

Trabajos

Inoculación de néctares frutales con esporos de *Bacillus*. Alteración y riesgo alimentario

RECIBIDO: 29/6/06

ACEPTADO: 14/9/06

Benzo, M.T.¹ • Vaccari, M.C.¹ • Belluzzo, S.¹ • Sanchis, J.C.² • Iacona, V.A.¹

1. Cátedra de Microbiología General.

2. Cátedra de Química General.

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Ciudad Universitaria. Paraje "El Pozo". S3000ZAA Santa Fe. Argentina.

Correspondencia: e-mail: mtbenzo@fbc.unl.edu.ar

Trabajo desarrollado en el marco del Programa CAID/2000, Proyecto 12B/144 de la Universidad Nacional del Litoral. Parte de este trabajo fue presentado en el XVII Congreso Latinoamericano de Microbiología - Bs. As. 17-21/10/04.

RESUMEN: Se inocularon néctares de naranja y multifructal con esporos del género *Bacillus* a fin de estudiar su crecimiento y la variación de los parámetros fisicoquímicos en el tiempo (30 días). Se evaluó la estabilidad microbiológica del producto dentro del período de vida útil, simulando las condiciones de almacenamiento en las que se encuentra en el mercado.

Las especies inoculadas fueron: *Bacillus subtilis* 70M, *B. megaterium* 78M, *B. pumilus* 112M, *B. licheniformis* 61M, y *B. cereus* 125M, aisladas e identificadas de jugos de naranja concentrados congelados (JNCC), y *B. coagulans* 19R aislado de leche.

El crecimiento resultó nulo para *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* y *B. coagulans*. *B. licheniformis* mostró un leve descenso del inóculo inicial, mientras que *B.*

cereus mostró una tendencia al crecimiento. Los parámetros fisicoquímicos no mostraron variaciones significativas para ninguno de los microorganismos estudiados, hasta los 30 días de almacenamiento.

Si bien el producto se podría considerar microbiológicamente estable dentro del período estudiado, la leve tendencia al crecimiento de *B. cereus* podría poner en riesgo la estabilidad del producto, así como su inocuidad dentro del período de vida útil, ya que este microorganismo es un agente productor de enfermedades de transmisión alimentaria.

PALABRAS CLAVE: inoculación, néctares frutales, esporos de *Bacillus*, crecimiento, estabilidad microbiológica.

SUMMARY: *Inoculation of fruit nectars with Bacillus spores. Food change and risk* Benzzo, M.T.; Vaccari, M. C. ; Belluzzo, S ; Sanchis, J.C. ; Iacona, V. A.

Orange and other fruit nectars were inoculated with spores of the genus *Bacillus* for 30 days in order to study their growth and parameter variability with time. The microbiological stability of the product within its shelf-life was evaluated, simulating the market storage conditions. The species inoculated were *Bacillus subtilis* 70M, *B. megaterium* 78M, *B. pumilus* 112M, *B. licheniformis* 61M, and *B. cereus* 125M, isolated and identified from frozen concentrated orange juice (JNCC), and *B.*

coagulans 19R, isolated from milk. No growth was detected for *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* and *B. coagulans*, whereas *B. licheniformis* showed a slight decrease of the initial inoculum and *B. cereus* a trend to increase. None of the microorganisms under study showed significant variations in their physicochemical parameters within the 30 days considered. Although the product could be considered microbiologically stable during that period, both product stability and innocuousness could be risked by the trend of *B. cereus* to grow, since this microorganism is a foodborne disease agent.

KEY WORDS: inoculation, fruit nectars, *Bacillus* spores, growth, microbiological stability.

Introducción

La industria juguera Argentina emplea, casi exclusivamente, jugos concentrados en la elaboración de néctares (1). La estabilidad microbiológica de los jugos concentrados frente al jugo exprimido justifica su elección como materia prima para la producción de los néctares.

El Codex Alimentarius define como néctar al "producto pulposo o no pulposo, sin fermentar, pero fermentable, destinado al consumo directo, obtenido mezclando el jugo (zumo) de fruta, concentrado o sin concentrar, con agua, azúcar o miel, y conservado por medios físicos exclusivamente. Este producto debe contener, como mínimo, el 50% de ingredientes de la fruta de concentración natural o el equivalente derivado de un ingrediente de fruta concentrado, salvo cuando por su elevada acidez, contenido de pulpa o sabor fuerte sea necesario un contenido menor. En cuanto al contenido de sólidos solubles, el producto no deberá superar el 20% (determinado con

refractómetro a 20°C), sin corregirlo por la acidez, y expresado en grados Brix en las Escalas Internacionales de sacarosa. El producto, además, deberá tener el color, aroma y sabor característicos de la fruta con la que se ha elaborado" (2).

