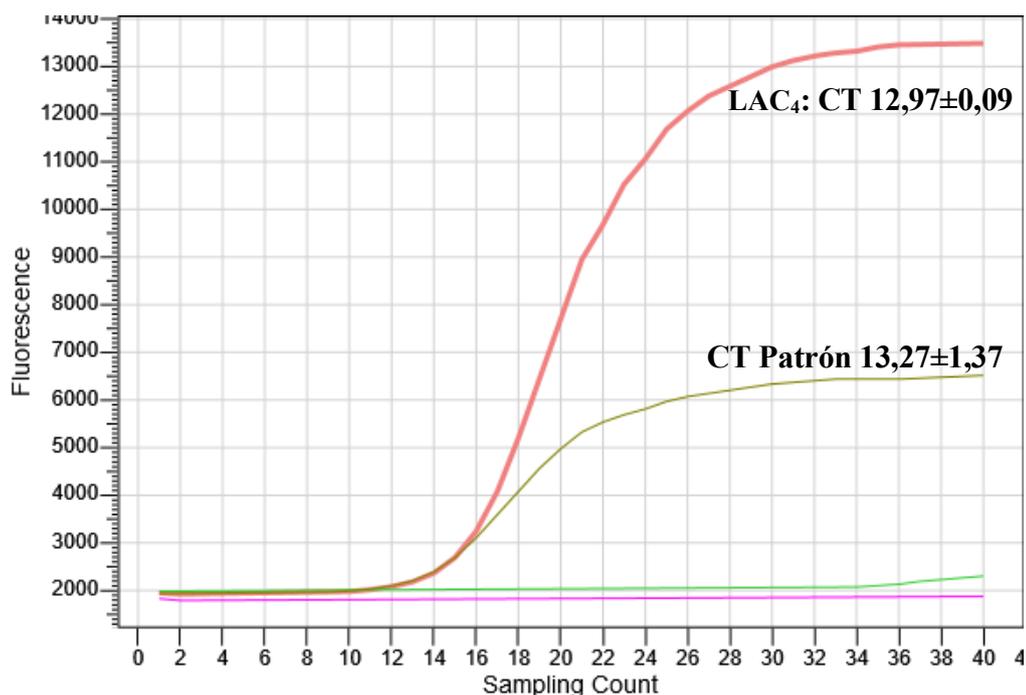
Soto (2014) reportó que el extracto de pulpa de ayrampo posee actividad antifúngica contra *Candida spp*; los resultados obtenidos señalan que la mayoría de levaduras identificadas pertenecen a este género. Capaz este sea el motivo por el cual no se observó un deterioro inicial de levaduras al evaluar la estabilidad microbiológica de las tres bebidas (Tabla 8 y 9). El extracto de ayrampo inhibió inicialmente; sin embargo, luego estas levaduras se propagaron por el deterioro de las bacterias termófilas, acéticas y *Lactobacillus spp*.

#### **4.5.6. Identificación molecular de las levaduras**

En las Figuras 23 y 24, se muestra el diagrama de fluorescencia respecto al número de copias de ADN de *Saccharomyces spp* y *Saccharomyces cerevisiae*; se identificó a la levadura L14, como *Saccharomyces cerevisiae*.



**Figura 23:** Diagrama de fluorescencia respecto al número de copias de ADN de *Saccharomyces cerevisiae*



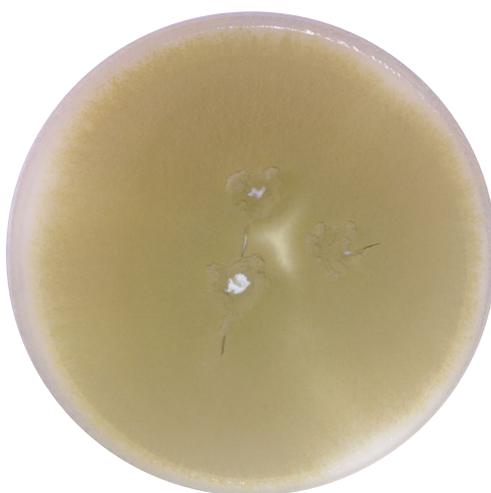
**Figura 24:** Diagrama de fluorescencia respecto al número de copias de ADN de *Saccharomyces spp*

Anteriormente, se mencionó que el CT tiene un rango aceptable de 10 a 24 (Uyttendaele *et al.* 2014). El CT de la muestra L14 está dentro de ese rango y cercano a los CT control del género y especie; por ende, se afirma que la levadura L14 es *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levadura es considerada la principal deterioradora de diversas bebidas (ICMSF 2005). Su incidencia es alta en diversas bebidas con pulpa de fruta; no obstante, su incidencia ha sido

baja comparando a la *Candida* en este caso (Stanford *et al.* 2013). Esto implica que la *Candida spp* ha aprovechado mejor los nutrientes de la bebida de pulpa de fruta y chía, y marginando el crecimiento de la *Saccharomyces cerevisiae* (Sasaki *et al.* 2002).

#### 4.5.7. Aislamiento e identificación morfológica de mohos termófilos

En la Figura 25, se muestra el aislamiento de *Paecilomyces variotii*; se identificó al moho termófilo *Paecilomyces variotii* en las tres bebidas.



**Figura 25: Aislamiento de *Paecilomyces variotii***

Se identificó a *Paecilomyces variotii* también conocido como *Byssochlamys spectabilis* por su color mostaza de sus hifas, asimismo, el método de Pit y Hocking (1987) asegura el aislamiento del género *Byssochlamys*. Su género es reconocido por su resistencia al calor y ser deterioradora de diversos jugos pasteurizados y enlatados (Batt y Trotorello 2014). Debido a ello, no se puede eliminar completamente, aunque su incidencia suele ser baja, Por ende, no representa un peligro (Kotzekidou 1997).

A la luz de los resultados, se aprecia que el deterioro de las bebidas se debe a una contaminación cruzada, específicamente durante el llenado. Debido a que el *Acinetobacter calcoaceticus* y *Candida guilliermondii* son susceptibles a la pasteurización, por consiguiente, la contaminación debió suceder después de ese proceso, ambas se encuentran en la superficie de instrumentos metálicos y el aire, respectivamente (Woodroof 2012; Stanford *et al.* 2014). Esto implica la necesidad de tomar mayores medidas de cuidado durante esta fase del proceso.

Aparte, una posible causa del hallazgo de *Candida spp* y los *Lactobacillus spp* en las bebidas, se deba a que a pasteurización no haya sido uniforme por el mucílago de la chía que englobe a toda la bebida, a pesar que ambos microorganismos son susceptible al calor (Aneja *et al.* 2014; Xingu *et al.* 2017). También, es necesario hallar un extracto antimicrobiano capaz de inhibir a los bacilos esporulados puesto que este grupo se encuentran en el aire, ambientes de trabajo e incluso en las botellas vacías (ICMSF 2005). Sus esporas no pueden ser eliminadas de esas zonas, adicionalmente, la pasteurización es inútil contra ellas (Chen *et al.* 2006).

Por último, la *Rhod. Rudra*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Micrococcus lutei*, *Enterobacter clocae*, *Shigella spp* y *Paecilomyces variotii* no representan un peligro puesto que su incidencia fue baja. En conclusión, hay que concentrarse en eliminar a los bacilos esporulados, *Acinetobacter calcoaceticus* y *Candida guilliermondii* para futuras investigaciones respecto a bebidas.

