

76
28/11/84



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ANALISIS FISICO, QUIMICO Y BACTERIOLOGICO
DEL CHILATE (BEBIDA REFRESCANTE DEL
ESTADO DE GUERRERO)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

DORA MARIA LOURDES ORTIZ DILLANES

MEXICO, D. .F

1985.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

Pág.

I.	INTRODUCCION Y OBJETIVOS	1
II.	GENERALIDADES	
	1. Constituyentes	
	1.1. Cacao	3
	1.2. Arroz	5
	1.3. Azúcar	9
	1.4. Canela	10
	2. Componentes químicos de los constituyentes	
	2.1. Agua	11
	2.2. Carbohidratos	17
	2.3. Proteínas	19
	2.4. Grasas	22
III.	ANALISIS BACTERIOLOGICO	
	1. Microbiología de Alimentos	25
	2. Metodología	31
	2.1. Muestreo	32
	2.2. Preparación de la muestra	32
	2.3. Material y equipo	33
	2.4. Medios de cultivo	34
	2.5. Recuento de bacterias mesofílicas aerobias	42
	2.6. Recuento de Organismos Coliformes	43
	2.7. Investigación de Salmonella	44

IV. ANALISIS FISICOS Y QUIMICOS	
1. pH	48
2. Densidad	49
3. °Brix	50
4. Acidez	51
5. Protefnas	52
6. Grasas	54
7. Sólidos	56
8. Cenizas	57
V. RESULTADOS	59
VI. DISCUSION	84
VII. RESUMEN Y CONCLUSIONES	88
VIII. BIBLIOGRAFIA	92

I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS

Hay varias clases de bebidas que no se toman por su valor nutritivo, sino por su poder refrescante y por sus efectos estimulantes; por ejemplo: bebidas carbonatadas con un contenido moderado de alcohol como la cerveza y las bebidas estimulantes no carbonatadas y sin alcohol como el café y el té. El chilate es una bebida refrescante que puede considerarse como alimento en el sentido más amplio ya que se elabora a base de ingredientes alimenticios: es una mezcla formada de cacao y arroz molidos, azúcar y canela con agua. Para su consumo se agrega hielo para enfriarlo.

Se expende en establecimientos comerciales de diferente nivel por lo que su conservación en muchos casos es deficiente, además que es elaborada a nivel casero.

El chilate se consume en volúmenes considerables a lo largo de las costas guerrerenses, habiendo seleccionado el puerto de Acapulco, para realizar esta investigación.

Se sabe que en todo el Estado de Guerrero y algunos otros Estados del Sur de la República Mexicana es muy apreciada esta bebida, por lo que se considera importante su control sanitario, así como conocer el valor nutritivo de ella.

Según investigaciones realizadas, el chilate se consume en nuestro país desde la época precortesiana. Se sabe que el fruto del cacao, entre los antiguos moradores de Mesoamérica, equivalía simbólicamente al corazón humano, así como el chocolate representaba la sangre. Los indígenas mesoamericanos preparaban varias bebidas de cacao, entre ellas el chilate o boronté, que aún hoy emplean en sus ritos los sacerdotes Chorités en Guatemala, está compuesto de maíz, cacao y agua pluvial.

Boronté (bebida nueve), se llama así porque alude al episodio mítico de Popol-vuh acerca de la creación del género humano; "y moliendo entonces las mazorcas amarillentas y las blancas, hizo XMUCANE nueve bebidas y de éste alimento provinieron la fuerza y la gordura y con él crearon la musculatura y el vigor del hombre".

El chilate profano, que hoy se prepara como bebida en el sur de la República Mexicana, se compone de maíz tostado, agua y almendras de cacao molidas. En el Estado de Guerrero es utilizado el arroz en lugar del maíz tostado. Otra variante del chilate es la mezcla con chile, como el chillocahuatl, bebida de cacao enchilada mencionada por Molina en su diccionario. (1571)

Dada la naturaleza de la bebida se considera como objetivo de este trabajo comprobar y controlar la calidad sanitaria de este producto, haciendo necesario el Análisis Microbiológico que permita verificar las condiciones de elaboración y manejo y el Análisis Bromatológico para comprobar su valor alimenticio.

II. GENERALIDADES

I. CONSTITUYENTES

Esta bebida como anteriormente se mencionó, está constituida a base de cacao y arroz molidos, canela y azúcar como saborizantes y principalmente agua, por lo que a continuación se mencionarán las características de cada uno de los ingredientes que componen este producto.

1.1. CACAO.

El árbol de cacao llamado Theobroma cacao, tiene una corteza gris parduzca muy característica y crece a una altura de 4 a 7.5m. El árbol debe tener las condiciones adecuadas para un buen crecimiento. Necesitan de un medio ambiente tibio y húmedo. La temperatura de 18-35°C son adecuadas, pero el árbol se desarrolla muy bien a temperaturas de 40°C y humedades relativas que llegan al 100%. El buen crecimiento requiere de sombra y de una precipitación anual mínima de 125 cm. Aunque es deseable que ésta sea superior, un exceso puede provocar anegamiento y el desarrollo de enfermedades fúngicas. Las flores son aproximadamente de 1 cm. de diámetro; se producen muchas pero son pocas las que se polinizan, al parecer por pequeños jejenes (insectos del género Culicoides). Las flores se producen durante todo el año así que en el mismo árbol se encuentran flores y vaina de cacao. La vaina totalmente desarrollada será de 15-25 cm de longitud y 7.5-10 cm. de grueso en el centro, encierra de 30 a 40 granos rodeados de una pulpa mucilaginoso blanca.

Cuando las vainas de cacao están maduras, se cortan del árbol con machetes o cuchillo similar. Se cosechan los frutos maduros, los sobremaduros, los enfermos y los picados por insectos.

Luego se trasladan al sitio donde se lleva a cabo la fermentación y se clasifican para que se pueda realizar una fermentación uniforme.

Después de un día o dos, las vainas se abren con el machete y los granos y la pulpa se eliminan a mano o con herramientas manuales. Los granos se depositan en una canasta, en espera de comenzar la fermentación.

Los granos se fermentan para ayudar a la eliminación de la pulpa adherida a ellos y prepararlos para el secado. Sin embargo, los cambios químicos y biológicos que se llevan a cabo durante la fermentación son esenciales para el desarrollo adecuado del sabor a chocolate en la etapa de tostación. La fermentación se lleva a cabo primero en la pulpa por medio de levaduras, y luego por acción enzimática del propio cacao con oxidación y condensación que da como resultado la eliminación de gran parte del sabor amargo original. La duración de la fermentación varía de tres a nueve días, según el tipo de grano.

El secado de las almendras de cacao fermentadas se realiza mejor al sol, pero la lluvia, la estación o el clima, puede requerir del uso de un secado mecánico.

Generalmente los granos se consideran en dos categorías: granos básicos y granos de sabor. Los granos básicos tienen un sabor fuerte y, quizás mordente. Son los más comunes y los menos costosos. Los granos de sabor, además de tener un carácter básico de buen chocolate, tienen propiedades aromáticas importantes al sabor general. Estos granos no son tan comunes, son más costosos.

TABLA 2.1.

COMPOSICION QUIMICA PROMEDIO DEL GRANO DE CACAO	
Humedad	7 $\frac{3}{4}$
Grasa	53
Carbohidratos	16
Fibra de celulosa	2.6
Proteínas	20
Ceniza	3.2
Teobromina	1.3
Compuestos tánicos	6

1.2. ARROZ

El arroz, Orysa sativa, ha sido uno de los productos de grano de uso común desde tiempos remotos.

En escala mundial, el arroz es la cosecha de cereales más importante, ya que constituye el alimento principal de más de la mitad de la población del mundo.

Las diversas variedades de arroz reflejan la gran diversidad en las condiciones de cultivo. Los mejores rendimientos se obtienen en los climas subtropicales de temperatura templada. Casi siempre se siembra en suelos que retienen la humedad bajo condiciones de inundación. Se cultiva principalmente en Asia en donde se produce alrededor del 93% de la cosecha mundial.

La composición del arroz puede variar ligeramente, de acuerdo con las variedades del cereal, las condiciones geográficas, meteorológicas y otros factores.

Los granos de arroz que contienen del 10 al 14% de humedad son granos maduros y secados correctamente. Si al llegar del campo, los granos tienen un contenido de humedad considerablemente más elevado, es preciso secarlos hasta que están dentro de esta escala, ya que de otra manera, se pueden enmohecer y pudrir durante el almacenamiento, antes de que sean procesados. La mayor parte del arroz se consume en forma de granos intactos, desprovistos de la cáscara y el germen.

TABLA 2.2

COMPOSICION QUIMICA PROMEDIO DEL GRANO DE ARROZ

Humedad	11%
Carbohidratos	65
Protefnas	8
Grasa	2
Fibra no digerible	9
Cenizas	1
Calorías310

El grano de arroz está formado por la cáscara (hollejo), la capa de la semilla (pericarpio), el embrión (germen) y el endospermo harinoso. El recubrimiento de la semilla consta de seis capas de células diferenciadas y las más cercanas al endospermo forman la capa de aleurona que es rica en proteínas, lípidos, minerales y vitaminas del complejo B. Las proteínas y sales minerales se encuentran presentes en las células de aleurona y también en las células exteriores que contienen almidón.

El grano de arroz con la cáscara u hollejo y seco, se conoce como arroz en cáscara o en bruto. Llega a los molinos en grandes sacos o a granel. Las diferentes variedades y los diversos granos de arroz deben separarse y mantenerse en lotes distintos. El primer paso en la molienda de arroz es eliminar la cáscara y preservar la mayoría de los granos enteros. En el proceso de molienda, el arroz bruto se vacía en grandes tambores desde donde se lleva a través de una serie de máquinas en las cuales se cierne y se revuelve con aire para eliminar piedras, suciedad, paja y otros materiales extraños. (Figura 2.1.)

El arroz en bruto, limpio, se pasa a una máquina de rodillos de hule o "descascaradora". El arroz fluye entre las superficies ahuladas de los rodillos que giran en direcciones opuestas y cada uno a diferente velocidad. La presión entre los dos rodillos es ajustable y se regula por medios neumáticos porque las diversas variedades de arroz requieren diferentes presiones de trabajo. En algunos molinos, la cáscara se utiliza como combustible para generar energía, pero en la mayoría de ellos se tira como desperdicio.

De las máquinas descascaradoras, el arroz se transporta a un dispositivo llamado "separador", donde se apartan los granos con cáscara de los que ya están limpios. Los granos limpios salen de la caja en el extremo superior mientras que los granos con cáscara lo hacen en el extremo inferior por la diferencia de gravedad específica y coeficiente de fricción superficial entre ambos granos.

El arroz descascarado en esta etapa de molienda, se conoce como arroz "café"; su color varía entre café y verde. En la siguiente etapa de molienda, el arroz café pasa a las pulidoras que eliminan por fricción las capas exteriores de la cáscara y el germen de los granos de arroz.

La pulidora hace que el salvado se elimine por abrasión, en su mayor parte, debido a la presión entre los granos y también por la fricción entre éstos y la malla de acero áspera de que está provista la máquina. El salvado suelto y pequeños trozos de grano pasan a través de la malla de la pulidora y se separan por aspersión y cernido.