El obstáculo principal en la preservación de los néctares radica en su composición química. Por otra parte, las barreras fisicoquímicas logradas en los jugos concentrados desaparecen tras la dilución, transformándose en un caldo de cultivo sumamente apropiado para los microorganismos tanto alterantes como patógenos (3,4-6). Estos microorganismos pueden llegar a los néctares no sólo con la materia prima (jugo concentrado) sino también durante las distintas etapas que involucra su elaboración.

La producción de néctares a partir de jugos concentrados se puede dividir en tres etapas básicas (7,8):

1. Reconstitución del jugo: se bombea el jugo concentrado a tanques de disolución, pasando luego a un sistema de dosificación, el cual toma las proporciones correctas de agua, concentrado y aditivos permitidos de acuerdo a la legislación vigente. Posteriormente, un mezclador homogeniza el producto así constituido.

2. Tratamiento térmico: consiste en una pasteurización rápida y continua del jugo a temperatura entre 72°C y 96°C, según el tipo de néctar, durante 40 segundos.

3. Envasado: el néctar pasteurizado llega a través de un tubo de acero inoxidable al envase, donde el equipo realiza el cierre por debajo del nivel del producto, quedando así el recipiente completamente lleno. El envase es un complejo multicapa formado por una base de cartón y una fina capa adicional de aluminio, la cual constituye una barrera más a la entrada de oxígeno atmosférico y a la pérdida de componentes aromáticos propios del producto.

El envasado aséptico resulta de vital importancia y se logra mediante la esterilización química tanto del material del envase como del circuito cerrado en el cual se realiza el proceso. Para ello se utiliza peróxido de hidrógeno al 35% en caliente. En estas condiciones resulta un agente esterilizante, siendo el más utilizado actualmente en los sistemas de envasado aséptico. Este tratamiento permite reducir la carga microbiana residual hasta cuatro ciclos logarítmicos.

No obstante, las bacterias esporuladas termoacidófilas pueden sobrevivir en el producto (7,9-11). La termoresistencia característica de los esporos de estas bacterias permite que al superar el proceso térmico germinen si las condiciones ambientales se tornan favorables. Esta situación podría tener lugar ya que al reconstituir los jugos concentrados para la preparación de los néctares la actividad acuosa (a_w) y el oxígeno disuelto aumentan, mientras que la concentración de azúcar y la viscosidad disminuyen (6,10).

Las bacterias esporuladas que pueden aislarse de los jugos pertenecen a los géneros *Bacillus* y *Alicyclobacillus*. Las especies de estos géneros pueden perjudicar a la industria juguera tanto a nivel económico como sanitario. Así, el deterioro del producto es uno de los mayores problemas asociados a la presencia de este grupo de bacterias, mientras que ciertas especies de *Bacillus*, como *Bacillus cereus*, son causantes de enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs). Es importante recalcar que los efectos causados por estas bacterias se deben a la producción de toxinas, que posteriormente se ingieren con los alimentos, provocando intoxicaciones alimentarias. Estas intoxicaciones se caracterizan por diarrea, náuseas, vómitos y, en ciertas ocasiones, espasmos musculares dolorosos, que no pasan de ser una molestia y no resultan letales para las personas adultas.

Algunos ejemplos de especies de *Bacillus* más frecuentemente aisladas de jugos de frutas son (12-14): *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*.

El género *Alicyclobacillus* se ha aislado en el 14,7 % de los jugos de fruta (15).

Por lo anteriormente expuesto resulta de suma importancia reducir el número de esporas en la materia prima utilizada, puesto que esto influye directamente en la eficiencia del proceso térmico al cual es sometido el néctar. Una mayor carga inicial de esporas exigirá, inevitablemente, mayor tiempo de tratamiento térmico a una determinada temperatura para lograr la misma reducción de esporas que si se partiera de una carga inicial baja. Esto significaría una reducción de la calidad nutritiva del producto, especialmente en lo que respecta a su contenido en vitaminas.

Es bien conocido en el mercado el liderazgo de los productos a base de jugos de fruta y, en especial, de los néctares, los cuales tienen elevada aceptación entre los niños. Además de

las características organolépticas propias de los néctares, éstos aportan hidratos de carbono, minerales, vitaminas y, en menor proporción, proteínas (16, 17).