## V. CONCLUSIONES

1. El extracto de ayrampo pudo ampliar el tiempo de almacenamiento significativamente de una bebida a base de pulpa de fruta y semilla de chía irradiada.
2. Los tres extractos poseen actividad antimicrobiana para *St. aureus* y *E.coli*. El extracto de moringa inhibió 98 mg/mL para ambas bacterias; mientras que el de tara fue a 3 y 30 mg/mL para *St. aureus* y *E. coli*, y el de ayrampo fue 8 y 16 mg/mL, respectivamente.
3. La dosis de irradiación (4, 7 y 10 KGy) y de ozono (60 y 100 mg/Kg) disminuyeron a niveles indetectables la población de levaduras, mesófilos aerobios y esporulados en la semilla de chía. Se seleccionó la dosis de 4 KGy para descontaminar a la semilla de chía por accesibilidad y costo.
4. El uso del extracto de ayrampo afectó positivamente el aspecto sensorial de las tres bebidas con pulpa de fruta y semilla de chía. El uso del extracto de ayrampo mantuvo por 60 días los niveles microbiológicos exigidos por Digesa en las bebidas de maracuyá y arándano. Mientras que lo mantuvo por 50 días en las bebidas de fresa.
5. Se identificó a la *Candida guilliermondii* como levadura responsable del deterioro de bebidas de pulpa de fruta con semilla de chía y extracto de ayrampo. Mientras que se identificó a *Lactobacillus spp* y *Acinetobacter calcoaceticus* como bacterias responsables del deterioro de bebidas de pulpa de fruta con semilla de chía y extracto de ayrampo.

## VI. RECOMENDACIONES

- Investigar un extracto con actividad antimicrobiana enfocada a bacilos esporulados, *Lactobacillus casei* y *Acinetobacter calcoaceticus*.
- Averiguar un extracto antifúngico contra las levaduras del género *Candida spp.*
- Evaluar el efecto desinfectante de la irradiación en dosis menores en la semilla de chía.
- Evaluar el extracto de airampo en proporciones mayores en la elaboración de bebidas.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrodataperu. 2019. Exportaciones Agropecuarias Perú Periodo 2017-2019. Lima, Perú. Consultado el 18 Dic. 2019. Disponible en <https://www.agrodataperu.com/>
- Akbas, M & Ozdemir, M. 2008a. Application of gaseous ozone to control populations of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Bacillus cereus* spores in dried figs. *J. Food Microbial* 25: 386–391.
- Akbas, M. & Ozdemir, M. 2008b. Effect of gaseous ozone on microbial inactivation and sensory of flaked red peppers. *Int. J. Food Microbial* 43: 657–662.
- Álvarez-Ordoñez, A; Fernández, A; Bernardo, A & López, M. 2009. Comparison of acids on the induction of an acid tolerance response in *Salmonella Typhimurium*, consequences for food safety. *Journal of Meat Science* 81: 65-70.
- Añanca, E. 2009. Efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Tesis Lic. Tacna, Perú, Universidad Nacional Jorge Basadre. 85p.
- Aneja, K; Dhiman, R; Aggarwal, N & Aneja, A. 2014. Emerging preservation techniques for controlling spoilage and pathogenic microorganisms in fruit juices. *Int. J. Microbiology*. 14p. Article ID 758942. <https://doi.org/10.1155/2014/758942>.
- APHA (American Public Health Association). 2015. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20<sup>th</sup> (Ed). Washington, EEUU. 68p.
- Argudín, M; Mendoza, M & Rodicio, M. 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *J. Toxins (Basel)* 2(7): 1751-73. Doi: 10.3390/toxins2071751
- Ávila, H. 2016. Evaluación de diferentes temperaturas en el proceso de sanitización con ETO (óxido de etileno) en semilla de chía (*Salvia hispánica*) para consumo. Tesis Lic. Coahuila, México, Universidad autónoma agraria Antonio Narro. 58 p.

- Bataller-Venta, M; Santa Cruz-Broche, S & García-Pérez, M A. 2010. El ozono: una alternativa sustentable en el tratamiento postcosecha de frutas y hortalizas. Rev. CENIC. Ciencias Biológicas 41(3): 155-164.
- Batt & Trotorello Z. 2014. Encyclopedia of Food Microbiology. Chapter *Byssochlamys & Micrococcus*. 2<sup>nd</sup>. Amsterdam, Netherland, Elsevier. 3248 p. ISBN: 9780123847331
- Bedascarrasbure, E.; Maldonado, L.; Álvarez, A. & Rodríguez E. 2004. Contenido de Fenoles y Flavonoides del Propóleo Argentino. Rev. Acta Farm. Bonaerense 23 (3): 369-72.
- Bevilacqua, M; Corbo, D; Campaniello, D; D'amato; M. Gallo; B. Speranza & Sinigaglia M. 2011. Shelf life prolongation of fruit juices through essential oils and homogenization: a review. In Méndez-Vilas (Ed.), Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology and education. Greensboro, USA. 1157-1166.
- Burnett, S & Beuchat, L. 2000. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 25 (6): 281-287.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology 94 (3): 223-253.
- Bushway, A; Belyea, P.R & Bushway, R.J. 1981. Chia seed as a source of oil, polysaccharide, and protein. J. Food Sci. 46: 1349–1356.
- Busilacchi, H.; Qüesta, T. & Zuliani, S. 2015. La chía como una nueva alternativa productiva para la región pampeana. Rev. Agromensajes 41(2): 37- 46.
- Caggia, C; Scifo, G; Restuccia, C & Randazzo, C. 2009. Growth of acid-adapted *Listeria monocytogenes* in orange juice and in minimally processed orange slices. J. Food Control 20 (1): 59-66.
- Capitani, M. I; Nolasco, S. M. & Tomás, M. C. 2013. Effect of mucilage extraction on the functional properties of Chia meals. Journal of Food Industry: 421-437.
- Castro, N; Yépez, A & Abram, A. 2013. Comparación de tres métodos para determinar el porcentaje de taninos con el método de la norma ASTM D6401 aplicado para la “Tara”, “Quinual”, “Mimosa” y “Pino”. Rev. Soc. Quím. 79(4): 381-387.

- Celenk, M & Ayse, B. 2015. Antimicrobial activity of grape seed extract on DSM 3922 vegetative cells and spores in apple juice. *J. Food Science and Technology* 60 (1): 238-245. ISSN 0023-6438.
- Chawla, A; Kasler, D; Sastry, S & Yousef, A. 2012. Microbial decontamination of food using ozone. *J. Microbial Decontamination in the Food Industry*: 495–532. doi:10.1533/9780857095756.3.495
- Chen, S; Tang, Q; Zhang, X; Zhao, G; HU, X. & Liao, X. 2006. Isolation and characterization of thermo-acidophilic endospore-forming bacteria from the concentrated apple juice-processing environment. *J. Food Microbiol.* 23 (5): 439-445.
- Chen, CF; Ya-Dong, L & Zhe, X. 2010. Chemical principles and bioactivities of blueberry. *J. Yao Xue Xue Bao* 45(4): 422–429.
- Chitho P. 2018. High-Dose Irradiated Food: Current progress, applications, and prospects. *J. Radiation Physics and Chemistry* 144: 34-36. <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2017.11.010>
- Christiana, EA; Stephen, A & Tukayi, K. 2019. Phenolic compound profile and biological activities of Southern African *Opuntia ficus-indica* fruit pulp and peels. *J. Food Science and Technology* 111 (3): 337-344.
- CLSI (Clinical Laboratory Standards International). 2003. M07 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 6<sup>ed</sup> ed. Wayne, USA. 91 p.
- Cowan, M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Rev. Clin Microbiol.* 12(4): 564-82.
- Danyluk, M; Goodrich-Schneider, R; Schneider, K.; Harris, L & Worobo, R. 2012. Outbreaks of Foodborne Disease Associated with Fruit and Vegetable Juices 1922-2010. Available from: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/FS/FS18800.pdf>.
- Davidson, P. 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds: In Doyle M.P; Beuchat, L.R & Montville, T.J (Eds), *Food microbiology: fundamentals and frontiers* 1st. Washington, USA: 520-556.