Aún teniendo cuidado, algunos de los granos se rompen durante la molienda. Varias máquinas, llamadas clasificadoras, separan los diferentes tamaños de granos. Los granos enteros y de tres cuartos, se reúnen en una fracción conocida como "arroz de cabeza"; los de tamaño de un tercio a un cuarto de longitud, se conocen como "residuos" y los fragmentos todavía más pequeños, como tamizado o "cervecero", ya que se utilizan en la fabricación de cerveza. Los rendimientos de productos y subproductos que se obtienen a partir del arroz en bruto en el proceso de molienda son:

	8
Cáscara	17.0 - 21.0
Salvado.	8.0 - 14.0
Pulimento	1.8 - 4.0
Arroz de primera	37.0 - 65.0
Arroz de segunda	2.6 - 11.7
Residuos	3.1 - 11.0
Arroz cervecero	2.0 - 4.9
Pérdida y desperdicio	1.2 - 3.0

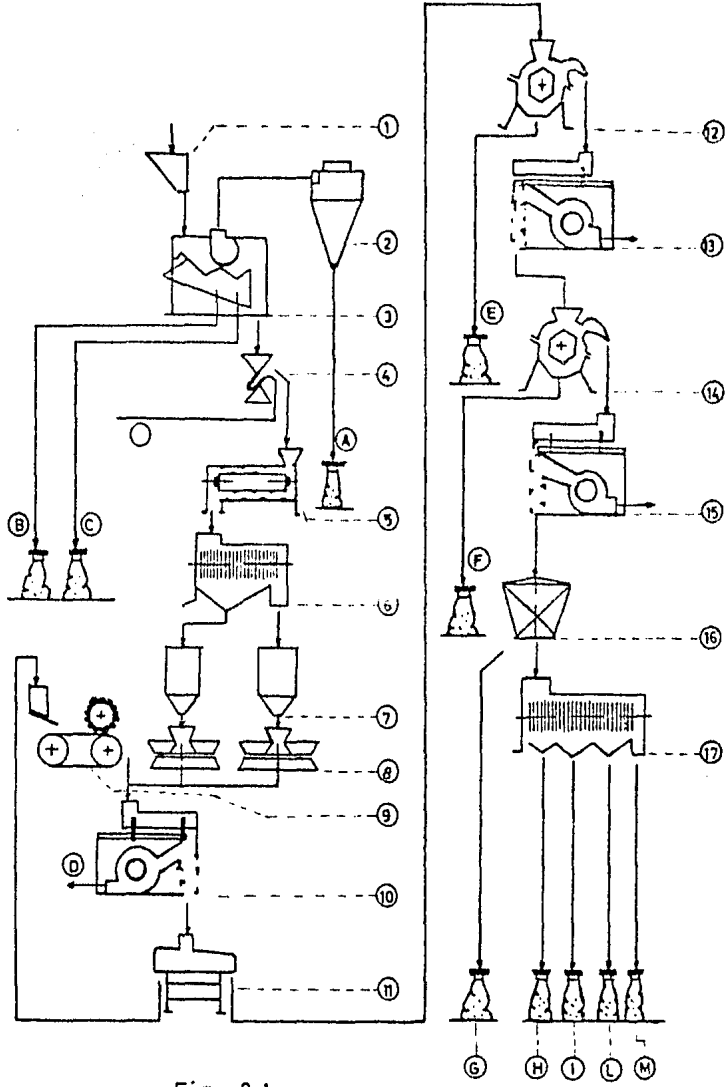


Fig. 2.1

DIAGRAMA DE FLUJO DE LAS OPERACIONES DE UN MOLINO DE ARROZ.

- 1..Tolva. 2..Ciclón. 3..Ventilador y separador de mallas. 4..Separador magnético
- 5..Separador de espigas. 6..Separador de disco indentado. 7..Tambor .
- 8. Descascarador de disco. 9.Descascarador con banda de hule. 10.Separador de hollejo. 11..Máquina separadora. 12..Eliminador de hollejo. 13.Separador de hollejo
- 14..Eliminador de hollejo. 15..Separador de hollejo. 16.. Cepillo
- 17.. Separador de disco indentado.
- A. Polvo B. Paja. C. Semillas D. Hollejos E. Cáscara F. Pulimento G. Residuos H. Arroz para cervecerías I. Finos L. Arroz de segunda M. Arroz de primera.

1.3. AZUCAR

El azúcar de mesa común, es un carbohidrato: la sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$), compuesta de una molécula de glucosa y una molécula de fructosa. Se obtiene principalmente de la caña de azúcar. Se produce moliendo y triturando la caña de azúcar. El jugo se neutraliza con cal, se filtra, concentra, cristaliza y centrifuga para producir azúcar cruda. El azúcar cruda se refina por lavado, disolviéndola, haciéndola pasar sobre carbón de huesos, filtrando, concentrando, cristalizando y centrifugando. El resultado es el azúcar blanca refinada que contiene 99.96% de sacarosa.

Los ácidos hidrolizan fácilmente a la sacarosa produciendo azúcar invertido que contiene iguales proporciones de glucosa y de fructosa. El proceso se llama inversión, puesto que la rotación óptica de la luz polarizada, cambia de positiva a negativa durante la hidrólisis. La inversión también puede efectuarse con la enzima sacarosa. La inversión disminuye la tendencia del azúcar a cristalizar en los dulces, los helados, los productos horneados y los refrescos.

La concentración de soluciones de sacarosa se puede medir por medio de la refracción de la luz a través de la solución. Cuando una solución contiene más azúcar, su índice de refracción será superior. Es ventajoso medir la concentración por medio de un refractómetro para ahorrar tiempo y esfuerzo. Basado en el principio de refracción, se ha introducido el grado Brix para expresar la concentración de soluciones de sacarosa.

1.4. CANELA

La canela se obtiene de la segunda corteza de las ramas del canelo, cuyo nombre científico es Cinnamomun zeylanicum, es originario de Ceilán y Sur de la India, de la familia de las laureáceas, de 7 a 8 metros de altura, con tronco liso; hojas parecidas a las del laurel; flores terminales blancas y de olor agradable; y por fruta, drupas ovales de color pardo azulado. Se le cultiva en diversos países tropicales. Es un árbol resistente que se desarrolla bien en toda clase de terrenos, aunque vegeta mejor en los arenosos con poco humus. El clima más favorable es el húmedo de una temperatura media anual de 15 a 17°C.

La canela se empieza a coleccionar cuando el árbol tiene 5 a 6 años de edad. Se cortan ramas de uno a dos metros a las que se despunta y se les quitan las hojas y se hacen cortes transversales y longitudinales. Se separa la corteza. Los trozos de ésta se reúnen en hacecillos que se dejan secar y se les quita la epidermis. Las tiras de canela ya limpias se cortan en trozos y se les deja secar al sol.

La canela es de color rojo amarillento, de olor aromático y sabor agradable, muy apreciada como condimento, aromatizante y astringente.

2. COMPONENTES QUIMICOS DE LOS CONSTITUYENTES

2.1. AGUA:

El agua es una sustancia esencial para la vida humana, presente en los alimentos y en la mayoría de los productos alimenticios, el agua es el componente más abundante.

La presencia del agua en los alimentos y su concentración determinan en alto grado su sabor y digestibilidad, así como la estructura física y la capacidad de manejo técnico del material. Sin embargo, lo más importante, es que casi todos los procesos de deterioro que se realizan en los alimentos reciben influencia, en una u otra forma, de la concentración y movilidad del agua en el alimento. Como una orientación aproximada, podría decirse que, independientemente de la composición de los materiales alimenticios, cuando hay una concentración alta de agua, la descomposición será causada por el crecimiento y desarrollo de bacterias y mohos en los alimentos y por reacciones enzimáticas y no enzimáticas; a concentraciones bajas de agua, las pérdidas de calidad se producen principalmente por reacciones autooxidativas y de deterioro físico.

La intensidad y rapidez de los diversos procesos de deterioro es distinta a diferentes concentraciones de agua; sin embargo, el alimento es más estable cuando hay una baja concentración de agua y no a concentraciones elevadas. El potencial del agua para tomar parte en los procesos de deterioro de un producto alimenticio está caracterizado por la actividad del agua (a_w), en el pro-

ducto, de acuerdo a la Ley de Raoult, es la relación entre la presión de vapor del agua del producto alimenticio y la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura:

$$a_w = (P_{\text{producto}}/P_o)$$

Donde:

a_w = actividad del agua

P_{producto} = presión de vapor del agua del producto

P_o = presión de vapor del agua pura

La actividad del agua en cualquier producto depende de la composición química del mismo, del estado de agregación de sus constituyentes, del contenido de agua y de la temperatura del producto. Una gráfica del contenido de agua en un producto en relación a su actividad a una determinada temperatura se conoce como isoterma de sorción. Por la isoterma de sorción puede caracterizarse el estado termodinámico del agua en un producto alimenticio; los materiales que enlazan cantidades relativamente altas de agua a valores bajos de la actividad; se conocen como higroscópicos.

Las isotermas de sorción de la mayoría de los productos alimenticios son de forma sigmoide; no obstante, es posible que tengan diferentes formas. Puesto que el comportamiento de los productos alimenticios respecto a la sorción de agua está determinado por la composición química y el estado fisicoquímico de los constituyentes.

Los productos a base de almidón, incluyendo los granos, absorben más agua a bajas actividades que los materiales ricos en proteínas como la carne.

Los azúcares, en general, representan un grupo de materiales que presentan dos tipos de comportamiento de sorción.

En el estado amorfo son muy higroscópicos, entanto que en el estado cristalino su higroscopfa es baja. El cambio del estado amorfo al cristalino puede causar problemas, porque durante la transformación se libera agua. Si el azúcar es parte de una mezcla, los otros materiales presentes en la mezcla recogen, el agua y, por lo tanto, casi siempre están sujetos a cambios físicos y químicos.

Si un material higroscópico se recubre con otros que sean ligeramente higroscópicos, como sería la grasa, también se reduce la capacidad de absorción de agua en los alimentos. La actividad del agua (a_w) tiene una gran influencia sobre el deterioro de los productos y, por lo tanto, sobre la vida en el almacenamiento. Puesto que la reducción de la actividad del agua de un producto alimenticio por deshidratación no sólo mejora su capacidad para ser almacenado sino también afecta su estado fisicoquímico y, por ende, su sabor y el costo del proceso de deshidratación, es necesario seleccionar muy cuidadosamente la actividad del agua en los productos que van a ser almacenados.

Puesto que el deterioro puede ser causado por diversos tipos de reacciones, no puede establecerse una relación general entre la actividad del agua y el tipo de deterioro.

Cuando ciertas reacciones de deterioro son dominantes pueden establecerse intervalos para la actividad del agua. Así por ejemplo cuando la a_w es de 1 a 0.8 la reacción de deterioro domi-

nante es debida al crecimiento de microorganismos y posiblemente por reacciones enzimáticas. Algunos ejemplos de estos tipos de reacciones se anotan en el siguiente cuadro:

a_w	TIPO DE REACCION DETERIORATIVA DOMINANTE	TIPO DE POSIBLE REACCION DETERIORATIVA
1 - 0.8	Crecimiento de microorganismos	Reacciones enzimáticas
0.91	Bacterias	
0.88	Levaduras	
0.8	Mohos	
0.8 - 0.65	Reacciones enzimáticas (descomposición de grasas y reacciones de oscurecimiento)	Oscurecimiento no enzimático
0.75		Crecimiento de microorganismos, bacterias halofílicas
0.7		Levaduras osmofílicas
0.65		Mohos xerofílicos
0.65 - 0.3	Reacciones de oscurecimiento no enzimáticas (reacciones de Maillard)	Reacciones enzimáticas autooxidación.
0.35 - 0.0	Autooxidación, cambios físicos	Reacciones de decoloración no enzimática. Reacciones enzimáticas

DETERIORO DE MICROORGANISMOS

El crecimiento de microorganismos se favorece cuando la actividad del agua está entre 1 y 0.65, en tanto que a valores de 0.75 y 0.65 solo pueden crecer ciertos tipos especializados de microorganismos como son las levaduras osmofílicas.

En el caso del deterioro por microorganismos, el factor tiempo es de mayor importancia, ya que, después de un periodo de iniciación de 3 ó 4 días, puede observarse el crecimiento de microorganismos

en los productos alimenticios con una elevada actividad del agua. Cuando las actividades del agua llegan a un nivel de 0.8, se requieren de 4 a 5 semanas para que el producto sea dañado por los microorganismos.

REACCIONES DE DETERIORO QUIMICO

Reacciones enzimáticas:

Las reacciones enzimáticas se llevan a cabo prácticamente a cualquier nivel de actividad del agua; sin embargo, son prominentes en valores superiores a 0.3. Las enzimas que causan las reacciones enzimáticas son enzimas intrínsecas del producto o enzimas extrañas, por ejemplo, de microorganismos.