El objetivo del presente trabajo fue:

- Inocular experimentalmente néctares con esporos de bacterias del género *Bacillus* aisladas de jugos de naranja concentrados congelados (JNCC) sin conservantes y estudiar, posteriormente, su crecimiento y la posible variación de los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos.

- Comprobar la estabilidad microbiológica de los néctares dentro de su período de vida útil y bajo las condiciones de almacenamiento en las que habitualmente se encuentran en las bocas de expendio.

Materiales y métodos

Procedencia de los néctares

Se utilizaron néctares de naranja (preparado a base de jugo concentrado de naranja) y multifrutal (preparado a base de pulpa de banana, pulpa concentrada de durazno, jugo concentrado de naranja y jugo concentrado de ananá) envasados en tetrapack de 125 mL de capacidad y de origen nacional. Todos los néctares estudiados pertenecían al mismo lote, con un período de aptitud superior al año a partir de la fecha de envasado.

La ausencia de benzoato de sodio y sorbato de potasio (conservantes permitidos) se determinó utilizando el método espectrofotométrico de Cuantificación Multivariada PLS-1 (Partial Least Squares) (18). Se empleó a tal fin un espectrofotómetro UV (Lambda 20, Perkin-Elmer), con una sensibilidad de $2.4 \cdot 10^3$ g/L y un error porcentual de 1.55%.

Selección de las cepas

Se utilizaron 5 especies diferentes de *Bacillus* aisladas de JNCC e identificadas por este mismo grupo de trabajo en estudios preliminares. Estas cepas fueron: *Bacillus subtilis* 70M, *B. licheniformis* 61M, *B. megaterium* 78M, *B. pumilus* 112M y *B. cereus* 125M. Además se ensayó una sexta cepa (*Bacillus coagulans* 19R) proporcionada por el Instituto de Lactología, Facultad de Ingeniería Química, UNL.

Reactivación y cosecha de esporos

La cosecha de esporos se realizó a partir de las cepas conservadas en sílica gel siguiendo la metodología descrita en trabajos anteriores (19). La concentración de esporos obtenida varió entre 10^7 - 10^{10} UFC.mL⁻¹. Los esporos se conservaron en agua destilada a 4°C por no más de 30 días.

Preparación del inóculo

El volumen de la suspensión de esporos inoculado en cada tetrapack fue de 10^3 - 10^4 UFC.mL⁻¹. En ninguno de los casos el volumen inoculado superó los 0,5 mL, a fin de no provocar una dilución de los néctares estudiados.

Procedimiento de inoculación

La inoculación de los néctares se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito a continuación:

1. Desinfección de los envases tetrapack con ácido peracético al 0.1% y etanol/isopropanol/agua en proporción 30:30:40. El tiempo de contacto en cada caso fue de dos minutos.

2. Enjuague con agua destilada estéril.

3. Inoculación de 0.5 mL de la suspensión de esporos (inóculo) con jeringa estéril (1,00 mL de capacidad, Coronet). La inoculación se

realizó con el envase en posición horizontal, sobre el centro del mismo.

4. Cobertura inmediata del sitio de inoculación con cinta estéril (Parafilm "M").

5. Refuerzo de la cobertura con cinta adhesiva de mayor fijación.

6. Homogenización del inóculo dentro del envase, por agitación manual.

7. Incubación del envase, en posición horizontal, en estufa a 30°C.

Este protocolo se repitió para la inoculación de cada una de las 6 cepas en los dos tipos de néctares seleccionados, y para todos los tiempos de incubación ensayados. Se procesó un control (t_0) sin inocular.

Las muestras inoculadas fueron almacenadas a 30°C.

Estudio de la evolución del crecimiento

La evolución del crecimiento en las distintas combinaciones tipo de microorganismo - tipo de néctar, se estudió a través del análisis de los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos a diferentes tiempos de incubación:

t_{0h} , t_{8h} , t_{24h} , t_{32h} , t_{48h} y t_{30d}

La toma a t_0 se realizó para obtener el valor de la concentración de esporos al inicio del crecimiento. Además, sobre el tetrapack sin inocular (control- t_0) se realizaron los mismos ensayos fisicoquímicos y microbiológicos que en las demás muestras, a fin de conocer las características propias del néctar, así como verificar la ausencia de contaminación microbiana.

Al tiempo indicado para cada muestra, se trasvasó el contenido del tetrapak a un erlenmeyer de 250 mL estéril. Luego de un minuto de agitación manual, a fin de lograr la homogeneidad del néctar, se realizaron los análisis correspondientes.