- Davidson, P. 2001. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds: In Doyle M.P; Beuchat, L.R & Montville, T.J (Eds), Food microbiology: fundamentals and frontiers. 2ed. Washington, USA: 593-628.
- Davidson, P; Critzer, F & Taylor, T. 2013. Naturally occurring antimicrobials for minimally processed foods. Annual Review of Food Science and Technology 4: 163-190
- De la cruz, P. 2004. Aprovechamiento Integral y Racional de la tara *Caesalpinea spinosa*. Rev. Inst. Investigación. Facultad de Minas metal 7(14): 31-35.
- De Melo Pereira, GV; Magalhães, KT & Lorenzetti, ER. 2012. A Multiphasic Approach for the Identification of Endophytic Bacterial in Strawberry Fruit and their Potential for Plant Growth Promotion. J. Microbial Ecology 63: 405–417. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9919-3>
- Deak, T & Beuchat, L. 1993. Yeasts associated with fruit juice concentrates. J. Food Protection. 56 (9): 777-782.
- Di Sapio, B.O; Busilacchi, M.H.; Quiroga, M. & Severin, C. 2012. Caracterización morfo anatómica de hoja, tallo, fruto y semilla de *Salvia hispánica L.* Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 11(3): 249-268.
- DIGESA (Dirección general de Salud Ambiental). 2008. Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Lima, Perú. 23p.
- Duffy, G; Garvey, P & McDowell, D. 2004. Verocytotoxigenic E. coli. Connecticut, USA. Food & Nutrition Press. 457p.
- Espina, L; García-Gonzalo, D; Laglaoui A; Markey, BM & Pagan, R. 2013. Synergistic combinations of high hydrostatic pressure and essential oils or their constituents and their use in preservation of fruit juices. Int. J. Food Microbiol 161: 23-30.
- El-Desouky TA; Sharoba A; El-Desouky, Ai; El-Mansy, HA & Naguib, K. 2012. Effect of Ozone Gas on Degradation of Aflatoxin B1 and *Aspergillus Flavus Fungal*. J Environment Analytic Toxicol 2 (2):128. doi:10.4172/2161-0525.1000128
- FAO (Organización para la alimentación y agricultura). 2005. Norma General del Codex para zumos (jugos) y néctares de frutas: CODEX STAN 247-2005. Roma, Italia. 21 p.

- Fernández, VC; Domínguez, VF; De Freitas, V; Delerue-Matos, C & Mateus, N. 2012. Strawberries from integrated pest management and organic farming: Phenolic composition and antioxidant properties. *Food Chemistry* 134(4): 1926–1931. doi:10.1016/j.foodchem.2012.03.130
- Ferrari, MH; Wahanik, AL; Rodriguez, C; Pedrosa, MT; Kil, Y & Joy, C. 2015. Use of chia (*Salvia hispanica L.*) mucilage gel to reduce fat in pound cakes. *LWT - Food Sci Technol.* 63(2):1049–55.
- Fonseca, M & Giovanna, A. 2008. Calidad Microbiológica de jugos preparados en hogares de bienestar familiar en la zona Norte de Cundinamarca. Tesis Lic. Bogotá, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana. 100p.
- Friedman, M; Henika, P; Levin, C & Mandrell, R. 2004. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Enterica* in apple juice. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6042-6048.
- García, A y Pérez-Urria, E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Revista Serie Fisiología Vegetal* 2 (3): 119-145.
- Garda, MR; Alvarez, MS; Lattanzio, MB; Ferraro, C & Colombo, ME. 2012. Role of the hydrocolloids of chia and flax seeds in the optimization of gluten free breads. *Journal of Diaeta* 30: 31–38.
- Giner, M; Vegara, S; Funes, L; Martí, N; Saura, D; Micol, V & Valero, M. 2012. Antimicrobial activity of food-compatible plant extracts and chitosan against naturally occurring micro-organisms in tomato juice. *Journal. Sci. Food Agric* 92: 1917–1923. doi:10.1002/jsfa.5561.
- Giovanni, ME & Pangborn, RM. 1983. Measurement of Taste Intensity and Degree of Liking of Beverages by Graphic Scales and Magnitude Estimation. *Journal of Food Science* 48: 1175-1182. doi:10.1111/j.1365-2621.1983.tb09186.x
- Guevara, J; Guevara, D; Béjar, V; Huamán, A & Valencia A. 2014. Evaluación del cocimiento de diferentes biovariedades de *Caesalpinia spinosa* (Tara) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles y resistentes a Oxacilina. *Rev. An Fac med* 75(2):177-80.

- Guevara-Cruz, M; Tovar, A; Aguilar-Salinas, C; Medina-Vera, I; Gil-Zenteno, L; Hernández-Viveros, I; López-Romero, P; Ordaz-Nava, G; Canizales-Quinteros, S; Guillen-Pineda, L & Torres, N; 2012. A dietary pattern including nopal, chia seed, soy protein, and oat reduces serum triglycerides and glucose intolerance in patients with metabolic syndrome. *J. Nutrition* 142: 64–69.
- Guimarães, D; Momesso, L. & Pupo, M. 2010. Antibióticos: importancia terapéutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova* 33 (3): 667-679.
- Guzel-Seydim, Z; Greene, A. & Seydim, A. 2004. Use of ozone in the food industry. *LWT - Food Science and Technology* 37(4): 453–460. doi:10.1016/j.lwt.2003.10.014
- Gyawali, R., Hayek, S. & Ibrahim, S. 2015. Plant extracts as antimicrobials in food products. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. Cambridge, UK, Elsevier. 49–68. doi:10.1016/b978-1-78242-034-7.00003-7.
- Hayek, S. A; Gyawali, R & Ibrahim, S. A. 2013. Antimicrobial natural products. In Méndez-Vilas (Ed.), *Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, technology and education*. Greensboro, USA. 910-921.
- Hernández, A; Pérez-Nevaldo, F; Ruiz-Moyano, S; Serradilla, MJ; Villalobos, MC; Martín, A & Córdoba, MG. 2018. Spoilage yeasts: What are the sources of contamination of foods and beverages?. *Int. Journal of Food Microbiology* 286: 98-110. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.031>.
- Herrera, M. 1999. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera* 34: 33-41.
- Hierro, N; Esteve-Zarzoso, B; Mas, A & Guillamón, JM. 2007. Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR. *J. FEMS Yeast Research* 7(8): 1340–1349. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00304.x>
- Hocking, A. & Pitt, J. 1984. Food spoilage fungi: heat-resistant fungi. *J. CSIRO Food Res. Q.* 44: 73-82.
- Howard, A; O'Donoghue, M; Feeney, A & Sleator, RD. 2012. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *J. Virulence* 3(3): 243–250. <https://doi.org/10.4161/viru.19700>

- Hyldgaard, M; Mygind, T; Meyer, RL. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *J Front Microbiol* 3: 1-24.
- Hui, Y. 2006. *Handbook of Fruits and Fruit Processing*. 1<sup>st</sup>. Delhi, India. John Wiley & Sons. 697 p.
- INDECOPI (Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual). 2009. NTP 203.110:2009, Norma Técnica Peruana Jugos, Néctares y Bebidas de Fruta, Lima, Perú. 10p.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 2005. *Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities*. 2<sup>ed</sup>. New York, USA. Kluwer Academic/ Plenum Publishers. 724p.
- Ixtaina, V. 2010. *Caracterización de la semilla y el aceite de chía (Salvia hispánica L.) obtenido mediante distintos procesos: Aplicación en tecnología de alimentos*. Tesis Doctoral. Buenos Aires, Argentina, Universidad La Plata. 301p.
- Norma Técnica Peruana (NTP-ISO 1842: 2001): *Productos de frutas y vegetales. Determinación del pH. (ISO 1842:1991, IDT)*, 2001, 6p.
- Norma Técnica Peruana (NTP-ISO IDT 2173:2001): *Productos de Frutas y Vegetales. Determinación del contenido de sólidos solubles. Código refracto métrico*. 2001, 7p.
- Kaczmarek, S; Avery V & Singleton I. 2019. Microbes associated with fresh produce: Sources, types and methods to reduce spoilage and contamination. *J. Advances in Applied Microbiology* 107: 29-82. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2019.02.001>.
- Kanako, M; Ogata, M; Sugawara, M & Kiuchi, K. 1998. Anti-fungal activities of essential oils of spice and sucrose ester of lauric acid against *Saccharophilic Fungus Wallemia sebi*. *J Antibact. Antifungal Agents* 26: 3-10.
- Kim, DH; Chon, JW; Kim, H; Kim, HS; Choi, D; Hwang, DG & Seo, KH. 2015. Detection and enumeration of lactic acid bacteria, acetic acid bacteria and yeast in kefir grain and milk using quantitative real-time PCR. *Journal of Food Safety* 35(1): 102–107. <https://doi.org/10.1111/jfs.12153>