Las reacciones enzimáticas más importantes son la descomposición de las grasas por la acción de lipasas, fosfolipasa lipoxidasas en los materiales que contienen grasas y las reacciones enzimáticas de oscurecimiento del color en frutas y verduras provocadas por la peroxidasa y la fenoloxidasa.

Reacciones no enzimáticas:

Las reacciones no enzimáticas de oscurecimiento que también se llaman reacciones de Maillard, ocurren prácticamente a cualquier nivel de actividad del agua; sin embargo, se acentúa más en los valores medios, 0.4 a 0.6

La característica de la reacción, es una decoloración del tono café del producto, que casi siempre se relaciona con la

presencia de un sabor amargo. Los cambios se deben a la reacción de los carbohidratos y de los grupos amino de los aminoácidos y proteínas.

Autooxidación:

A bajos niveles de actividad del agua, el tipo más importante de deterioro es la autooxidación de los lípidos que se presentan a causa de reacciones de radicales libres entre el oxígeno y los lípidos no saturados. Los efectos de la autooxidación disminuyen constantemente al aumentar el contenido de agua, de manera que puede suponerse que ésta causa un efecto protector. Todavía no se cuenta con una explicación detallada de la forma en que actúa la protección del agua. Sin embargo, parece que el efecto protector va ligado a la estabilización de los constituyentes que tienden a formar radicales libres.

DETERIORO FISICO Y FISICOQUIMICO

Si los materiales que contienen proteínas y almidones se secan hasta valores muy bajos de la actividad del agua, se presentará un proceso irreversible de desnaturalización.

La desnaturalización es causada por una interacción de los sitios reactivos y da como resultado cambios en textura, principalmente en alimentos ricos en proteínas.

CALIDAD DEL AGUA

De primordial importancia es la calidad sanitaria, así como el sabor, olor y color del suministro de agua.

Las impurezas en el agua que afectan su uso incluyen materia en suspensión, sólidos totales disueltos, alcalinidad y pH, sulfuros, cloruros, sílice, gases disueltos, hierro y manganeso.

El agua para la limpieza debe cumplir con las normas locales, estatales y federales del agua potable como la que se usa en la fabricación y procesamiento de productos alimenticios.

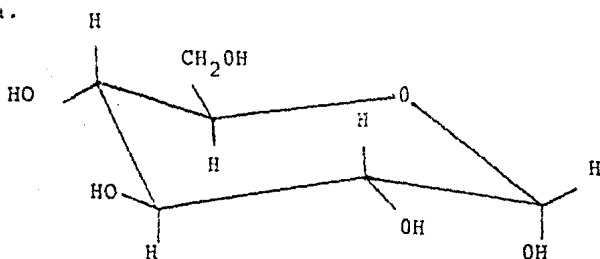
Esta agua debe estar libre de contaminación en la fuente de suministro y protegerla de la contaminación subsecuente. Gran parte del sabor y olor del agua puede eliminarse por medio de la cloración. La mayor parte de los tratamientos para la desinfección del agua utilizan cloro debido a su bajo costo, facilidad de obtención y de aplicación. En la cloración del agua se emplea un compuesto de cloro, como gas cloro, o solución de hipoclorito de sodio o de calcio; se agregan en una concentración tal que en el tiempo de contacto y a la temperatura y pH que se encuentren, tengan una acción germicida adecuada.

2.2. CARBOHIDRATOS

Los carbohidratos constituyen la clase más abundante de compuestos orgánicos. Contribuyen a las 3/4 partes del peso seco de los vegetales y están ampliamente distribuidos, con frecuencia, como componentes fisiológicos importantes en plantas, animales y formas inferiores de vida. En plantas y animales sirven principalmente como elementos estructurales o de reserva alimenticia. Los carbohidratos vegetales, en particular representan un gran almacén de energía disponible como alimento para el hombre y los animales.

Los carbohidratos pueden definirse en forma general como compuestos de carbono, hidrógeno y oxígeno. Casi siempre tienen al hidrógeno y al oxígeno en la relación encontrada en el agua. Así pues, la mayoría de los carbohidratos tienen la fórmula empírica $C_x(H_2O)_y$.

Uno de los carbohidratos más sencillos es la d-glucosa que es el componente metabólico central en el suministro de energía de las plantas y animales. Su conformación más estable es la de silla, en que todos los grupos oxhidrilo son ecuatoriales en la forma b-d. En la industria alimentaria este azúcar se llama dextrosa.



La d-glucosa existe en la miel, las frutas y las bayas y corresponde al 50% de la sacarosa invertida. Su principal fuente comercial es el almidón que, al gelatinizarse en agua se hidroliza completamente a d-glucosa por medio de la enzima glucoamilasa, casi siempre con ayuda de una diastasa para adelgazar el almidón. El hidrolizado, al concentrarse, produce cristales de monohidrato de d-glucosa, la principal forma cristalina de dextrosa que se vende en el comercio.

Los carbohidratos se encuentran almacenados como reserva en todas las plantas, pero los más abundantes y de mayor distribución en las reservas de carbohidratos son los almidones. Estos polisacáridos de reserva se almacenan principalmente en las semillas, frutos, tubérculos, raíces y médula de los tallos. Los almidones se presentan como partículas definidas o gránulos de 2 a 150μ de diámetro. El aspecto físico y las propiedades de los gránulos varían ampliamente de una planta a otra y pueden utilizarse para clasificar a los almidones de acuerdo con su origen. Algunos son redondos, otros elípticos y otros poligonales. Los diámetros de los gránulos de algunos almidones comestibles, dadas en micras son: maíz 4 a 26μ , papa blanca 15 a 100μ , camote 15 a 55μ , tapioca 5 a 36μ , arroz 3 a 9μ y trigo 2 a 36μ .

2.3. PROTEINAS

En el tejido vegetal o animal, del que se derivan todos los alimentos, las proteínas realizan las más diversas funciones esenciales para el proceso de la vida. Funcionan como enzimas biocatalíticas y como hormonas, como agentes de transporte de hidrógeno y como codificadores genéticos. Las proteínas suministran una capacidad protectora contra la enfermedad, en los anticuerpos, y evitan la pérdida de sangre por medio del mecanismo de la coagulación. Como enzimas metabólicas, las proteínas regulan las fuentes de energía de los organismos vivos y como proteínas de los músculos contráctiles convierten la energía química en energía mecánica. Las proteínas también se consideran como el depósito esencial de alimento para la regeneración cíclica de

todas las protefnas biofuncionales. Como macromoléculas anfó-
teras de estructura única, las protefnas presentan propiedades
físicas especiales de consecuencias en la tecnología de alimen-
tos. Por su capacidad para interactuar, pueden formar agrega-
dos moleculares, micelas coloidales, fibras, coágulos, geles y
sistemas viscoelásticos. Las protefnas al enlazar el agua,
pueden coagularse con el calor o por acidificación y, como molé-
culas tensoactivas, provocar la formación de espuma y la emulsi-
ficación. Las propiedades físicas y biológicas de las protefnas
son afectadas considerablemente por la temperatura, el pH, elec-
trolitos y los esfuerzos físicos que pueden producir desnatura-
lización. Al desnaturalizarse las protefnas, pierden su activi-
dad biológica y con frecuencia sufren cambios físicos importan-
tes.

El blanqueo, la pasteurización y los tratamientos de este-
rilización que se utilizan para la inactivación de enzimas y la
destrucción de microorganismos y espuma son, intrínsecamente,
procesos de desnaturalización.

Generalmente la desnaturalización se define como una modi-
ficación estructural de la molécula nativa de protefna exclusi-
va de la hidrólisis de los enlaces covalentes primarios. El
término se restringe a los cambios en los enlaces no covalentes
secundarios que mantuvo la conformación molecular de la protef-
na natural y no incluye a la proteólisis o a la ruptura de en-
laces disulfuro.

La desnaturalización es, esencialmente, un proceso de de-
sorganización que da lugar a la formación de moléculas orienta-

das al azar, a partir de la estructura molecular sumamente ordenada que caracteriza al estado nativo.

La desorganización molecular inherente a la desnaturalización, puede producir profundos cambios en las propiedades biológicas, químicas y físicas de las proteínas nativas. Las proteínas enzimáticas, hormonales y virales, al degradarse, casi siempre pierden sus actividades biológicas específicas.

La desnaturalización se manifiesta con frecuencia como una reducción de la solubilidad de la proteína, de una pérdida del poder de cristalización, aumento en la viscosidad de la solución y mayor susceptibilidad a la proteólisis.

La conformación estructural de las moléculas de proteína que explica su diversidad, funcionalidad única y su capacidad de desnaturalización, se predice por el contenido y secuencia lineal de sus monómeros de aminoácidos. Las proteínas son macromoléculas anfólicas que contienen varios cientos a varios miles de aminoácidos por molécula, lo que representa una gama de pesos moleculares de 10,000 a más de 200,000. Los elementos estructurales primarios son aproximadamente 20 aminoácidos unidos por enlaces peptídicos en cadenas polipeptídicas lineales. El tamaño de los sustituyentes en el átomo de carbono varía desde el átomo de hidrógeno en la glicina hasta el anillo heterocíclico del indol en el triptofano.

2.4. GRASAS Y ACEITES

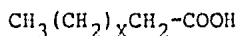
La diferencia entre una grasa y un aceite radica en su condición a temperatura ambiente. Una grasa es sólida y un aceite es líquido.

Las grasas y los aceites esencialmente son triglicéridos, o sea el producto de la esterificación de una molécula de glicerina con tres moléculas de ácidos grasos. El tipo de ácido graso y su posición estructural en la molécula del triglicérido determinan, en alto grado, las propiedades químicas y físicas de los triglicéridos resultantes. Por ejemplo, una grasa sólida puede diferir de un aceite líquido simplemente en el tipo de ácido graso presente en el triglicérido, aunque ambos productos contengan ácidos grasos con una cadena de 18 carbonos. Por ejemplo, las estearinas son esencialmente triglicéridos saturados de ácidos grasos con 18 carbonos, en tanto que los aceites vegetales son triglicéridos de ácidos grasos no saturados de 18 carbonos.

El grado de saturación o insaturación puede alterar la forma física de los triglicéridos en una grasa sólida o en un aceite líquido. Aunque el tipo de ácido graso y la posición estructural explican las variaciones específicas únicas entre las grasas y los aceites, éstos comparten muchas propiedades en común. La mayoría de la grasa y los aceites son insolubles en agua, pero solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos. Tienen densidades más bajas que el agua, aunque a temperatura ambiente pueden variar de sustancias líquidas o sólidas. En general, los

productos líquidos se llaman aceites mientras que los sólidos se conocen como grasas. Ambos términos sin embargo, se refieren a los triglicéridos y representan cerca del 95% de todos los componentes grasos en los alimentos que se consumen. Un término más amplio, lípido, se utiliza para abarcar a diversas sustancias químicas como mono y diglicéridos, fosfátidos, cerebrósidos, esteroides, terpenos, alcoholes grasos, ácidos grasos, vitaminas solubles en grasas y otras. Sin embargo, éstas se consideran como los componentes en menor escala, de los compuestos presentes en los alimentos.

Las grasas y los aceites tal como se encuentran en la naturaleza, pueden tener ácidos grasos con cadenas de carbono de 2 a 24, siendo predominantes los ácidos grasos de C_{12} y C_{18} . Los ácidos grasos de mayor interés son los de cadena alifáticas rectas, con un número par de átomos de carbono y un solo grupo carboxilo. La fórmula estructural general de un ácido graso saturado es:



El ácido oleico es el ácido graso que se presenta con más frecuencia en la naturaleza.

Los ácidos grasos de mayor insaturación son más reactivos. La actividad aumenta a medida que el número de dobles enlaces se incrementa. Los ácidos grasos polinsaturados están sujetos a la polimerización y los ácidos grasos insaturados con dobles ligaduras conjugadas polimerizan más rápidamente que aquellas que tienen dobles enlaces aislados.