Parámetros microbiológicos

Se realizaron recuentos microbiológicos utilizando agua de peptona al 0.1% como diluyente y Agar Soya Trypticase con 0.1% de almidón como medio de desarrollo, y se incubó a 30°C durante 48 h (18).

Parámetros fisicoquímicos

Sobre cada muestra se determinaron sólidos solubles, pH, acidez total y nitrógeno amínico. Además se calculó el valor del Ratio.

- Sólidos Solubles: se determinaron midiendo el índice de refracción a 20°C, utilizando un refractómetro de Abbé (20). Los resultados se expresaron en grados Brix.

- pH: se determinó por potenciometría directa, mediante el empleo de un peachímetro digital (Altronix Saen) (20).

- Acidez total: se realizó siguiendo el método de la determinación de la acidez total para jugos y néctares de fruta (Norma IRAM 15.735) (21). Los resultados se expresaron como gramos de ácido cítrico por ciento (P/V).

- Nitrógeno de aminoácidos (Índice de formol): se realizó siguiendo el método de Sorensen para jugos y néctares de fruta (Norma IRAM 15.716) (22). Los resultados se expresaron como miligramos de nitrógeno por ciento.

- Ratio: parámetro determinado como la relación entre el contenido de sólidos solubles y acidez titulable (sólidos solubles/acidez titulable).

Análisis estadístico

Las comparaciones se realizaron mediante el análisis paramétrico de la variancia (ANOVA) con medidas repetidas (MR) a fin de estudiar el efecto de uno o más factores cuando al menos uno de ellos es un factor intra-sujetos, que en este estudio es el tiempo (23, 24).

Para cada nivel del factor y su posible relación con el tiempo, se realizaron pruebas asociadas a un análisis de regresión lineal: valor del estadístico de correlación muestral de Pearson y análisis de significancia de la pendiente de la recta (25).

Posteriormente, al comparar las variables transformadas a logaritmo para los dos instantes de tiempo final de seguimiento del experimento, se utilizó la prueba U de Mann Whitney (no paramétrica), ya que el tamaño de la muestra era inferior a 10 (26).

Todos los cálculos estadísticos se realizaron mediante el programa SPSS versión 10.0 para Windows. En todos los casos se consideró como significativa cualquier probabilidad $(P) \leq 0.05$.

Resultados y discusión

En ninguna de las muestras de néctares de naranja y multifructal estudiadas se halló la presencia de los conservantes benzoato de potasio y sorbato de sodio. En cada una de ellas se comprobó la ausencia de microorganismos previo a la inoculación de esporos ($t_c = 0$).

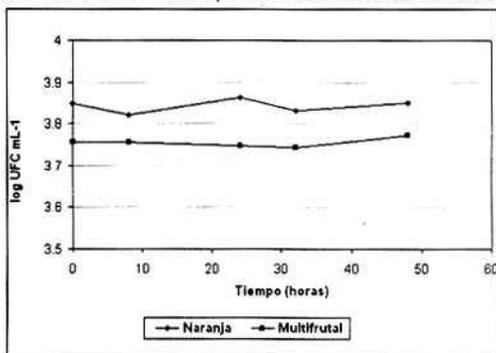
Recuentos microbiológicos

Se realizó un análisis comparativo de los recuentos microbianos para cada uno de los tiempos estudiados (t_{0h} , t_{2h} , t_{24h} , t_{32h} , t_{48h}), a fin de establecer la existencia de algún tipo de variación en el tiempo. Se aplicó para ello un análisis de la variancia (ANOVA) con medidas repetidas considerando, además del crecimiento de los microorganismos, otro factor adicional de selección: *tipo de néctar y microorganismo inoculado*.

En la Figura 1 se representa el valor promedio de los recuentos microbiológicos de las 6 cepas de bacterias esporuladas considerando sólo el factor tipo de néctar, hasta las 48

horas. Se puede observar que el crecimiento no fue significativo hasta las 48 horas post-inoculación, dado que los valores de los recuentos microbianos para cada uno de los tiempos estudiados no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0,507$).

Figura 1: Crecimiento de las bacterias esporuladas considerando el factor tipo de néctar hasta las 48 horas.