- Kloucek, P; Polezny, Z; Svobodova, B; Vlkova, E & Kokoska, L. 2005. Antibacterial Screening of Some Peruvian Medicinal Plants Used in Callería 96 District. *Journal of Ethnopharm.* 99: 309-312.
- Kondo, K; Takaishi, Y; Shibata, H; Higuti, T & Iismrs. 2006. Intensifier of beta-Lactam Susceptibility in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. *Journal of Phytomedicine* 13: 209-212.
- Kotzekidou, P. 1997. Heat resistance of *Byssochlamys novae*, *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* isolated from canned tomato paste. *J. Food Sci.* 62 (2): 410-412.
- Jensen, B; Knudsen, IMB; Andersen, B; Nielsen, KF; Thrane, U; Jensen, DF & Larsen, J. 2013. Characterization of microbial communities and fungal metabolites on field grown strawberries from organic and conventional production. *International Journal of Food Microbiology* 160: 313–322.
- Lawlor, K. A; Schuman, J. D; Simpson, P. G & Taormina, P. J. 2009. Microbiological spoilage of beverages. In WH. Sperber & MP. Doyle (Eds.), *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages*. New York, USA. 245-284.
- Lima, MC; Paiva De Sousa, C; Fernández-Prada, J; Harel, JD; Dubreuil, EL & De Souza. 2019. A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. *Journal Microbial Pathogenesis* 130: 259-270.
- Liñan, F. 2010. *Moringa oleífera*, el árbol de la nutrición. *Revista Ciencia y Salud Virtual* 2(1): 130-138 p.
- Linares, M. & Solis, F. 2007. Identificación de levaduras. *Revista Iberoamericana de Micología* 2007: 20p. ISBN: 978-84-611-8776-8.
- Lock De Ugaz, O. 1994. *Investigación Fitoquímica. Método en el estudio de productos naturales*. Lima, Perú, Fondo Editorial PUCP. 10p.
- López, A; Oré, R; Miranda, C; Trabucco, J; Orihuela, D; Linares, J; Villafani, Y; Ríos, S & Siles, M. 2011. Capacidad antioxidante de poblaciones silvestres de “tara” (*Caesalpinia spinosa*) de las localidades de Picoy y Santa Fe (Provincia de Tarma, departamento de Junín). *Rev. Scientia Agropecuaria* 2(1): 25-29.

- López, C; Garró, V; Yrei, V & Gallardo, T. 1998. Acción antimicrobiana *Caesalpineae Tintoria* (Molina) Kuntze o tara de diferentes regiones del Perú. Rev. Ciencia E Investigación 1(1): 27-31.
- Mahale, D. P., Khade, R. G., & Vaidya, K. V. 2008. Microbiological analysis of street vended fruit juices from Mumbai city, India. Internet Journal of Food Safety 10: 31–34.
- Massilia, R; Melgar, R; Fortuny, O & Belloso, M. 2009. Control of pathogenic and spoilage micro-organisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. Compr. Rev. Food Sci. Food Safety 8: 157-180.
- Mera, L.M; Castro, D & Bye, R.A. 2011. Especies Vegetales Poco Valoradas: Una Alternativa Para La Seguridad Alimentaria. México, UNAM-SNICS-SINAREFI. 215p
- Miranda, F. 2012. Guía técnica para el manejo del cultivo de Chía (*Salvia hispánica*) en Nicaragua. Nicaragua, Sebaco. 16p
- Mothana, R. & Lindequist, U. 2005. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. Journal of Ethnopharmacology 96 (1-2): 177-181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.006>.
- Moulehi, I; Bourgou, S; Ourghemmi, I & Tounsi, M. 2012. Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata Blanco*) and bitter orange (*Citrus aurantiumL.*) seeds extracts. Industrial Crops and Products 39 (1): 74-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.013>
- Mcknight, IC; Eiroa, MNU; Sant'ana, AS & Massaguer, PR. 2010. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in pasteurized exotic Brazilian fruit juices: Isolation, genotypic characterization and heat resistance. Food Microbiology 27(8): 1016–1022. doi:10.1016/j.fm.2010.06.010
- Nada, H & Zainab, G. 2013. Antimicrobial Activity of Different Aqueous Lemon Extracts. Journal of Applied Pharmaceutical Science 3(06): 74-78.
- Negi, P. 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. Int. J. Food Microbiol. 156: 7-17
- New Market Latin American. 2016. Manual de Elaboración de Bebidas. Perú, Lima. 10p

- No, H.K; Meyers, S.P; Prinyawiwatkul, W & Xu, Z. 2007. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. *J Food Sci.* 72(5): 87-100.
- Novak, J.S & Yuan, J.T.C. 2004. Increased inactivation of ozone-treated *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores on fabricated beef surfaces using mild heat. *J. Food Prot.* 67: 342–346.
- Olson, ME & Fahey, JW. 2011. *Moringa oleifera*: un árbol multiusos para las zonas tropicales secas. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 1071-1082.
- Oner, M. & Demirci, A. 2016. Ozone for Food Decontamination. Theory and applications. *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry.* 2<sup>nd</sup>. Pennsylvania, EEUU, Woodhead Publishing. 491–501. doi:10.1016/b978-0-08-100155-4.00033-9
- Ouattara, B & Mafu, A. A. 2000. Natural antimicrobials in combination with gamma irradiation. In S. Méroller (Ed.), *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods.* Cambridge, UK. 263-271.
- Pal, Sk; Mukherjee, Pk; Saha, K; Pal, M & Saha BP. 1995. Antimicrobial action of the leaf extract of *Moringa oleifera* lam. *J. Anc Sci Life* 14: 197-199.
- Pandey, A., & Negi, P. 2018. Use of Natural Preservatives for Shelf Life Extension of Fruit Juices. In Rajauria, G., & Tiwari, B (Ed.), *Fruit Juices: extraction, composition, quality and analysis.* Ireland: Edit. Academic Press. 571–605.
- Peinado, M. 2019. Biodiversidad: Moringa, la nueva reina foodie neoyorquina. Consultado el 27 de Dic. Disponible en <http://www.sobreestoyaquello.com/>
- Peixoto, JR; Silva, GC; Costa, RA; Vieira, GH & Fonteles, AA. 2011. In vitro antibacterial effect of aqueous and ethanolic Moringa leaf extracts. *Asian Pacific. Journal of tropical medicine* 4: 201-204.
- Peru-Retail. 2019. Mercado de jugos y néctares es liderado por AJE en Perú. Consultado el 21 Dic. 2019. Disponible en <https://www.peru-retail.com/>.
- Pettipher, GL; Osmundson, ME. & Murphy, JM. 1997. Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks. *Lett. Appl. Microbiol.* 24 (3): 185-189.

- Pina-Pérez, M. C; Martínez-López, A & Rodrigo, D. 2012. Cocoa powder as a natural ingredient revealing an enhancing effect to inactivate *Cronobacter sakazakii* cells treated by pulsed electric Fields in infant milk formula. *J. Food Control* 32(1): 87-92.
- Pizarro, P.L; Eveline, A.E; Silva, C.A; Sammán, N.C; Dupas, H.M & Kil, C.Y. 2015. Functional bread with n-3 alpha linolenic acid from whole chia (*Salvia hispanica L.*) flour. *J. Food Sci. Technol.* 7: 4475-4482.
- Radovich, T. 2009. Farm and Forestry production and marketing profile for Moringa. Permanent Agriculture Resources. Hawaii, EEUU, Edit Elevitch, 12p.
- Rajauria, G & Tiwari, B. 2018. Fruit Juices: extraction, composition, quality and analysis. Ireland, Edit. Academic Press. 910p.
- Ravindran, R & Jaiswal, AK. 2019. Wholesomeness and safety aspects of irradiated foods, *Food Chemistry* 285: 363-368. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.002>
- Rendón-Villalobos, R; Ortiz-Sánchez, A & Flores-Huicochea, E. 2018. Nutritionally Enhanced Foods Incorporating Chía Seed. In *Handbook of Food Bioengineering, Therapeutic Foods*. 1<sup>st</sup>. London, UK, Academic Press. 257-281.
- Ricke, S. C. 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science* 82(4): 632-639.
- Ringuelet, J & Viña, S. 2013. Productos Naturales Vegetales. Tesis Lic. Buenos Aires, Argentina, Universidad Nacional de la Plata. 261p.
- Rivera, J; Muñoz-Hernández, O; Rosas-Peralta, M; Aguilar-Salinas, C; Popkin, B & Willett, W. 2008. Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana. *Revista Salud Pública Mex* 50:173-195.
- Rossi, L; Watson, D; Escandarani, S; Miranda, A & Troncoso, A. 2009. La radiación a la mesa. *Revista chilena de infectología* 26(4): 318-330. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182009000500003>
- Salomao, BCM; Muller, C; Amparo, HCD & Aragaño, GMF. 2014. Survey of molds, yeast and Alicyclobacillus spp. from a concentrated apple juice productive process. *Braz. J. Microbiol.* 45 (1): 49-58.