Las características físicas de los aceites y grasas dependen esencialmente de cuatro factores:

- 1) El grado de insaturación,
- 2) La longitud de la cadena de carbono de los ácidos grasos,
- 3) Las formas isoméricas de los ácidos grasos,
- 4) La configuración molecular del triglicérido.

III. ANALISIS BACTERIOLOGICO

1. MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS

Como los microorganismos se distribuyen ampliamente en la naturaleza, puede anticiparse su presencia y multiplicación siempre que en el ambiente se presenten factores favorables o condiciones ambientales para su crecimiento. Casi siempre los factores principales que limitan el crecimiento de los microorganismos, son el suministro de alimento, la temperatura, la humedad y el pH. Ningún producto alimenticio que haya alcanzado su madurez está libre de microorganismos. Sin embargo, no todos los alimentos presentan la misma cantidad de microorganismos, por ejemplo, las nueces y otros productos con cáscara están protegidos por una capa semipermeable que ofrece la protección máxima a la pulpa de la nuez contra la actividad biológica.

Las bacterias, los mohos y las levaduras, constituyen un gran grupo de microorganismos presentes en los alimentos. Los microorganismos derivan su energía y otras actividades metabólicas del alimento, lo mismo que el hombre, así que al desarrollar en los alimentos, pueden causar cambios bioquímicos importantes en ellos.

Las causas principales de la descomposición y alteración de los alimentos son las siguientes:

1. El crecimiento y la actividad de los microorganismos, especialmente bacterias, levaduras y mohos
2. La actividad de las enzimas naturales de los alimentos
3. Los insectos, parásitos y roedores

4. La temperatura; tanto la temperatura ambiental como la temperatura alta, aceleran en general los procesos bioquímicos.
5. La humedad
6. El aire y más particularmente, el oxígeno
7. El pH
8. La luz
9. El tiempo

Estos factores no influyen aisladamente, sino en forma combinada, algunos simultáneamente, otros causando cambios que propician el efecto de otros factores.

Es frecuente que se agrupen los microorganismos por sus características fisiológicas, que pueden provocar alteraciones en los alimentos, por ejemplo: aquellas que producen acidez o alcalinidad del medio, otras que por contener enzimas lipolíticas, pectolíticas o proteolíticas deterioran los alimentos. Otro grupo es el de bacterias que descomponen los productos enlatados o los alimentos refrigerados. Otros que por ser tolerantes a la sal y al azúcar en concentraciones altas pueden alterar alimentos conservados mediante estos métodos.

El conocimiento de las características de los alimentos y de las condiciones adecuadas de la conservación permite controlar considerablemente a los microorganismos presentes en los alimentos, favorecer los cambios deseables y suprimir los efectos indeseables y de deterioro.

Siempre deben consumirse alimentos envasados estériles, mantener los productos perecederos fríos y tener a mano vegetales y animales que estén preservados en forma adecuada por algún método de conservación. Si se da la atención correcta a la limpieza de los utensilios y se mantienen alejados los insectos y otras plagas del alimento, es poca la oportunidad para que se presente una infección o envenenamiento por alimentos.

Los alimentos de cualquier tipo que estén preparados y sean perecederos, no deben conservarse sin refrigeración; por lo general, debe crearse una condición en el alimento para retardar el desarrollo de microorganismos. Para su rápida multiplicación, las bacterias patógenas requieren de temperaturas cercanas a las del cuerpo humano.

Las bacterias necesitan más humedad que los mohos y las levaduras, pero pueden desarrollarse en el aire o sin el, en condiciones húmedas y a temperaturas moderadas.

Las temperaturas cercanas al punto de congelación del agua, restringen el crecimiento de todos los organismos, por lo tanto, el control más simple del desarrollo microbiano, son las bajas temperaturas.

Los alimentos que están libres de microorganismos se mantienen a bajas temperaturas, no sufrirán deterioro microbiano, pero algunas de ellas pueden ser susceptibles al deterioro químico y físico. Los alimentos estériles están sujetos a reacciones químicas que pueden provocar pérdidas en valores nutritivos. Cuando se trata de la nutrición del hombre, deben considerarse todos los

factores para obtener alimentos aceptables para el consumo.

La contaminación de alimentos por los microorganismos, es un problema con el que se ha tenido que luchar durante mucho tiempo. Desde luego, al mejorar las condiciones de higiene tienden a disminuir considerablemente, sin embargo, difícilmente desaparecen aún con los métodos más adelantados. De ellos habrá microorganismos patógenos y no patógenos siendo de interés primordial, el estudio de algunos microorganismos indicadores que nos permitan conocer la calidad del producto.

Todas las bacterias encontradas en los alimentos se incluyen en la clase ESQUIZOMICETOS y la mayoría de ellos en los órdenes Pseudomonadácea, Espirilácea, Acromobacteriácea, Enterobacteriácea, Micrococácea, Brevibacteriácea, Lactobacilácea, Propionibacteriácea, Corinebacteriácea, Bacilácea y Brucelácea.

El tipo de alimento y condiciones de conservación y manejo, propicia el desarrollo de determinados grupos microbianos. Así, las bacterias que fueron identificadas con mayor frecuencia en el chilate fueron las de la familia Enterobacterácea, que incluye los géneros Escherichia, Enterobacter, Klebsiella, Paracolobactrum, Edwarsiella, Citrobacter, Hafnia, Serratia y Proteus y las que no se encontraron, Erwinia, Salmonella y Shigella.

Las bacterias de esta familia son en general bacterias bacilares, no esporógenas, Gram negativas, que crecen bien en medios de cultivo artificiales. Los cuatro primeros géneros nombrados anteriormente son saprófitos importantes en la bacteriología de los alimentos y Proteus, Salmonella y Shigella son gérmenes patógenos

que pueden producir diferentes tipos de desarreglos intestinales, infecciones e intoxicaciones, que en algunas ocasiones pueden llegar a ser mortales.

BACTERIAS COLIFORMES

Las bacterias de los géneros Escherichia, Enterobacter, Klebsiella y Paracolonobactrum se incluyen en el grupo coliforme o coli-aerogenes y en conjunto se les denomina microorganismos coliformes o bacterias coliformes. Son bacilos cortos, Gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, no forman esporas, fermentan la lactosa con producción de gas. Las especies más importantes son: Escherichia coli y Enterobacter aerogenes (llamada también Klebsiella aerogenes a la forma inmóvil).

Debido a que E. Coli se considera principalmente de origen intestinal y E. aerogenes procede generalmente de vegetales (aunque ocasionalmente también del intestino), se ha estudiado bastante el modo de diferenciarlos.

Escherichia coli produce más ácido en caldo glucosado, lo que se aprécia mediante el indicador rojo de metilo, forma indol pero no acetofna (acetil metil-carbinol); produce dióxido de carbono e hidrógeno en la producción 1:1 y no puede aprovechar el citrato como fuente única de carbono.

Enterobacter aerogenes produce menos ácido, forma acetil metil-carbinol pero no indol, la proporción de CO_2 al hidrógeno producidos es de 2:1 y utiliza el citrato como única fuente de carbono. Generalmente, la cantidad de gas producido es superior a la que

da E. Coli, por lo que es el agente productor de gas más peligroso en leche y otros alimentos.

E. Coli, y E. aerogenes, fermentan los azúcares, dando ácido láctico, alcohol etílico, ácido acético, ácido succínico, CO_2 e hidrógeno.

Las bacterias del género Paracolo bacterium se encuentran en una posición intermedia entre E. Coli y E. aerogenes. Algunas no fermentan la lactosa o lo hacen más lento.

En general, las bacterias coliformes son perjudiciales para los alimentos, ya que su presencia en algunos de ellos, indican contaminación por desperdicios cloacales y, por lo tanto, posiblemente por bacterias entéricas patógenas.

Algunos caracteres que hacen a las bacterias coliformes importantes en la alteración de los alimentos son:

- 1) Su capacidad para crecer bien en numerosos substratos y para utilizar como fuente de energía un gran número de hidratos de carbono y algunos otros compuestos orgánicos, y como fuente de nitrógeno compuestos nitrogenados bastante sencillos;
- 2) Su capacidad de síntesis de la mayoría de las vitaminas que necesitan;
- 3) La posibilidad de crecer bien a temperaturas comprendidas dentro de un amplio margen;
- 4) Capacidad para producir, a partir de los azúcares, cantidades considerables de ácido y gas;
- 5) Pueden ocasionar sabores desagradables;

6) Capacidad de producción del E. aerogenes de mucosidad y viscosidad en los alimentos

PROTEUS: Son bacilos rectos móviles Gram negativos, mesófilos, se han encontrado en carnes, pescados, huevos en descomposición, ocasionando a veces un olor putrefacto. La presencia de bacterias de este género en gran número de alimentos sin refrigerar, las ha hecho sospechosas de ser causantes de intoxicaciones alimenticias. Originan ácido y gas a partir de los azúcares; la especie más común es Proteus vulgaris.

2. METODOLOGIA

Los análisis microbiológicos son importantes, ya que son utilizados en el control de calidad como indicadores de la calidad de los productos. Los análisis microbiológicos permiten detectar tanto los microorganismos patógenos, como los no patógenos siendo algunos de ellos los siguientes:

- . Análisis rutinarios: permiten el control del proceso de elaboración.
- . Análisis para detectar el grado de frescura de la materia prima.
- . Análisis para investigar las causas de descomposición del producto.
- . Análisis de productos sospechosos de producir intoxicaciones.

Entre los análisis microbiológicos de mayor valor en el control sanitario, están: la cuenta total de microorganismos; la cuenta de mohos y levaduras; la determinación de colibacterias; la deter-

minación de estreptococos grupo D (Lancerfield) y la determinación de Salmonella y Shigella.

Para estimar la calidad sanitaria del chilate, se adoptaron algunas pruebas bacteriológicas ampliamente ensayadas y evaluadas, que deben seguirse exactamente para que las variaciones inherentes al método sean mínimas y los resultados reproducibles.

Las técnicas que fueron aplicadas a este producto, son:

- 1) Cuenta de organismos mesofílicos aerobios
- 2) Cuenta de organismos coliformes
- 3) Investigación de Salmonella.

2.1. MUESTREO

Algunas recomendaciones importantes al realizar los análisis bacteriológicos son:

- . Las muestras se deben tomar con instrumentos esterilizados y transportar en recipientes adecuados.
- . Al muestrear, se debe evitar la contaminación por polvo y saliva.
- . Las muestras no deben entrar en contacto con detergentes y desinfectantes que afecten la viabilidad de los microorganismos.
- . Los envases deben etiquetarse adecuadamente para evitar confusiones, incluyendo información que pueda influir en la interpretación de los análisis.

Debido a que los microorganismos se multiplican con rapidez,

es necesario iniciar los análisis tan pronto como se tengan las muestras. Si esto no es posible, las muestras deben conservarse congeladas.

2.2. PREPARACION DE LA MUESTRA

Los análisis siguen una cierta secuencia.

Primero se inicia la prueba cuantitativa que consiste en hacer diluciones de la muestra y después la siembra de éstas diluciones, en medios de cultivo que permitan su cuantificación. Después se inicia la prueba determinativa que utiliza medios de cultivo selectivos en donde puedan crecer ciertas clases de microorganismos. Luego se someten las colonias aisladas a pruebas bioquímicas que permitirán la confirmación e identificación del microorganismo.

Las colonias obtenidas de cada dilución se cuentan para calcular el número de gérmenes contenidos en la muestra.

Para identificar los microorganismos, los medios de cultivo deben contener un sustrato adecuado a éste. Dependiendo del meta--bolismo de la especie, se adicionan inhibidores de otros organismos sustancias químicas que reaccionan con productos del metabolismo. Los medios de cultivo se preparan en forma líquida, semisólida y sólida, dependiendo del tipo de cultivos que se requieran.

2.3. MATERIAL Y EQUIPO

Autoclave con termómetro y manómetro

Horno para esterilizar a 180°C

Incubadora con termostato que evite variaciones de $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$

Baño Marfa con termostato y termómetro

Balanza semianalítica Marca Sartorius de una cap. de 1200 g.