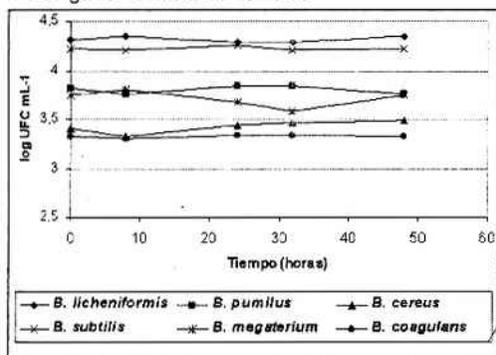
Teniendo en cuenta que los microorganismos inoculados son de desarrollo rápido, la inhibición del crecimiento se debería principalmente a la reducida tensión de oxígeno en el envase aséptico y al estrés ácido generado por el pH del producto. Estas limitaciones estarían impidiendo la germinación de los esporos en los néctares inoculados.

Sin embargo, otros estudios (27, 28) demostraron que cepas de *Bacillus cereus* sometidas previamente a bajos niveles de acidez son capaces de sobrevivir posteriormente a un estrés ácido mayor, debido a la generación de una respuesta tolerante a dichas condiciones. Esta tolerancia también se desarrolló a partir de la exposición a niveles no letales de otros tratamientos tales como calor, peróxido de hidrógeno, cloruro de sodio y sal.

En la Figura 2 se observa la evolución del inóculo en el tiempo, para cada tipo de microorganismo (factor adicional: tipo de microorganismo) hasta las 48 horas de incubación.

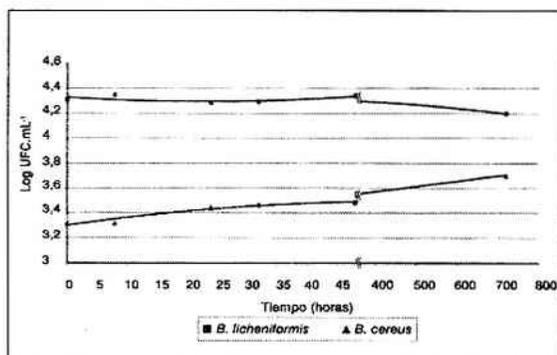
Cada punto representa el valor promedio de los recuentos microbiológicos de cada una de las cepas en ambos tipos de néctares. Nuevamente la ausencia de crecimiento se confirmó a través de los resultados los cuales no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P = 0,269$).

Figura 2: Evolución del crecimiento de las bacterias esporuladas considerando sólo el factor tipo de microorganismo hasta las 48 horas.



Por otra parte, se estudió el crecimiento de cada cepa hasta los 30 días (720 horas) de incubación a fin de evaluar la estabilidad microbiológica del producto teniendo en cuenta sólo el factor tipo de microorganismo. A través de la prueba U de Mann Whitney se observó ausencia de crecimiento ($P > 0,394$) para cada uno de los microorganismos ensayados a excepción de *B. cereus* ($P = 0,015$) que mostró una leve tendencia a crecer, mientras que el inóculo inicial de *B. licheniformis* disminuyó ($P = 0,026$). En la Figura 3 se puede observar el comportamiento de estos dos últimos inóculos.

Figura 3: Evolución del crecimiento de *B. licheniformis* y *B. cereus* hasta 30 días, independientemente del tipo de néctar.



Con excepción de *Bacillus cereus*, *B. licheniformis* y *B. coagulans*, que son capaces de crecer de manera facultativa, en las tres cepas restantes (*B. subtilis*, *B. megaterium* y *B. pumilus*) la reducida tensión de oxígeno sigue siendo una importante barrera en la inhibición del crecimiento. Como el diseño tecnológico del producto prevé una vida útil de aproximadamente 1 año en el envase aséptico, con el tiempo la ya reducida tensión de oxígeno disminuye aún más en el interior del mismo. Así, siempre que se mantenga la integridad del envase, el potencial redox tiende a valores negativos, lo cual refuerza aún más la barrera.

Parámetros fisicoquímicos

En todas las muestras no se observó hinchamiento de los envases luego del tiempo de estudio.

En la Tabla 1 se observan los valores promedio de cada uno de los parámetros fisicoquímicos discriminados por tipo de néctar y tipo de microorganismo inoculado (factores adicionales) hasta las 48 h de estudio. Comparando estos valores promedio con los valores iniciales (t_0) de los néctares para cada experiencia, ninguno de los parámetros

físicoquímicos estudiados presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$). Estos resultados se corresponden con la ausencia de crecimiento hasta las 48 horas de incubación.