- Sanchez, E., García, S., & Heredia, N. 2010. Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology* 76(20): 6888-6894.
- Santos, A; Luz, L; Pontual, E; Napoleao, T; Paiva, P & Coelho, L. 2015. *Moringa oleifera*: Resource Management and Multiuse Life Tree. *Journal Advances in Research* 4(6): 388-402.
- Sarmiento, VH. 2003. Estabilidad Fisicoquímica y Actividad antioxidante de las Betalainas en el Extracto hidrosoluble del Ayrampo (*Opuntia soehrensii*) durante el proceso de Atomizado. Tesis de Lic. Lima, Perú, UNALM. 86p.
- Sasa, P; Anja, L & Sonja, B. 2016. Control of *Alicyclobacillus spp.* vegetative cells and spores in apple juice with rosemary extracts. *Journal Food Control* 60: 205-214.
- Sasaki, Y; Kawaguchi, S; Kamaya, A; Ohshita, M; Kabasawa, K & Iwama, K. 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat. J. Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 519: 103-119.
- SINEACE (Sistema Nacional de Evaluación, Acreditación y Certificación de la Calidad Educativa). 2017. Productores de Tara podrán certificar sus competencias con base a criterios de calidad. SINEACE. Consultado el 21 de Dic. 2019. Disponible en <https://www.sineace.gob.pe/>.
- Soto, M. 2014. Efecto antibacteriano y antifúngico comparativo de los extractos acuosos del *Zea mays L*, *Rubus glaucus*, *Opuntia soherensii* y diseño de un gel de limpieza cutánea. Tesis Lic. Lima, Perú, Universidad Nacional San Marcos. 85p.
- Stratford, M; Plumbridge, A & Archer, D. 2007. Decarboxylation of sorbic acid by spoilage yeasts is associated with the PAD1 gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6534-6542.
- Stratford, M; Steels, H; Nebe-Von-Caron, G; Avery, S.V; Novodvorska, M & ARCHER, D. B. 2014. Population heterogeneity and dynamics in starter culture and lag phase adaptation of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* to weak acid preservatives. *International Journal of Food Microbiology* 181(100): 40–47.
- Stratford, M; Steels, H; Nebe-Von-Caron, G; Novodvorska, M; Hayer, K & Archer, D. B. 2013. Extreme resistance to weak-acid preservatives in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Food Microbiology* 166: 126–134.

- Suarez, R. 2001. Conservación de alimentos por irradiación. Lima, Perú. Invenio. 85-124
- Talcott, ST; Percival, SS; Pittet-Moore, J; Celora, C. 2003. Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). J. Agric. Food Chem. 51: 935-941
- Thielmann, J; Kohnen, S & Hauser, A. 2017. Antimicrobial activity of *Olea europium* Linné extracts and their applicability as natural food preservative agents. International Journal of Food Microbiology 251: 48-66.
- Tribst, A; Santána, A & Massaguer, P. 2009. Review: Microbiological quality and safety of fruit juices—past, present and future perspectives. Crit. Rev. Microbiol. 35 (4): 310-339.
- USDA (United States Department of Agriculture) 2019. National Nutrient Database for Standard Reference. Consultado el 18 Oct.2019. Disponible en <https://www.usda.gov/>
- Uyttendaele, M; Rajkovic, A; Ceuppens, S; Baert, L; Van, E; Herman, L & Jasson, V. 2014. PCR applications in food microbiology. In C. Encyclopedia of food microbiology. Waltham, USA, Elsevier Academic Press. 1033–1041.
- Valdivia-Lopez, MA & Tecante, A. 2015. Chia (*Salvia hispanica*): A review of Native Mexican and functional properties. J. Advances in Food and Nutrition Research. 75: 53-71.
- Vargas, J; Linares, A & Quispe, M. 2010. Efecto de la radiación gamma sobre las características microbiológicas, fisicoquímicas y evaluación sensorial en pimienta negra molida (*Piper nigrum*). Rev. Del Encuentro Científico Internacional 7 (1): 4p.
- Vargas, J. 2010. Aplicaciones de la tecnología de irradiación en el espárrago peruano. Revista del Encuentro Científico Internacional 7 (2): 6p.
- Velázquez-Zavala, M; Peón-Escalante, I E; Zepeda-Bautista, R & Jiménez-Arellanes, M A. 2016. Moringa (*Moringa Oleífera Lam.*): Usos potenciales en la agricultura, industria y medicina. Revista Chapingo. Serie horticultura 22(2): 95-116. <https://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2015.07.018>
- Vidal, C & Veciana, T. 2012. Alimentos enriquecidos y complementos alimenticios. Manual práctico de nutrición y salud. Madrid, España, Kellogg España.131-151
- Villanueva C. 2007. La tara Oro Verde de los Incas. 1<sup>era</sup>. Lima, Peru, AGRUM. 163p.

- Wang, L; Chen, X & Wu, A. 2016. Mini Review on Antimicrobial Activity and Bioactive Compounds of *Moringa oleifera*. *Med Chem (Los Angeles)* 6: 578-582. doi:10.4172/2161-0444.1000402.
- Woodroof, J. 2012. *Commercial Fruit Processing*. New York, USA, Springer Science & Business Media. 678p.
- Worobo, R.W & Splittstoesser, D.F. 2005. *Microbiology of fruit products. Processing Fruits*. USA, CRC Press. 261- 284.
- Xingú, A; González, A; De La Cruz, E; Sangerman-Jarquín, Ma; Orozco De Rosas, G & Rubí, M. 2017. Chía (*Salvia hispánica L.*) situación actual y tendencias futuras. *Rev. Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8(7): 1619-1631.
- Yamazaki, K; Teduka, H & Shinano, H. 1996. Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from acidic beverages. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60 (3): 543-545.
- Yetunde, E. A; & Comfort U. S. 2015. Antimicrobial Activity of *Moringa oleifera* Leaf against Isolates of Beef Offal. *British Microbiology Research Journal* 9(2): 1-7.
- Yuan, Y & Baduge, S. 2018. The Contribution of Phytochemicals to the Antioxidant Potential of Fruit Juices. In *Fruit Juices*. Ireland, Academic Press. 95-128.
- Walker & Phillips CA. 2008. *Alicyclobacillus acidoterrestris*: an increasing thret to the fruit juice industry. *International Journal of food science and technology* 43(2): 205-260.
- Zarate, M. 2015. Efecto in vitro antibacteriano del extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* “Tara” sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* aisladas de pacientes del Hospital Regional Docente de Trujillo. *Revista Pueblo cont.* 26 (1): 9p.
- Zhu, F. 2018. Effect of ozone treatment on the quality of grain products. *Food Chemistry*, 264: 358–366. doi:10.1016/j.foodchem.2018.05.047.
- Zott, K; Claisse, O; Lucas, P; Coulon, J; Lonvaud-Funel, A & Masneuf-Pomarede, I. 2010. Characterization of the yeast ecosystem in grape must and wine using real-time PCR. *Food Microbiology* 27(5): 559–567. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.01.006>

## VIII. ANEXOS

### Anexo 1. Ficha de evaluación sensorial

TEST DE ACEPTABILIDAD		
Edad: _____	Sexo: <input type="checkbox"/> Hombre <input type="checkbox"/> Mujer	Sabor: _____
Frente a usted tiene una muestra (bebida) y se le pide por favor, marcar <u>con</u> una raya vertical sobre la línea principal:		
1. Sabor a fruta característico		
0		10
2. Dulzor		
0		10
3. Color a fruta característico		
0		10
4. Textura (consistencia o espesura)		
0		10
5. Aceptabilidad general		
0		10
Comentarios: _____		
_____		
_____		
Muchas gracias!		