Contador de colonias Quebec

Microscopio compuesto binocular Marca Zeiss

Cajas de Petri de 100 x 15 mm

Pipetas bacteriológicas de 1 ml. y 10 ml. estériles

Frascos de vidrio de boca angosta de 250 ml. de capacidad con tapón de rosca, conteniendo 90 ml de solución buffer⁺ 1% del volumen señalado después de la esterilización.

Frascos de vidrio de 500 ml. de capacidad con tapón de rosca, conteniendo 225 ml de caldo lactosado

Tubos de ensayo de 16 x 150 mm conteniendo 10 ml de caldo selenito

Tubos de ensayo de 16 x 150 mm conteniendo 10 ml de caldo tetrationato

Tubos de ensayo de 13 x 100 mm.

2.4. MEDIOS DE CULTIVO

AGAR PARA METODOS ESTANDAR

(Para cuenta en placa)

Es un medio de cultivo rico en nutrientes y elaborado de acuerdo a la formulación de la APHA (American Public Health Association). Se recomienda para el recuento de bacterias de interés sanitario, las cuales se utilizan como índice de contaminación o carga microbiana en diversos alimentos.

AGAR DE BILIS Y ROJO VIOLETA

Medio selectivo para la detección de coliformes en agua, pro-

ductos lácteos y otros alimentos. Los gérmenes Gram positivos son marcadamente inhibidos por las sales biliares y el cristal violeta que contiene. Las colonias de las bacterias fermentadoras de la lactosa, son de color rojo, dependiendo su tamaño del número de bacterias que existen en la placa.

En ocasiones los cocos del contenido intestinal, se pueden desarrollar en el medio como colonias puntiformes de color rosado. En estudios realizados por Hartman, se demostró que el medio preparado y solamente hervido, dá los mismos resultados que el medio esterilizado en autoclave.

CALDO LACTOSADO

Es el medio recomendado por la APHA y otras autoridades sanitarias para investigar la presencia de coliformes en agua, leche, gelatina y productos farmacéuticos.

Para comprobar previamente la esterilidad del medio se recomienda incubarlo a 35°C durante 24 horas.

AGAR XLD (Xilosa-Lisina Desoxicolato)

Para aislamiento de bacterias enteropatógenas especialmente de los géneros *Salmonella* y *Shigella*.

En el agar XLD es posible obtener las siguientes reacciones de diferenciación:

La degradación de xilosa, lactosa y sacarosa, con producción de ácido, se manifiesta por un cambio de color del rojo de fenol al amarillo. El tiosulfato de sodio sirve como substancia reaccionan

te y la sal de hierro como indicador de la formación de sulfuro de hidrógeno. Las bacterias que descarboxilan la lisina o cada-verina, se reconocen por la presencia de un color rojo púrpura alrededor de las colonias, lo cual se debe a la elevación del pH.

Características de las colonias:

Arizona: Rojas y transparentes con el centro negro

Citrobacter: Amarillas y opacas. Pueden presentar un centro negro y orillas claras

Edwardsiella: Rojas con el centro negro y borde claros

E. Coli, Enterobacter, Serratia: Amarillas y opacas, halo de precipitado amarillo alrededor de las colonias.

Klebsiella: Grandes amarillas, pálidas, mucoides y opacas. Halo de precipitado amarillo rodeando a las colonias.

Proteus mirabilis y Proteus vulgaris: Amarillas, transparentes con bordes claros. Centro negro, especialmente. Proteus mirabilis.

Proteus morgani y Proteus retgeri: Rojas y transparentes

Providencia y Shigella: Rojas y transparentes

Salmonella: Rojas transparentes y bordes amarillos con centro negro si producen H_2S . Sin centro negro si no son productoras de H_2S .

BASE CALDO TETRACIONATO

Es un medio líquido selectivo y de enriquecimiento empleado para aislar Salmonella typhi y otras Salmonellas provenientes de heces, aguas de albañal, alimentos, etc.

Momentos antes de usarse se agregan 0.2 ml (de 3 a 4 gotas) de

solución yodo yodurada por cada 10 ml de medio.

CALDO SELENITO DE SODIO

Medio de enriquecimiento selectivo de Salmonella

El caldo selenito de sodio es más selectivo para el aislamiento de Salmonella cuando se incuba de 16 a 18 horas a 43° en vez de 37°C.

AGAR EOSINA Y AZUL DE METILENO

Es un medio selectivo para la investigación y diferenciación de bacilos entéricos y microorganismos coliformes.

Características de las colonias:

Escherichia coli: De 2 a 3 mm de diámetro. Azul negras en la parte central, y bordes claros a la luz transmitida. Presentan un brillo metálico verdoso a la luz reflejada.

Enterobacter aerogenes: Grandes de 4 a 6 mm de diámetro. Elevadas y mucoides, café grisáceas en el centro a la luz transmitida. Generalmente no tienen brillo metálico y con tendencia a unirse.

Salmonella y Shigella: Transparentes, amarillas hasta incoloras.

Proteus sp.: Semejantes a Salmonella y Shigella

Staphylococcus aureus coagulosa positivos:

Puntiformes incoloros

AGAR VERDE BRILLANTE

Es un medio altamente selectivo empleado para aislar Salmonella (excepto S. typhi y Shigella), de heces, leche, y otros alimentos de importancia sanitaria.

El medio, de un color café al principio, pasa a rojo durante la incubación a 37°C. Los gérmenes que degradan la lactosa son inhibidos completamente, presentando algunas de las cepas no inhibidas, colonias verde amarillento, opacas y rodeadas de un halo amarillento. Los microorganismos lactosa negativos, como Salmonella y ocasionalmente Proteus, forman colonias de color rosa pálido, transparentes y rodeadas de un halo rojo brillante. Algunas colonias de Proteus forman colonias rojas.

AGAR SULFITO Y BISMUTO

Es un medio altamente selectivo para aislar Salmonella typhi, así como otros bacilos entéricos, de heces, aguas negras, aguas de bebidas y diversos alimentos.

En presencia de H₂S, las Salmonellas reducen las sales de hierro y bismuto a sulfuro de hierro negro que se deposita en la colonia, y a bismuto metálico que se precipita en el medio de cultivo forman un halo brillante pero menos obscuro alrededor de la misma.

Tanto el color negro de la colonia como el brillo metálico del halo aumentan si la placa se deja 2 a 3 horas a temperatura ambiente y en presencia de la luz.

Las colonias de coliformes, Shigella (que generalmente no desarrollan), y Proteus presentan un color verde, café o negras y no ennegrecen el medio.

Características de las colonias

Salmonella typhi: Elevadas con centro negro, bordes claros y traslúcidas. Colonias en "ojo de pescado". Se vuelven uniformemente negras a las 48 horas. Entre las 18 a 24 horas se forma en el medio de cultivo un halo negro grisáceo y con brillo metálico rodeando a la colonia.

Otras Salmonellas: Elevadas y generalmente más pequeñas que la Salmonella typhi. Negras si producen H_2S . Halo negro grisáceo con brillo metálico después de 36 a 48 horas de incubación. Café pardas si forman H_2S verdosas si no son productoras de sulfuros como Salmonella paratyphi A. Pequeñas y pardas como Salmonella choleraesuis y Salmonella gallinarum, que son bastante inhibidas.

Arizona y citrobacter: Grandes elevadas, negras grisáceas, como gotas de plomo. Halo gris negro y con brillo metálico. Las cepas no fermentadoras de la lactosa varían del verde al café.

Coliformes y Proteus: Desarrollo ocasional. Colonias que pueden ser verdes, cafés y aún negras. Estas últimas más pequeñas que Salmonella typhi y por lo general sin brillo metálico en el medio que rodea a la colonia.

Shigella; Casi todas inhibidas. En el caso de que crezcan Sh. flexniri, Sh. sonnei, son de color café, deprimidas en el centro y con bordes elevados (crateriformes)

AGAR CITRATO DE SIMMONS

Se usa para diferenciar las bacterias entéricas. Gram negativas, basándose en la utilización del citrato. Es recomendable para la diferenciación de coliformes aislados del agua. Solamente los microorganismos que utilizan el citrato como única fuente de carbono, crecen en el agar citrato de Simmons.

La aparición de un crecimiento visible generalmente va acompañado de un cambio alcalino (azul) del indicador

Negativos	Positivos
Escherichia	Arizona
Shigella	Citrobacter
Minia (- 0 +)	Salmonella
Listeria	Enterobacter
	Klebsiella
	Serratia

AGAR DE HIERRO Y TRIPLE AZUCAR (TSI)

Medio diferencial muy usado en la identificación de Enterobacterias patógenas y saprófitas. Su modo de acción es semejante al medio de Kligler que contiene dos azúcares, adicionado además con 1% de sacarosa. Esto permite el reconocimiento y exclusión de Proteus.

Hafnia y Providencia no fermentan la lactosa o lo hacen muy lentamente y sí en cambio fermentan la sacarosa con bastante rapidez lo cual permite excluir a ese grupo de bacterias de Salmonella y Shigella.

MEDIO SIM

Es un medio semisólido usado rutinariamente en la diferenciación e identificación de cultivos puros de Enterobacterias y que detecta la producción de sulfuros, indol y movilidad de las mismas.

Un ennegrecimiento nos indica producción de sulfuros. Desarrollo sólo a lo largo de la punción, inmovilidad. La movilidad del germen se denota por una turbidez difusa en el seno del medio, y la producción de indol por medio de los reactivos de Ehrlich o de Kovacs que dan una coloración rojo púrpura si es positiva.

MEDIO MIO

Se utiliza para la identificación de Enterobacterias sobre la base de movilidad, la producción de ornitina descarboxilasa o de indol. Las reacciones son similares al medio SIM, para movilidad e Indol, solo que antes de agregar el reactivo de Kovacs se lee la ornitina descarboxilasa que es indicada por el color púrpura del medio. La ornitina negativa produce un color amarillo en el fondo que puede ser púrpura al final.

CALDO UREA

Se emplea para la identificación de bacterias, particularmente para diferenciar los miembros del género Proteus de la Salmonella y Shigella. Se usa para la determinación de la actividad de la ureasa en microorganismos de la familia Brucella, Bacillus, Sarcina y Mycobacterium.

CALDO DE LISINA

Se usa para la identificación de microorganismos, en especial de bacilos entéricos, basándose en la descarboxilación de la lisina. Los bacilos entéricos producen ácido en la fermentación inicial de dextrosa ocasionando un cambio de color amarillo. Los cultivos que también producen descarboxilación de la lisina, forman cadaverina y el caldo vuelve a tomar el color púrpura alcalino. Por tanto un color amarillo después de 24 horas indica un resultado negativo. El color púrpura, es un resultado positivo que indica la descarboxilación de la lisina.

2.5. RECUENTO DE BACTERIAS MESOFILICAS AEROBIAS POR VACIADO EN PLACA (20)

PROCEDIMIENTO:

1. Homogeneizar la muestra agitando vigorosamente el recipiente
2. Transferir 10 ml a un frasco con 90 ml de diluyente. Agitar.
3. Efectuar diluciones usando alcuotas de 1 ml en tubos de 9ml de diluyente, hasta la quinta dilución.
4. Inocular 1 ml de las diluciones en cajas Petri estériles
5. Agregar a cada caja 12 - 15 ml del medio agar cuenta estándar

fundido y mantenido a $43^{\circ} - 45^{\circ}\text{C}$ en baño maría.

6. Incorporar el inóculo al medio por rotación de la caja sobre una superficie lisa. Dejar solidificar.
7. Incubar a 35°C durante 24 horas
8. Contar todas las colonias en aquellas cajas que contengan menos de 300; una mitad representativa de la caja si contiene aproximadamente 301 a 500 colonias y multiplicar el resultado por 2; una cuarta parte representativa de la caja si el número en toda la placa es aproximadamente de 501 a 800 y multiplicar por 4 y contar los cuadros mayores de la cuadrícula del contador al azar y sacar la media aritmética y multiplicar por 65 el total contado, si el número es mayor de 800.
9. Se reporta con relación a 1 ml de muestra original.