De la misma manera el test de Student realizado entre los valores promedio de los parámetros físicoquímicos hasta las 48 horas y el valor obtenido a los 30 días (720 horas) post-inoculación (tabla 2) no halló diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$). En la tabla 3 puede observarse que el parámetro *nitrógeno de aminoácidos* sufrió modificaciones para algunos de los microorganismos inoculados. Nuevamente se confirmó que la variación entre el valor promedio a las 48 horas y el obtenido a los 30 días (720 horas) post-inoculación no resultó estadísticamente significa-

tiva (test de Student, $P > 0,05$), independientemente del tipo de néctar. Estos resultados permitirían establecer que no hay una relación directa entre los valores obtenidos para este parámetro físicoquímico y los factores adicionales considerados en el presente trabajo (*tipo de néctar; tipo de microorganismo*).

Otros estudios (29, 30) sobre inoculación de néctares con cepas de *Alicyclobacillus*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter* y *Citrobacter* mostraron que el crecimiento no siempre va acompañado de la variación de parámetros físicoquímicos y que, en los casos en que existieron variaciones, éstas eran debidas al tipo de microorganismo inoculado.

Por otra parte, el aspecto general de los néctares inoculados (textura, color, olor) no se modificó durante el tiempo de estudio.

Tabla 1: Promedio y desviación estándar de los parámetros físicoquímicos de néctares frutales inoculados, hasta las 48 h post-inoculación.

Microorganismo inoculado	Tipo de néctar	pH	Sólidos Solubles	Acidez titulable	Ratio	Nitrógeno de aminoácidos
Néctar sin inocular (tc)	Naranja	3.57 ± 0.02	12.6 ± 0.6	0.498 ± 0.011	25.23 ± 1.71	12.9 ± 0.9
	Multifrutal	3.81 ± 0.05	15.4 ± 0.3	0.325 ± 0.020	47.47 ± 2.88	11.2 ± 1.4
B. subtilis 70 M	Naranja	3.58 ± 0.03	12.9 ± 0.1	0.496 ± 0.033	26.12 ± 1.56	12.7 ± 1.0
	Multifrutal	3.82 ± 0.01	15.7 ± 0.1	0.360 ± 0.017	43.24 ± 2.26	12.8 ± 0.4
B. licheniformis 61 M	Naranja	3.53 ± 0.01	12.8 ± 0.1	0.514 ± 0.009	24.84 ± 0.45	12.9 ± 0.5
	Multifrutal	3.84 ± 0.04	15.4 ± 0.2	0.321 ± 0.010	48.10 ± 1.63	11.8 ± 0.3
B. cereus 125 M	Naranja	3.56 ± 0.01	12.9 ± 0.1	0.478 ± 0.010	26.92 ± 0.71	12.5 ± 0.3
	Multifrutal	3.78 ± 0.02	15.6 ± 0.1	0.309 ± 0.008	50.24 ± 2.16	11.4 ± 0.3
B. megaterium 78 M	Naranja	3.60 ± 0.09	11.8 ± 0.5	0.531 ± 0.008	22.22 ± 0.94	11.4 ± 0.4
	Multifrutal	3.81 ± 0.03	15.3 ± 0.1	0.353 ± 0.009	43.48 ± 1.38	12.7 ± 1.0
B. pumilus 112 M	Naranja	3.59 ± 0.01	12.8 ± 0.1	0.494 ± 0.001	25.90 ± 0.60	13.0 ± 0.3
	Multifrutal	3.75 ± 0.01	15.0 ± 0.1	0.307 ± 0.001	48.82 ± 0.92	9.1 ± 0.6
B. coagulans 19 R	Naranja	3.58 ± 0.01	12.6 ± 0.1	0.492 ± 0.001	25.56 ± 0.52	12.9 ± 0.3
	Multifrutal	3.79 ± 0.01	15.0 ± 0.1	0.309 ± 0.001	48.68 ± 0.55	9.5 ± 0.2

Sólidos solubles: Grados Brix; Acidez titulable: g de ácido cítrico % (p/v);

Ratio: Sólidos solubles / Acidez titulable; Nitrógeno de aminoácidos: mg de nitrógeno % (p/v).

Tabla 2: Parámetros fisicoquímicos de los néctares frutales inoculados, a los 30 días (720 horas) post-inoculación.