## Anexo 2. Formulación de las tres bebidas

### Formulación de la bebida de maracuyá con chía

Ingredientes	Composición (%)		
	F 0,5	F 0,7	F 1,6
Pulpa de Maracuyá 10 Brix	13.11	13.11	13.11
Chía	1.66	1.66	1.66
Estevia	0.10	0.10	0.10
Goma Xantan	0.08	0.08	0.08
CMC	0.08	0.08	0.08
Extracto	0.50	0.70	1.66
Agua	84.47	84.27	83.31

### Formulación de la bebida de fresa con chía

Ingredientes	Composición (%)		
	F 0,5	F 0,7	F 1,6
Pulpa de Fresa 7 Brix	17.49	17.49	17.49
Chía	1.59	1.59	1.59
Estevia	0.05	0.05	0.05
Goma Xantan	0.07	0.07	0.07
CMC	0.07	0.07	0.07
Extracto	0.50	0.70	1.59
Esencia de Fresa	0.03	0.03	0.03
Color (Carmín)	0.03	0.03	0.03
Ac. Cítrico	0.26	0.26	0.26
Agua	79.92	79.72	78.82

### Formulación de la bebida de arándano con chía

Ingredientes	Composición (%)		
	F 0,5	F 0,7	F 1,6
Pulpa de Arándano 10 Brix	10.75	10.75	10.75
Concentrado 65 Brix	0.62	0.62	0.62
Chía	1.62	1.62	1.62
Estevia	0.08	0.08	0.08
Goma Xantan	0.08	0.08	0.08
CMC	0.08	0.08	0.08
Extracto	0.50	0.70	1.62
Esencia Blueberry	0.32	0.32	0.32
Ac. Cítrico	0.27	0.27	0.27
Agua	85.68	85.48	84.56

### Anexo 3. Prueba estadística de irradiación

La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>Mesófilo</b>	147,00	0,00
<b>Hongo</b>	1448,73	0,00
<b>Esporulados</b>	2845,92	0,00

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de mesófilo, hongo y esporulados entre un nivel de Tratamiento y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

#### Pruebas de Múltiple Rangos para Mesófilo por Tratamiento

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
10	3	9,0	X
4	3	9,0	X
7	3	9,0	X
0	3	16,0	X

#### Pruebas de Múltiple Rangos para Hongo por Tratamiento

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
10	3	99,0	X
4	3	99,0	X
7	3	99,0	X
0	3	33666,7	X

#### Pruebas de Múltiple Rangos para Esporulados por Tratamiento

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
10	3	1,0	X
4	3	1,0	X
7	3	1,0	X
0	3	155,0	X

#### Anexo 4. Prueba estadística de ozono

La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>Mesófilo</b>	147,00	0,00
<b>Hongo</b>	1448,73	0,00
<b>Esporulados</b>	2157,34	0,00

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de mesófilo, hongo y esporulados entre un nivel de Tratamiento y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

##### Pruebas de Múltiple Rangos para Mesófilo por Tratamiento

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
10	3	9,0	X
4	3	9,0	X
7	3	9,0	X
0	3	16,0	X

##### Pruebas de Múltiple Rangos para Hongo por Tratamiento

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
10	3	99,0	X
4	3	99,0	X
7	3	99,0	X
0	3	33666,7	X

##### Pruebas de Múltiple Rangos para Esporulados por Tratamiento

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
100	3	1,0	X
60	3	1,0	X
30	3	144,0	X
0	3	155,0	X

## Anexo 5. Prueba estadística de estabilidad de bebidas

La prueba-F en la tabla ANOVA determinará si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>Mesófilo</b>	9333,89	0,00
<b>Hongo</b>	228,57	0,00

Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de mesófilo, hongo y esporulados entre un nivel de Tratamiento y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

### Pruebas de Múltiple Rangos para Mesófilo por Tratamiento

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
T05	3	9,0	X
A1	3	9,0	X
A05	3	9,0	X
A025	3	9,0	X
T025	3	94,3333	X
C	3	143,333	X

### Pruebas de Múltiple Rangos para Hongo por Tratamiento

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
A025	3	1,0	X
A1	3	1,0	X
A05	3	1,0	X
T025	3	1,0	X
T05	3	1,0	X
C	3	14,3333	X

## Anexo 6. Prueba estadística de almacenamiento de tres bebidas último día

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de varios factores para último Día. Realiza varias pruebas y gráficas para determinar qué factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el último Día. También evalúa la significancia de las interacciones entre los factores, si es que hay suficientes datos. Las pruebas-F en la tabla ANOVA le permitirán identificar los factores significativos. Para cada factor significativo, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuáles medias son significativamente diferentes de otras.

### Análisis de Varianza para Último Día - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Pulpa	3,2932E6	2	1,6466E6	16,34	0,0002
B: Concentración	1,79488E6	1	1,79488E6	17,81	0,0009
RESIDUOS	1,41098E6	14	100784,		
TOTAL (CORREGIDO)	6,49906E6	17			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre último Día con un 95,0% de nivel de confianza.

### Pruebas de Múltiple Rangos para Último Día por Pulpa

Método: 95,0 porcentaje LSD

Pulpa	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
Arándano	6	214,167	129,605	x
Maracuyá	6	629,333	129,605	x
Fresa	6	1254,83	129,605	x

### Pruebas de Múltiple Rangos para Último Día por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0,7	9	383,667	105,822	x
0,5	9	1015,22	105,822	x

## Anexo 7. Prueba estadística de almacenamiento de tres bebidas penúltimo día

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de varios factores para Penúltimo Día. Realiza varias pruebas y gráficas para determinar qué factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el Penúltimo Día. También evalúa la significancia de las interacciones entre los factores, si es que hay suficientes datos. Las pruebas-F en la tabla ANOVA le permitirán identificar los factores significativos. Para cada factor significativo, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuales medias son significativamente diferentes de otras.

### Análisis de Varianza para Penúltimo Día - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:B.Concentracion	1605,56	1	1605,56	144,60	0,0000
B:B.Pulpa	1681,0	2	840,5	75,70	0,0000
RESIDUOS	155,444	14	11,1032		
TOTAL (CORREGIDO)	3442,0	17			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Penúltimo Día con un 95,0% de nivel de confianza.

### Pruebas de Múltiple Rangos para Penúltimo Día por B.Pulpa

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>B. Pulpa</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Arándano	6	65,0	1,36034	X
Maracuyá	6	85,5	1,36034	X
Fresa	6	85,5	1,36034	X

### Pruebas de Múltiple Rangos para Penúltimo Día por B. Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>B. Concentración</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
0,7	9	69,2222	1,11071	X
0,5	9	88,1111	1,11071	X

## Anexo 8. Prueba estadística de aceptabilidad de tres bebidas

Este procedimiento ejecuta un análisis de varianza de varios factores para Aceptabilidad. Realiza varias pruebas y gráficas para determinar qué factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la Aceptabilidad. También evalúa la significancia de las interacciones entre los factores, si es que hay suficientes datos. Las pruebas-F en la tabla ANOVA le permitirán identificar los factores significativos. Para cada factor significativo, las Pruebas de Rangos Múltiples le dirán cuales medias son significativamente diferentes de otras.

### Análisis de Varianza para Aceptabilidad - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Concetracion	2,56889	1	2,56889	52,55	0,0000
B:Pulpa	0,163333	2	0,0816667	1,67	0,2291
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	0,541111	2	0,270556	5,53	0,0198
RESIDUOS	0,586667	12	0,0488889		
TOTAL (CORREGIDO)	3,86	17			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Aceptabilidad con un 95,0% de nivel de confianza.