2.6. RECUENTO DE ORGANISMOS COLIFORMES (28)

PROCEDIMIENTO:

1. Inocular 1 ml de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} a cajas de Petri
2. Agregar de 12 a 15 ml del medio Agar de Bilis y Rojo violeta fundido y conservado a $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
3. Dejar solidificar
4. Agregar 4 ó 5 ml del medio y extenderlo ladeando la caja de manera que cubra completamente la superficie del medio.
5. Dejar solidificar
6. Incubar a 35°C durante 18-24 horas
7. Efectuar la lectura de las cajas. Contar como coliformes las colonias de color rojo oscuro que exhiben un halo de precipitación típico y generalmente de un tamaño aproximado de 0.5 mm en placas con escasa población.

Cuando las cajas presentan un gran número de colonias, las correspondientes a los organismos coliformes en ocasiones presentan características un tanto atípicas, con menos de 0.5 mm de diámetro.

8. Multiplicar por la inversa de la dilución para obtener el número de colonias /ml.

NOTA: Las colonias más representativas se sembraron por estría en placas con medio agar eosina azul de metileno (EMB)

Se incubaron durante 24 horas a 37°C y se hicieron pruebas bioquímicas de las colonias representativas de las bacterias coliformes. La interpretación de las pruebas bioquímicas se hizo comparando los resultados con la tabla 3.1.

2.7. INVESTIGACION DE SALMONELLA (20,28)

PROCEDIMIENTO:

a) Preenriquecimiento:

1. Inocular 25 ml. de la muestra a 225 ml de caldo lactosado, homogeneizar
2. Incubar a 35°C durante 24 horas

b) Enriquecimiento:

1. Inocular 1 ml de la muestra incubada en 10 ml de caldo selenito cistina y 1 ml en 10 ml de caldo tetrationato (adicionar 0.2ml de una solución yodo-yoduro de potasio)
2. Incubar a 43°C durante 18-24 horas

c) Aislamiento:

1. Inocular a partir de los tubos una placa de Agar-verde-brillan-

te y/o de agar sulfito de bismuto, Agar XLD, o agar SS.

2. Por medio de una asa sembrar por estrfa de manera de obtener colonias bien aisladas.
3. Incubar a 35^oC durante 24 horas y observar cuidadosamente las colonias desarrolladas.
4. Seleccionar colonias sospechosas de pertenecer al género Salmonella.
5. Si no se observan colonias sugestivas del género o no hay desarrollo, proseguir la incubación 24 horas más.

d) Identificación Bioqufmica:

1. Seleccionar al menos 2 colonias típicas sospechosas de cada placa, que se encuentren bien aisladas.
2. Transferir de cada una, con asa recta, a una serie de tubos de cultivo que consiste en agar TSI, agar LIA, agar SIM, caldo su-r-raco y caldo manitol sin volver a tocar la colonia.
3. Incubar a 35^oC por 24 horas
4. Interpretar los resultados

Fig. 3.1
 DIAGRAMA DE LAS TECNICAS EMPLEADAS EN EL ANALISIS BACTERIOLOGICO

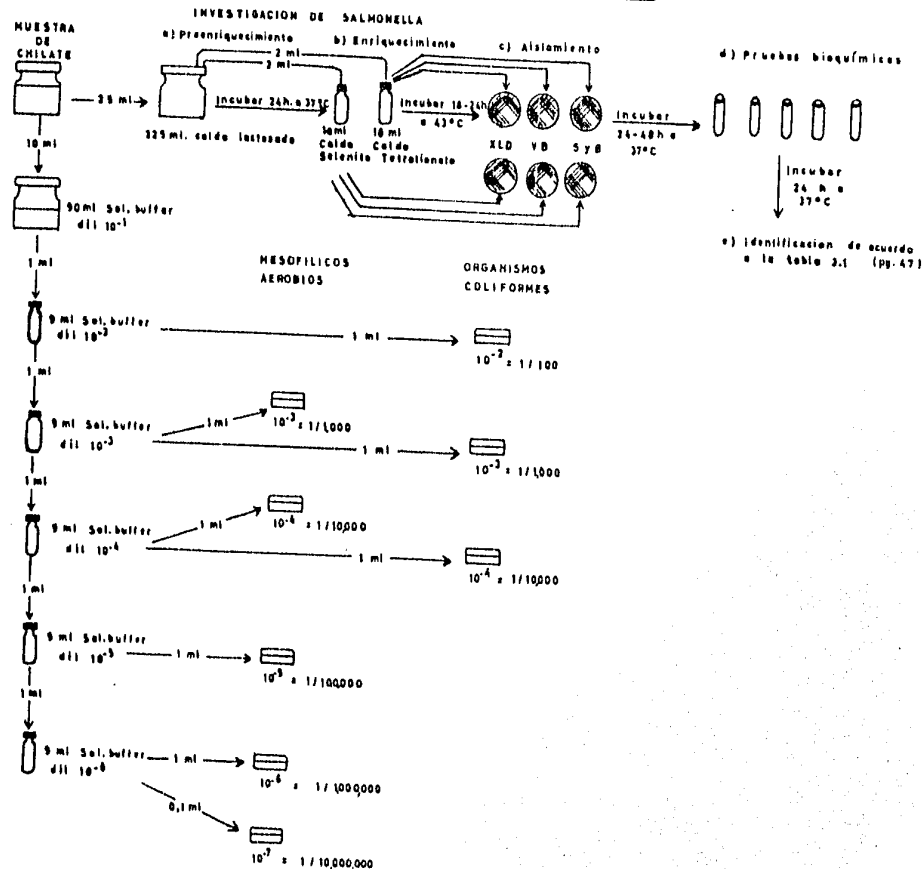


Tabla 3.1
 DIFERENCIACION DE ENTEROBACTERIAS
 MEDIANTE PRUEBAS BIOQUIMICAS.

	Escherichia	Shigella	Salmonella	Arizona	Citrobacter	Klebsiella	Enterobacter cloacae	Enterobacter aerogenes	Hafnia	Serratia	Proteus vulgaris	Proteus mirabilis	Proteus morganii	Proteus rettgeri	Providencia
Indol	+	-/+	-	-	-	-/+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Rojo de metilo	+	+	+	+	+	-	-	-	+/-	-/+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	+	+	+	+/-	+	-/+	-/+	-	-	-
Citrato de Simmons	-	-	d	+	+	+	+	+	+/-	+	d	+	-	+	+
Gas H ₂ S (TSI)	-	-	+	+	+/-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Ureasa	-	-	-	-	d ^w	+ ^w	+ ^w	-	-	d ^w	+	+	+	+	-
Movilidad	+/-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lisina	d	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
Ornitina	d	d	+	+	d	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Gas a partir de glucosa	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	+	d	-/+	-
Lactosa	+	-	-	d	d	+	+	+	-/+	-/+	-	-	-	-	-
Sacarosa	d	-	-	-	d	+	+	+	d	+	+	d	-	d	d

+ , 90% de aislamientos positivos; - , 90% de aislamientos negativos; d, positiva tardía (3-5 días); w, reacción débil; +/-, mayoría positiva, pero menos del 90% positivas; -/+, mayoría negativa, pero menos del 90% negativas

IV. ANALISIS FISICOS Y QUIMICOS

Debido a que el Chilate, como ya se mencionó, es una bebida que se elabora a nivel casero, se hizo un análisis de las características bromatológicas del producto para conocer la cantidad de nutrientes presentes en él.

Los parámetros bromatológicos que se midieron, fueron los siguientes:

- pH
- Densidad
- °Brix
- Acidez
- Proteínas
- Grasas
- Sólidos
- Cenizas

IV.1. pH (18)

Para determinar el pH se utiliza un potenciómetro, debidamente calibrado. El potenciómetro debe calibrarse con frecuencia. Para esto, se utilizan dos soluciones amortiguadoras, una con pH de 4 y otra con un pH de 7.

1.2. Material y Equipo

Potenciómetro

Vaso de precipitado de 100 ml

1.3. Procedimiento:

- 1) Se vierte la muestra en un vaso
- 2) Se conectan los electrodos en la muestra
- 3) Se toma la temperatura de la muestra. Conforme a su temperatura se ajusta el aparato con el botón correspondiente.
- 4) Se enciende el aparato y se escoge la sensibilidad
- 5) Se toma la temperatura cuando la aguja se haya estabilizado
- 6) Se apaga el potenciómetro
- 7) Se sacan los electrodos de la muestra. Se lavan y se guardan en su estuche.

IV.2. DENSIDAD

2.1. Fundamento del método (18)

La densidad de una sustancia es el peso de un mililitro de la misma.

Generalmente se determina utilizando un densímetro o picnómetro, haciendo la lectura a 20°C, aunque también puede efectuarse a otras temperaturas pero corrigiendo la lectura a 20°C. La densidad evalúa la concentración del líquido y en menor grado su composición.

2.2. Material

Probeta de vidrio de 250 ml

Densímetro con termómetro acoplado

2.3. Procedimiento:

- 1) Se coloca la muestra ya homogénea, en la probeta, sobre una su-

perficie plana y horizontal

- 2) Se introduce el densímetro en la parte central, evitando que se adhiera a las partes internas de la probeta.
- 3) Se deja transcurrir aproximadamente 30 segundos y se hace la lectura, evitando el error de paralaje.

Se corrige la lectura en el densímetro de acuerdo con la temperatura de la muestra al hacer la medición. La escala correspondiente está considerada para determinaciones a 20°C. Haciendo las correcciones adecuadas cuando la determinación no se hace a esta temperatura, se suma o se resta 0.0002 a la densidad hallada, por cada grado de temperatura respectivamente superior o inferior a 20°C.

IV.3. °Brix

3.1. Fundamento del método: (18)

La concentración de sacarosa se expresa con el grado Brix. A una temperatura de 20°C, el grado Brix equivale al porcentaje de peso de la sacarosa contenido en una solución acuosa. Si a 20°C una solución tiene 60°Brix, esto significa que la solución contiene 60% de sacarosa.

3.2. Equipo:

Sacarímetro

3.3. Procedimiento:

- 1) Se mantiene la temperatura de los primas a 20°C

- 2) Se abren los prismas y se coloca una gota de la solución
- 3) Se cierran los prismas
- 4) Se abre la entrada de luz
- 5) Se procede a hacer la lectura.

IV.4. ACIDEZ

4.1. Fundamento del método (18)

La acidez titulable es el porcentaje de peso de los ácidos contenidos en el producto. Se determina por medio de titulación, neutralizando los iones de hidrógeno del ácido con una solución de hidróxido de sodio de concentración conocida.

4.2. Material y equipo:

- a) Bureta graduada
- b) Soporte universal
- c) Pinzas para bureta
- d) Matraces erlenmeyer de 300 ml
- e) Pipetas graduadas

4.3. Procedimiento:

- a) Se llena una bureta con una solución de NaOH 0.1 N.
- b) Se introducen en un matraz 5 gr. de muestra
- c) Se adicionan 5 gotas de fenolftaleina como indicador
- d) Se adiciona gota a gota la solución de hidróxido de sodio, agitando la muestra
- e) Continuar la titulación hasta que aparezca un color rosa tenue que permanezca por más de 20 segundos

f) Tomar la lectura de la bureta y calcular de acuerdo con la fórmula siguiente.

4.4. Cálculos:

$$\% \text{ de acidez} = \frac{A \times B \times C \times 100}{D}$$

En donde:

A - Cantidad en ml de álcali usado

B - Normalidad del NaOH usado

C - Miliequivalente expresado en gramos del ácido predominante en el producto

D - Peso de la muestra en gramos

IV.5. PROTEINAS

5.1. Fundamento del método de Kjeldahl-Gunning (27)

Este método se basa en la descomposición de los compuestos del nitrógeno orgánico por ebullición con ácido sulfúrico. El hidrógeno y el carbón de la materia orgánica se oxidan hasta CO_2 y agua. El ácido sulfúrico se transforma en SO_2 , el cual reduce el material nitrogenado a amoníaco. Este amoníaco se libera después por la adición de NaOH, y se destila recibiendo en una solución al 4% de ácido bórico. Se titula el nitrógeno amoniacal con una solución valorada de ácido. En este método de Kjeldahl-Gunning se usa el sulfato de cobre como catalizador y el sulfato de sodio para aumentar la temperatura de la mezcla y acelerar la digestión.