Microorganismo inoculado	Tipo de néctar	pH	Sólidos Solubles	Acidez titulable	Ratio	Nitrógeno de aminoácidos
B. subtilis 70 M	Naranja	3,55	12,8	0,499	25,7	12,6
	Multifrutal	3,84	15,4	0,343	44,9	13
B. licheniformis 61 M	Naranja	3,52	12,6	0,474	26,6	12,2
	Multifrutal	3,84	14,3	0,379	37,7	13,9
B. cereus 125 M	Naranja	3,52	12,9	0,529	24,4	13,2
	Multifrutal	3,79	15,5	0,341	45,5	12,7
B. megaterium 78 M	Naranja	3,49	12,8	0,476	26,9	11,5
	Multifrutal	3,77	15,1	0,315	47,9	11
B. pumilus 112 M	Naranja	3,61	13	0,489	26,6	13,5
	Multifrutal	3,86	15,1	0,307	49,2	8,5
B. coagulans 19 R	Naranja	3,61	13,2	0,492	26,8	13,2
	Multifrutal	3,8	15,2	0,316	48,1	10,3

Sólidos solubles: Grados Brix; Acidez titulable: g de ácido cítrico % (p/v);

Ratio: Sólidos solubles / Acidez titulable; Nitrógeno de aminoácidos: mg de nitrógeno % (p/v).

Tabla 3: Valores promedio del nitrógeno de aminoácidos (mg de nitrógeno % (p/v)), hasta las 48 horas y valor a los 30 días (720 horas) post-inoculación.

Microorganismo inoculado	Tipo de néctar	Promedio hasta 48 horas	Valor a 720 horas
B. subtilis 70 M	Naranja	12,7 ± 1,0	12,6
	Multifrutal	12,8 ± 0,4	13
B. licheniformis 61 M	Naranja	12,9 ± 0,5	12,2
	Multifrutal	11,8 ± 0,3	13,9
B. cereus 125 M	Naranja	12,5 ± 0,3	13,2
	Multifrutal	11,4 ± 0,3	12,7
B. megaterium 78 M	Naranja	11,4 ± 0,4	11,5
	Multifrutal	12,7 ± 1,0	11
B. pumilus 112 M	Naranja	13,0 ± 0,3	13,5
	Multifrutal	9,1 ± 0,6	8,5
B. coagulans 19 R	Naranja	12,9 ± 0,3	13,2
	Multifrutal	9,5 ± 0,2	10,3

Conclusiones

La escasa modificación de los parámetros físico-químicos y la leve tendencia a crecer de *B. cereus* resultaron insuficientes para alterar el aspecto de los néctares durante el período de estudio. Teniendo en cuenta que el inóculo de esporos realizado fue elevado y que la mayoría de los microorganismos ensayados no desarrollaron, el producto resultaría "estable" y "seguro" desde el punto de vista microbiológico. Por otro lado, la reactivación del inóculo de *B. cereus* obtenida a los 30 días (720 h) podría afectar la estabilidad microbiológica del producto en el término de un año, que es el período promedio de vida útil establecido para los néctares frutales.

El presente estudio refuerza una vez más la importancia de trabajar bajo las Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) y Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (SSOP), ajustando además las variables del proceso a la calidad de la materia prima, a fin de evitar que el producto se contamine con esporas del ambiente. Por otra parte, la barrera principal durante la distribución, almacenamiento y comercialización de los néctares es el envase aséptico. Cualquier defecto del mismo durante el período de vida útil podría alterar las condiciones que hacen a la estabilidad y seguridad del néctar, permitir la germinación y crecimiento de las esporas contaminantes y, consecuentemente, producir una alteración de la calidad o riesgo alimentario.

Agradecimientos

A la Ing. Liliana Contini y al Lic. Mauro Colombini (Departamento de Matemática. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, UNL) por su colaboración en el estudio estadístico y diseño de las gráficas.

Bibliografía

1. Sobrero, S. (2002): "Identificación de mohos en el proceso de elaboración de jugos cítricos concentrados". Tesis de Magister en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Santa Fe, Argentina.
2. Codex Alimentarius. (1992): Norma General para Néctares de Fruta No Regulados por Normas Individuales. Codex Stan 161-1989. 6: 93-95.
3. Iacona, V.A.; Serrano, L.; Sanchis, J.C.; Carughi, I. (2002): Bacterias esporuladas en fruta y jugos de naranja. Revista FABICIB. 6: 89-96.
4. Berry, J.M.; Witter, L.D.; Folinazzo, J.F. (1956): Growth characteristics of spoilage organisms in orange juice. Food Technol. 10: 553-556.
5. Thompson, P.J. (1981): Thermophilic organisms involved in food spoilage: aciduric flat-sour sporeforming aerobes. J. Food Prot. 44(2):154-156.
6. Pascual Anderson, M. (1992): "Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para alimentos y bebidas". Díaz de Santo. Madrid, España. 40: 345-352.
7. Madrid, A.; Cenzano, I.; Vicente, J.M. (1994): "Nuevo Manual de Industrias Alimentarias". Nueva edición ampliada. AMV ediciones-Mundi prensa S.A. Madrid, España. 4: 93-130.
8. El Envasado de Líquidos Alimenticios en Tetra Brik Aseptic (2003): Tetra Pak Iberia S.A., Arganda del Rey, Madrid.
9. Murdock, D.I.; Hatcher, W.S. (1975): Growth of microorganisms in chilled orange juice. Journal of Milk Food Technol. 38: 393-396.
10. Parish, M. (1991): Microbiological concerns in citrus juice processing. Food Technol. 4: 129-132.
11. Vanderzant, C.; Splittstoesser, D.F. (1992): "Compendium of Methods of the Microbiological Examination of Foods". Tercera edición. American Public Health Association, Washington, D.C. 265-456.