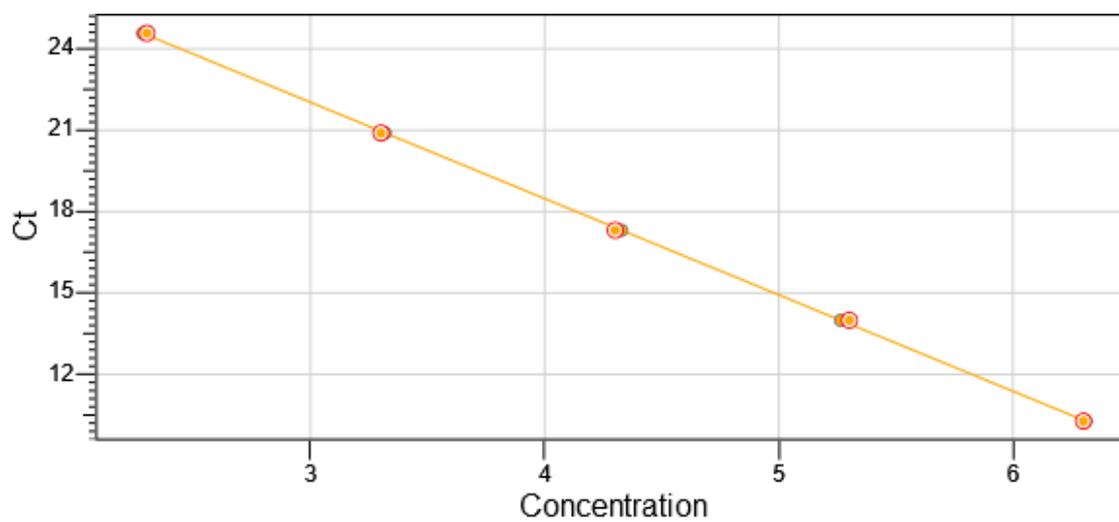
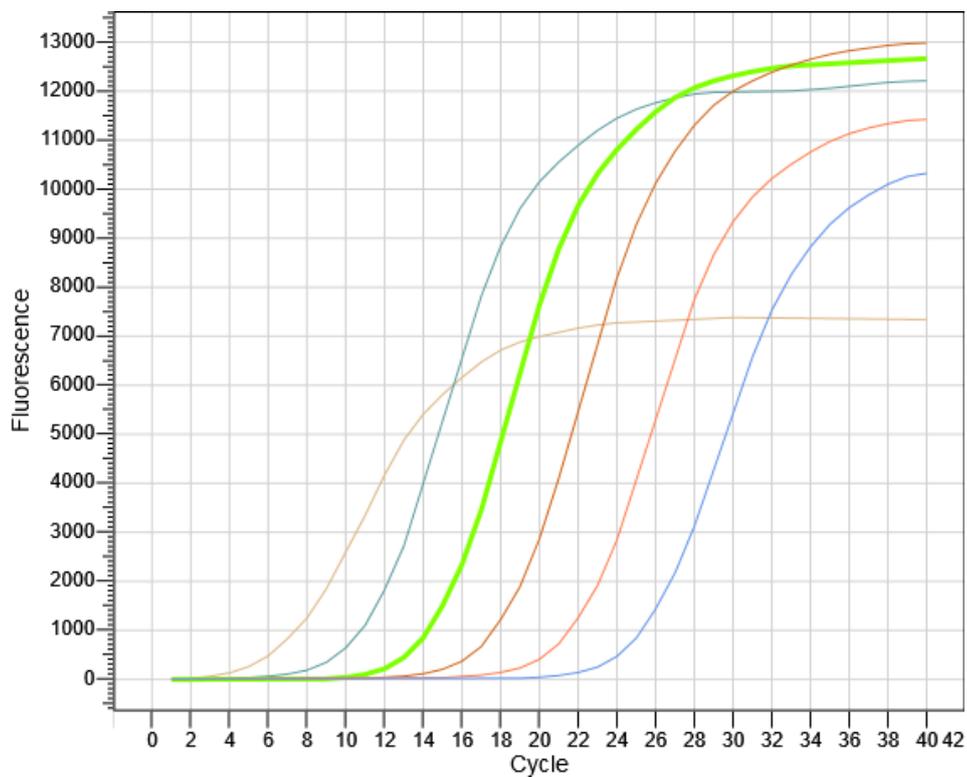
### Pruebas de Múltiple Rangos para Aceptabilidad por Concentración

Método: 95,0 porcentaje LSD

Concentración	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0,5	9	6,75556	0,0737028	x
1,6	9	7,51111	0,0737028	x

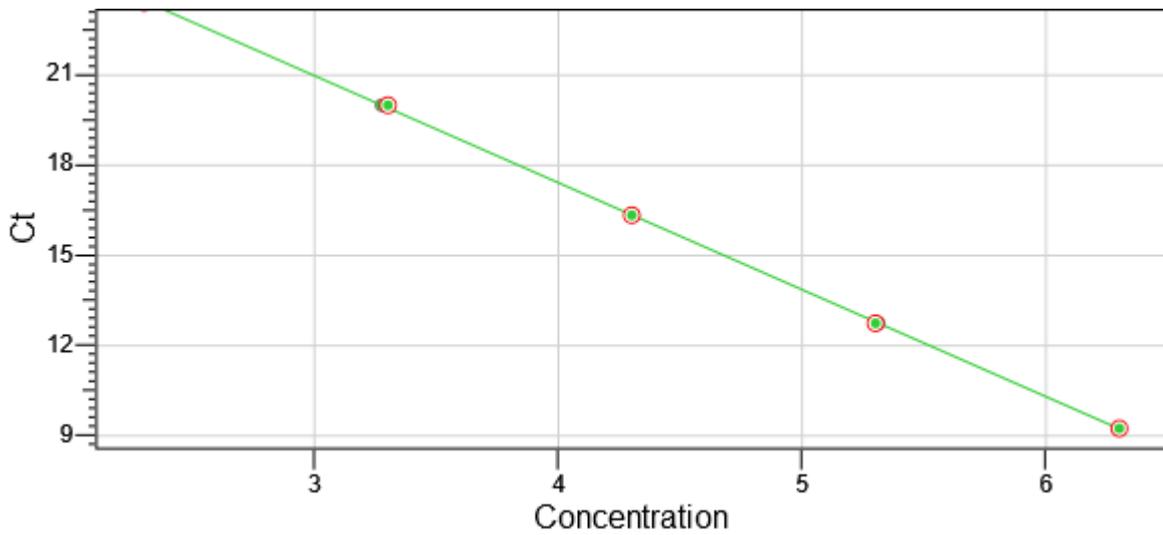
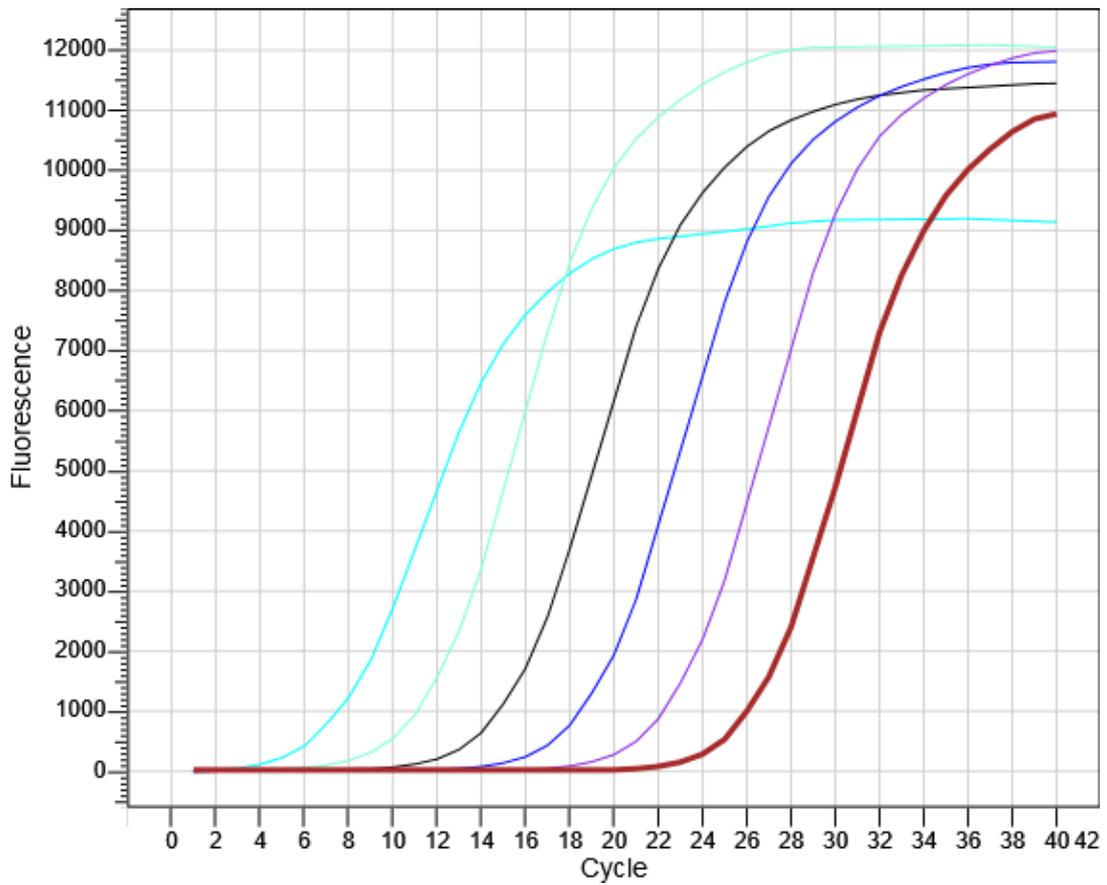
## Anexo 9. Curva estándar de cebadores