5.2. Material y equipo:

- a) Matraces Kjeldahl de 800 ml
- b) Digestor y destilador Kjeldahl
- c) Matraces Erlenmeyer de 500 ml
- d) Buretas
- e) Probetas
- f) Perlas de vidrio

5.3. Reactivos:

- a) Acido sulfúrico concentrado
- b) Sulfato de cobre
- c) Granalla de zinc
- d) Solución de NaOH al 50%
- e) Sulfato de sodio anhidro

5.4. Procedimiento

- a) Pesar un gramo de muestra en un matraz de Kjeldahl
- b) Añadir 2 gramos de sulfato de cobre, 10 gramos de sulfato de sodio anhidro, 25 ml de ácido sulfúrico concentrado y unas perlas de vidrio
- c) Colocar el matraz en el digestor y calentar hasta que todo el material esté carbonizado;
- d) Continuar calentando hasta que la solución esté clara y dejar 30 minutos más.
- e) Enfriar y añadir 200 ml de agua para disolver completamente la muestra, agregar 6 ó 7 granulos de zinc y 50 ml de NaOH al 50%

- f) Conectar el aparato de destilación, recibir el destilado en un matraz Erlenmeyer de 500 ml que contenga 50 ml de ácido bórico al 4% y 5 gotas de rojo de metilo como indicador, cuidar que la parte terminal del tubo se introduzca en el ácido. Destilar hasta que haya pasado todo el amoniaco (aproximadamente 200 ml)
- g) Quitar el matraz y titular con HCl 0.1N el destilado

5.5. Cálculos

$$\% \text{ de N} = \frac{V \times N \times 0.014 \times 100}{P}$$

En donde:

V - ml de HCl valorado utilizados en la titulación

N - Normalidad de la solución valorada de HCl (0.08686)

P - Pesos de la muestra

Calcular el por ciento de protefnas multiplicando por el factor correspondiente.

Nota: El contenido de nitrógeno de diferentes protefnas es aprox. 16%, por lo que multiplicando el % de nitrógeno por 6.25 se obtiene la cantidad de protefnas presente en el alimento.

IV.6. GRASAS

6.1. Fundamento del método de Soxhlet (27)

El método de Soxhlet utiliza un sistema de extracción cíclica de

los componentes solubles en eter que se encuentran en el alimento.

6.2. Material y equipo

- a) Extractor Soxhlet
- b) Cartucho o dedal de tamaño adecuado para el extractor
- c) Parrilla eléctrica de placa caliente con termostato
- d) Estufa de 100 - 110°C con termostato
- c) Balanza analítica

6.3. Reactivos

- a) Eter etílico anhidro

Nota: En esta determinación y por carecer de eter etílico se utilizó como solvente tetracloruro de carbono.

6.4. Procedimiento

- a) Pesar 2 gramos de muestra y colocarlos en el cartucho o dedal
- b) Transferir el cartucho dentro del extractor soxhlet

En la parte inferior ajustar un matraz con cuerpos de ebullición (llevados previamente a peso constante). Colocar el refrigerante.

- c) Añadir el solvente por el extremo superior del refrigerante en cantidad suficiente para tener 2 ó 3 descargas del extractor
- d) Hacer circular el agua por el refrigerante y calentar hasta que se tenga una frecuencia de unas 2 gotas por segundo
- e) Efectuar la extracción por 4 ó 5 horas. Suspender el calentamiento, quitar el extractor del matraz y dejar caer una gota del solvente del extractor a un papel o vidrio de reloj, si al

evaporarse el éter se observa una mancha de grasa, ajustar el soxhlet de nuevo al matraz y continuar la extracción. En caso contrario, evaporar suavemente el éter del matraz y secar a 100° hasta peso constante.

6.5. Cálculos

$$\% \text{ Extracto etereo} = \frac{P_0 - P_1 \times 100}{M}$$

En donde:

P_0 - Peso del matraz con grasa

P_1 - Peso del matraz sin grasa

M - Peso de la muestra.

IV.7. SOLIDOS (MATERIA SECA Y HUMEDAD)

7.1. Fundamento del método (27)

Humedad es la pérdida de peso que sufre un alimento al calentarlo a una temperatura no más alta que la de ebullición del agua. Generalmente se considera que ésta pérdida corresponde al agua, pero actualmente se sabe que esta es la pérdida total de materia volátil, expulsada a la temperatura utilizada en el ensayo.

7.2. Material y equipo:

- a) Desecador de vidrio con un desecante efectivo
- b) Horno de 100°C con termostato
- c) Crisoles o cápsulas de porcelana
- d) Pinzas para crisol
- e) Balanza analítica

7.3. Procedimiento:

- a) En una cápsula de porcelana a peso constante colocar de 2 a 4 gramos de muestra
- b) Colocar en la estufa a 95°C durante 4 horas
- c) Transferir al desecador hasta que se alcance la temperatura ambiente
- d) Pesar la cápsula con la muestra desecada

7.4. Cálculos

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(P_m - P_s) \times 100}{M}$$

En donde:

P_m - Peso de la cápsula y la muestra húmeda en gramos

P_s - Peso de la cápsula y la muestra seca en gramos

M - Peso de la muestra en gramos

IV.8 CENIZAS

8.1. Fundamento del método (27)

Las cenizas son los residuos que se obtienen de calcinar un alimento a una temperatura de 650°C. No siempre el residuo representa toda la materia inorgánica presente en la muestra, puesto que algunas sales sufren volatilización o reducción a esta temperatura. Es aplicable a todas las muestras de alimentos sólidos. Para los líquidos se les determina primero los sólidos totales y sobre este material aplicar la técnica descrita.

8.2. Material y equipo:

- a) Crisol de porcelana
- b) Parrilla eléctrica con regulador de calor
- c) Pinzas para crisol
- d) Desecador
- e) Mufla
- f). Balanza analítica

8.3. Procedimiento:

- a) En un crisol a peso constante, pesar de 3 a 5 gramos de muestra.
- b) Colocar en una parrilla y quemar lentamente el material hasta que ya no desprenda humos, evitando que se proyecte fuera del crisol.
- c) Llevar el crisol a una mufla y efectuar la calcinación a 600°C durante 3 horas por lo menos
- d) Dejar enfriar en la mufla y transferirlo al desecador para su completo enfriamiento
- e) Pesar el crisol

8.4. Cálculos

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(P_0 - P_1) \times 100}{M}$$

En donde:

P₀ - Peso del crisol con las cenizas

P₁ - Peso del crisol vacío

M - Peso de la muestra en gramos

V. RESULTADOS

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ANALISIS BACTERIOLOGICO
 TABLA 5.1.

RECuento DE ORGANISMOS MESOFILICOS
 AEROBIOS

<u>Muestra</u>	<u>No.de Col/ml</u>
1	2 600 000
2	600 000
3	1 950 000
4	840 000
5	2 900 000
6	520 000
7	300 000
8	540 000
9	2 140 000
10	87 000
11	127 000
12	310 000
13	19 000
14	250 000
15	19 000 000
16	33 000
17	68 000
18	7 000 000
19	240 000
20	16 000 000
21	21 000 000
22	980 000
23	4 400 000
24	600 000
25	14 000 000
26	126 000

RECuento DE ORGANISMOS MESOFILICOS

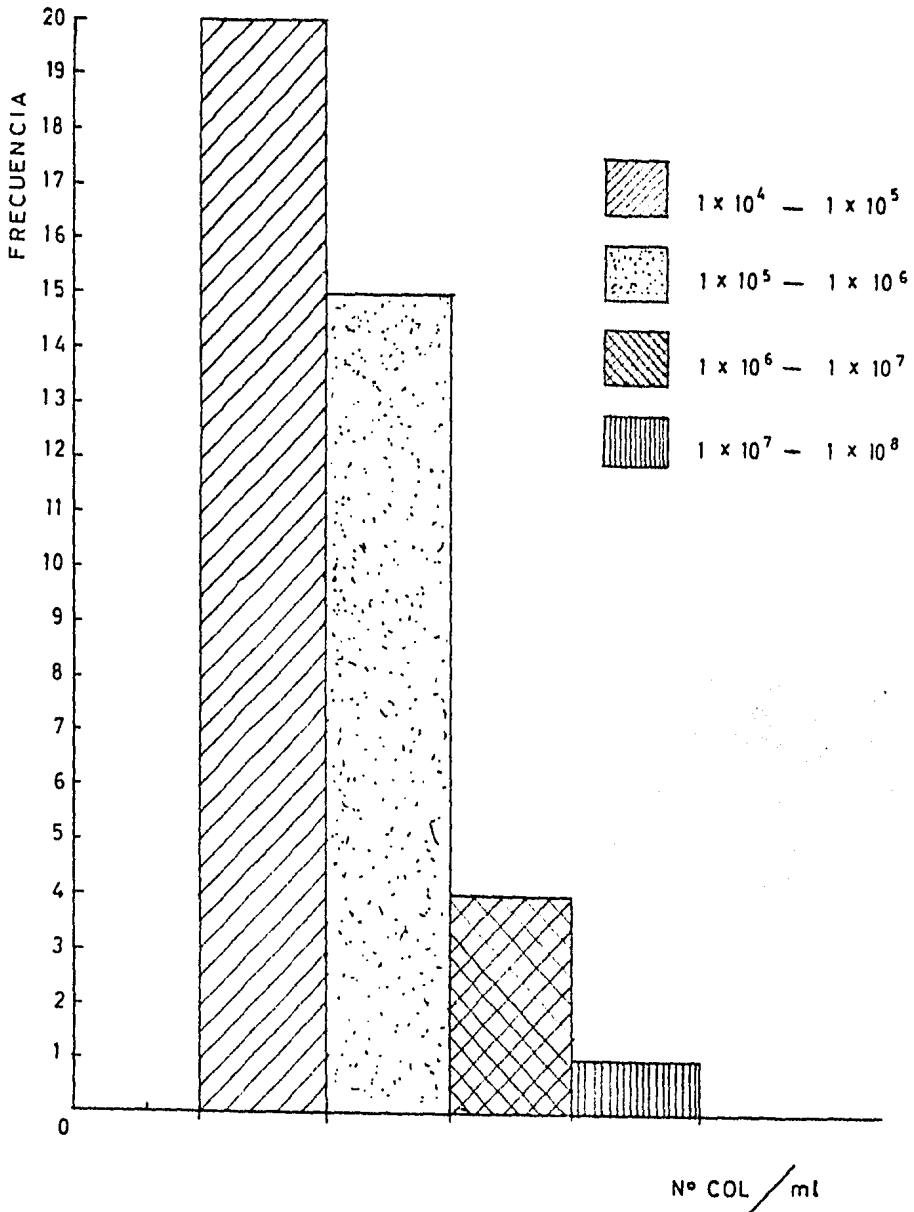
AEROBIOS

<u>Muestra</u>	<u>No. de Col/ml.</u>
27	280 000
28	160 000
29	400 000
30	5 000 000
31	1 600 000
32	500 000
33	1 700 000
34	4 700 000
35	1 100 000
36	10 700 000
37	1 500 000
38	8 800 000
39	1 600 000
40	1 000 000

PROMEDIO: 3,391.750 col/ml

MEDIANA: 990,000 col/ml

HISTOGRAMA DE FRECUENCIA DEL NUMERO DE COLONIAS DE ORGANISMOS MESOFILICOS AEROBIOS POR MILILITRO DE CHILATE.