12. Jay, J.M. (2000): *Modern Food Microbiology*. 6th Edition. Aspen Publication, Maryland, EEUU.
13. Petterson, B.; Lembcke, F. (1996): *B.sporothermodurans*, a New Species Producing Highly Heat-Resistant Endospores. *International J. Systematic Bacteriology*. 779-764.
14. Brown, K.L. (2000): Control of bacterial spores. *British Medical Bulletin*. 56: 158-171.
15. Uboldi Eiroa M.; Amstalden Junqueira V.; Schmidt F. (1999): *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. *J. Food Protection*, 62, N° 8: 883-886.
16. Salinas, R. (1993): *Alimentos y Nutrición. Bromatología aplicada a la salud*, Segunda edición. Editorial Ateneo. Buenos Aires, Argentina.
17. FAO (1993): *Frutos Cítricos y Elaborados. Estadísticas anuales. Comité de problemas de productos básicos. Grupo Intergubernamental sobre productos cítricos*.
18. Marsili, M.; Sobrero, S.; Goicochea, H. (2003): "Spectrophotometric determination of sorbic and benzoic acids in fruit juice by a net analytic signal-based method with selection of the wavelength range to avoid non modelled-interferences". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 376 N°1 126-133.
19. Di Conza, J.A.; Vaccari, M.C.; Moragues, L.; lacona, V. (1998): "Inhibición de bacterias esporuladas aerobias por frío y sorbato de potasio". *Revista FABICIB*. 2: 9-13
20. Cámara, M.S.; Carughi, I.; Mantovani, V.; Sanchis, J.C. (2000): Base de datos de variables fisicoquímicas en jugo natural de naranja, variedad Valencia Late; zona costa Río Uruguay. Estudio comparativo de cremogenados y concentrados del mismo origen. *Revista FABICIB*. 4: 55-64.
21. Instituto Argentino de Racionalización de Materiales (IRAM) (1968): Norma 15.735: 'Jugos y Néctares de Fruta. Método de determinación de la acidez total'. Bs. As., Argentina.
22. Instituto Argentino de Racionalización de Materiales (IRAM) (1989): Norma 15.716, Parte I: 'Jugos y Néctares de Fruta. Método para la determinación del índice de formol ("nitrógeno amínico") por la técnica de Sorensen'. Bs. As., Argentina.
23. Finney, D.J. (1990): "Repeated measurements: ¿What is measured and what repeated?". *Statistics in medicine*. 9: 639-644.
24. Matthews, J.N.S.; Altaman, D.G.; Campbell, M.G.; Royston, P. (1990): "Analysis of serial measurements in medical research". *British Medical Journal*. 300: 230-235.
25. Canavos, G.C. (1988): *Probabilidad y estadística. Aplicaciones y métodos*. Mc Graw Hill. España.
26. Conover, W.G. (1980): *Practical non parametric statistic*. Segunda edición. Mc Graw Hill. España.
27. Browne, N.; Dowds, B.C.A. (2002): Acid stress in the food pathogen *Bacillus cereus*. *J. Applied Microbiology*. 92: 404-414.
28. Beales, N. (2004): Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH and osmotic stress: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3: 1-20
29. Vicini, E.; Previdi, M.P.; Lusardi, C. (1999): Capacidad de alterazione di Enterobatteri in nettari di frutta. *Industria Conserve*. 74: 3-9.
30. Lusardi, C.; Previdi, M.P.; Colla, F.; Barbieri, G.; Bolzoni, L. (2000): Capacidad da parte di ceppi di *Alicyclobacillus* di alterare succhi e nettari di frutta. *Industria Conserve*. 75: 151-161.