### Curva Estándar del cebador *Saccharomyces spp*



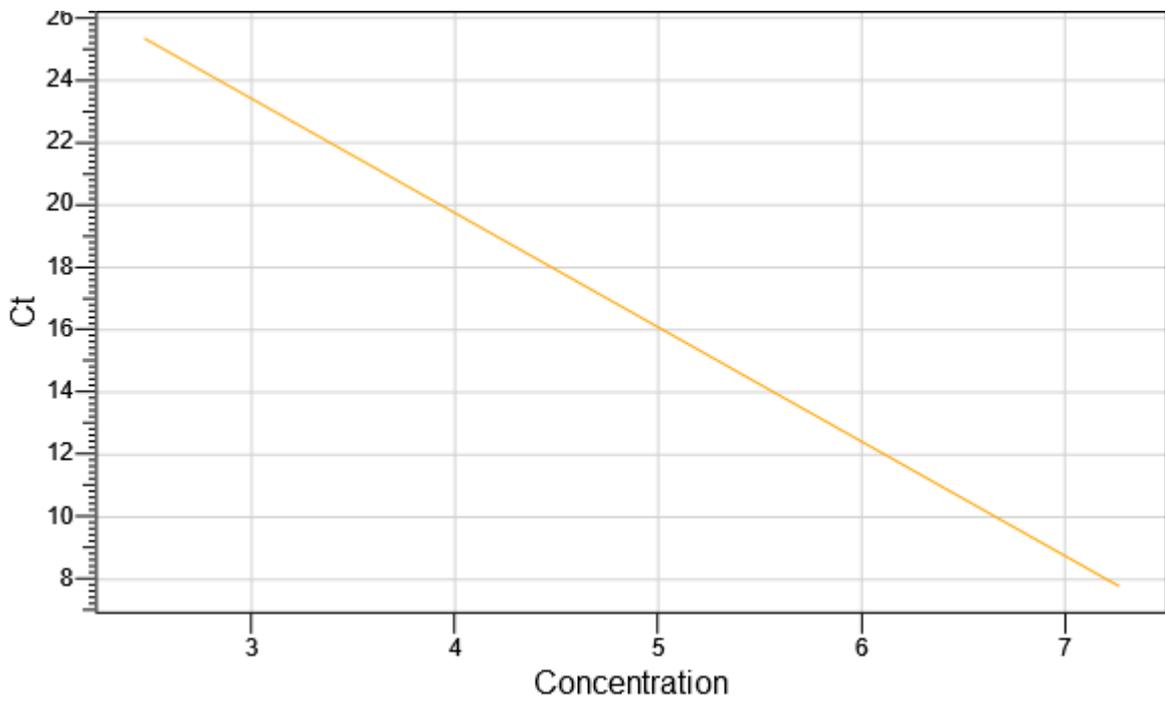
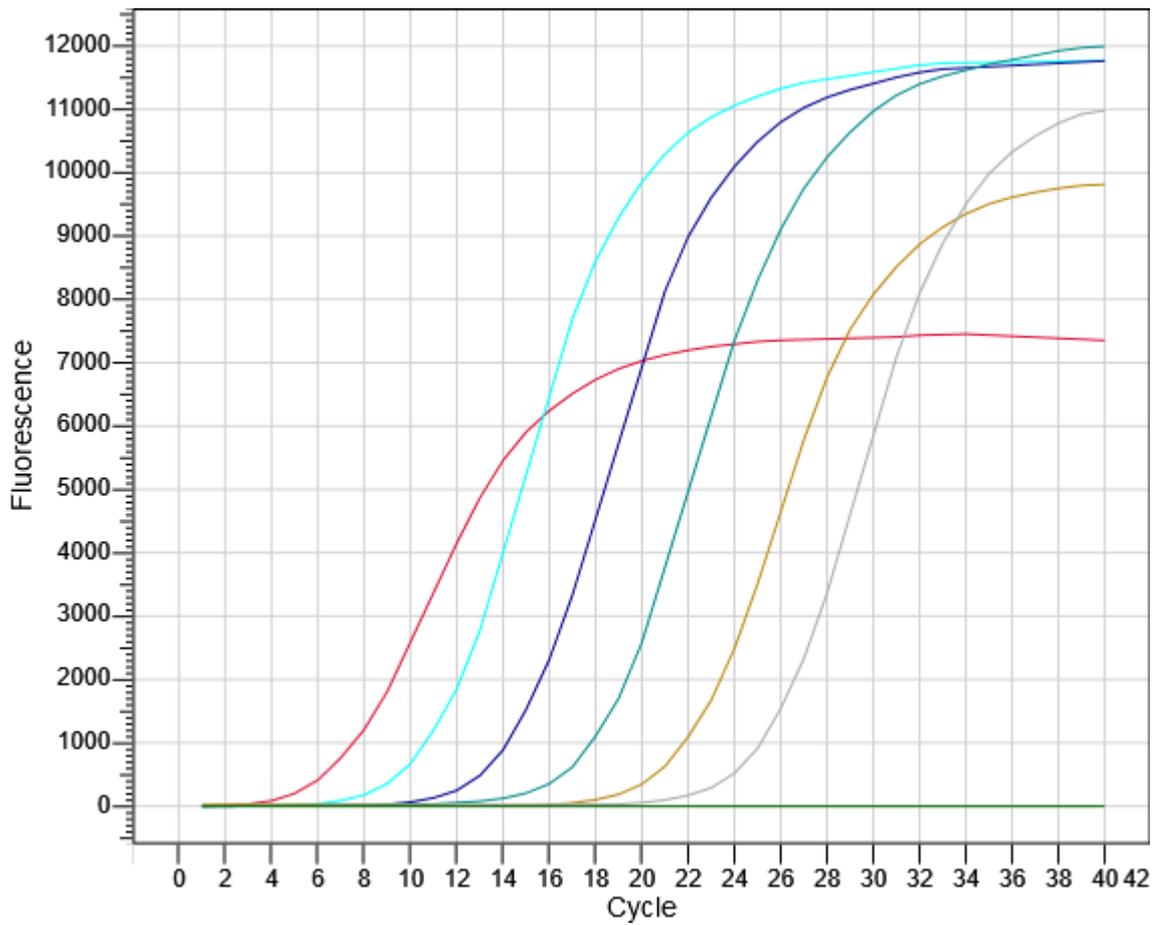
Intercepto: 32,67    Pendiente: -3,55    Correlación: 1,00    Eficiencia: 91,38    Error: 0,005

### Curva Estándar del cebador *Sacchromyces cerevisiae*



Intercepto: 31,65    Pendiente: -3,56    Correlación: 1,00    Eficiencia: 91,03    Error: 0,003

**Curva Estándar del cebador *Lactobacillus spp***



Intercepto: 34,4    Pendiente: -3,66    Correlación: 1,00    Eficiencia: 87,52    Error: 0,007