RECUENTO DE ORGANISMOS COLIFORMES

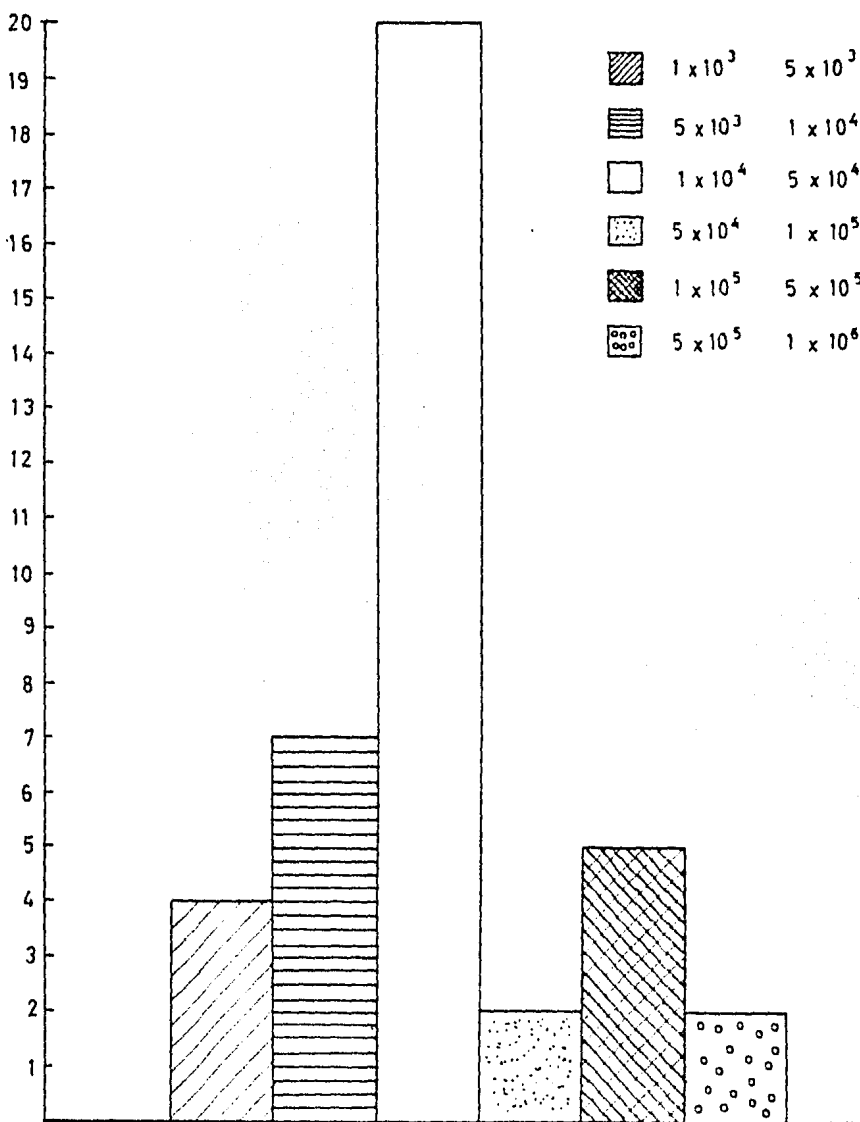
<u>MUESTRA</u>	<u>No. de col/ml</u>
1	6 000
2	290 000
3	3 400
4	640 000
5	640 000
6	2 200
7	13 800
8	23 000
9	34 000
10	12 000
11	27 000
12	16 000
13	8 800
14	10 000
15	5 000
16	9 000
17	2 800
18	200 000
19	31 000
20	47 000
21	4 200
22	30 000
23	37 000
24	140 000
25	130 000
26	17 800
27	49 000
28	40 000
29	40 000
30	9 000
31	7 000
32	5 000
33	67 000
34	50 000
35	34 000

36	100 000
37	17 000
38	30 000
39	14 000
40	13 000

PROMEDIO: 70,375 col/ml.

MEDIANA: 25,000 col/ml.

HISTOGRAMA DE FRECUENCIA DEL NUMERO DE COLONIAS DE ORGANISMOS COLIFORMES POR MILILITRO DE CHILATE.



IDENTIFICACION BIOQUIMICA

MUESTRA	MICROORGANISMO
1	<u>Enterobacter. aerogenes</u>
2	<u>Klebsiella. ozoenae. Serratia sp.</u>
3	<u>Klebsiella. ozoenae. E. Coli</u>
4	<u>Klebsiella Sp. Paracolom</u>
5	<u>E. Coli. Klebsiella sp. Paracolom</u>
6	<u>E. Coli. Serratia sp. Enterobacter Sp.</u>
7	<u>Enterobacter sp.</u>
8	<u>Klebsiella Sp. Serratia. Enterobacter</u>
9	<u>Enterobacter Sp.</u>
10	<u>Enterobacter aerogenes</u>
11	<u>Klebsiella ozoenae</u>
12	<u>Klebsiella ozoenae</u>
13	<u>Klebsiella sp.</u>
14	<u>Klebsiella sp. Enterobacter sp.</u>
15	<u>Enterobacter sp.</u>
16	<u>Enterobacter sp. Serratia</u>
17	<u>Citrobacter Sp. Enterobacter sp.</u>
18	<u>Enterobacter sp. Serratia</u>
19	<u>Enterobacter sp. E.Coli. Klebsiella sp.</u>
20	<u>Enterobacter sp. Hafnia</u>
21	<u>Klebsiella sp. Enterobacter sp.</u>
22	<u>E. Coli. Enterobacter sp. Klebsiella sp</u>
23	<u>Enterobacter sp.</u>
24	<u>Serratia</u>
25	<u>Enterobacter aerogenes</u>
26	<u>Klebsiella sp.</u>
27	<u>Klebsiella sp.</u>
28	<u>Klebsiella sp.</u>
29	<u>Enterobacter aerogenes</u>
30	<u>Enterobacter sp. Klebsiella sp.</u>
31	<u>Enterobacter sp. Klebsiella sp.</u>
32	<u>Enterobacter sp. Klebsiella sp.</u>
33	<u>Edwarsiella sp. Klebsiella sp.</u>
34	<u>Proteus mirabilis. P. vulgaris</u>
35	<u>Klebsiella sp. Enterobacter sp.</u>

- 36 E. Coli. Enterobacter sp.
- 37 Serratia sp. Enterobacter sp.
- 38 Enterobacter sp.
- 39 Enterobacter sp. Klebsiella sp.
- 40 Enterobacter sp. Klebsiella sp.

GRAFICA 5.3

HISTOGRAMA DE FRECUENCIA DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN EL CHILATE.

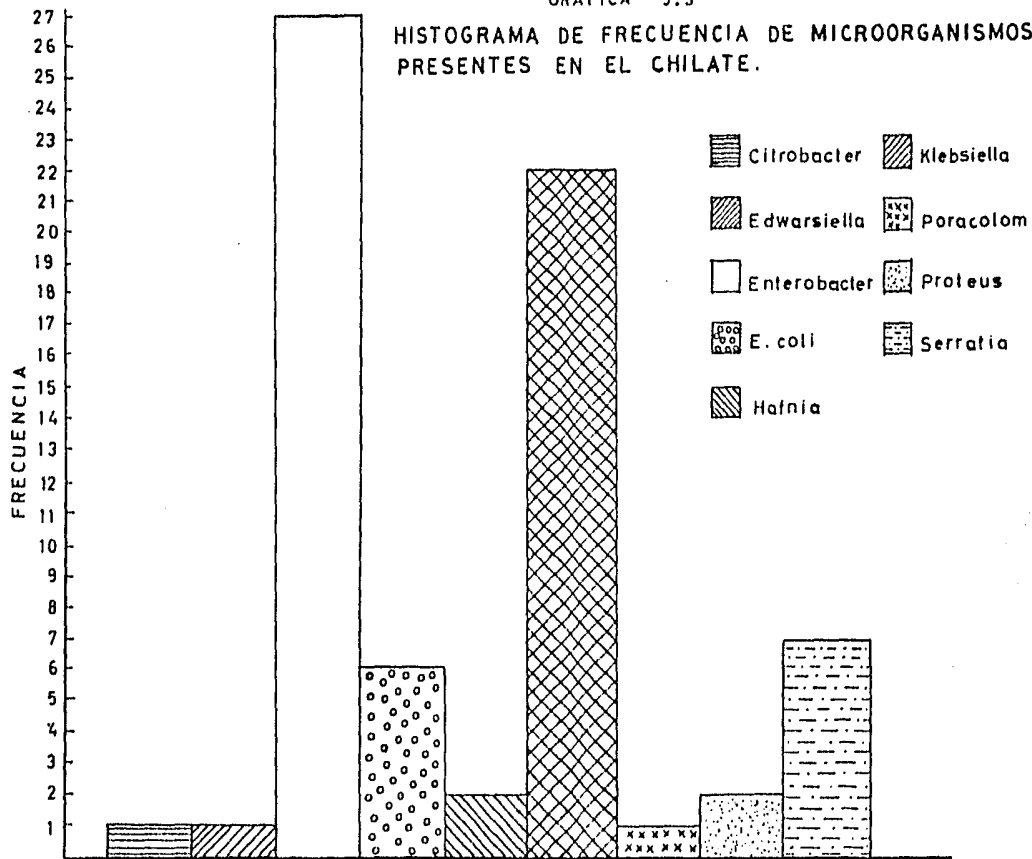


TABLA 5.4.

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ANALISIS
FISICO Y QUIMICO
TABLA 5.4.

VALORES DE PH OBTENIDOS EN DIFERENTES MUESTRAS DE
CHILATE.

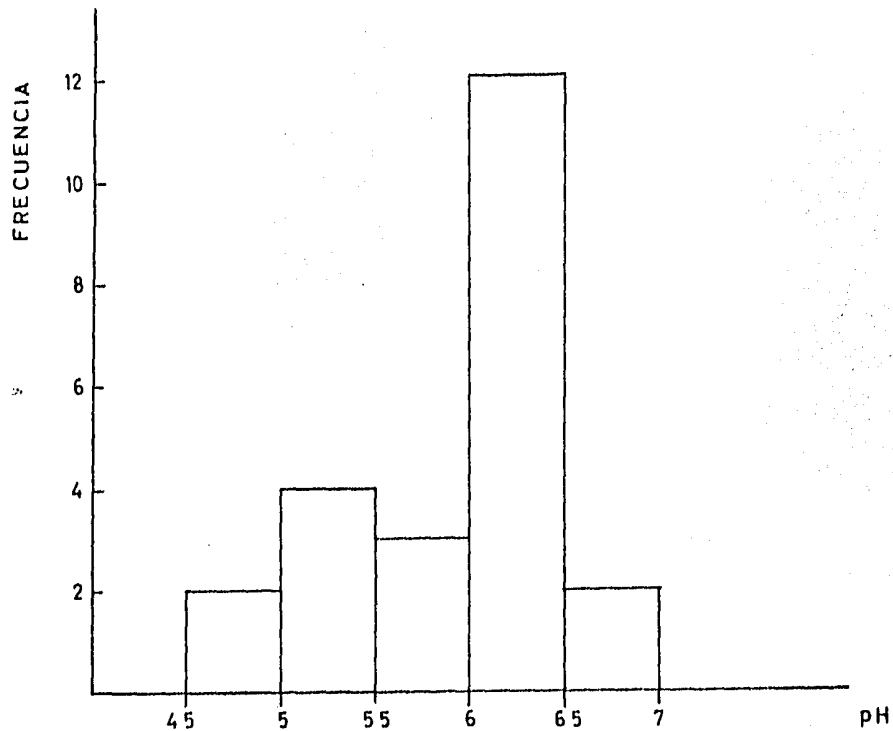
<u>MUESTRA</u>	<u>PH</u>
1	6.2
2	4.7
3	5.9
4	5.2
5	4.8
6	5.4
7	6.3
8	6.4
9	6.7
10	6.5
11	6.7
12	6.3
13	5.9
14	5.4
15	6.4
16	6.3
17	6.1
18	6.3
19	6.0
20	6.4
21	5.9
22	6.4
23	6.1
24	5.2
25	6.5

PROMEDIO - 6.0

MEDIANA - 6.2

GRAFICA 5.4

HISTOGRAMA DE FRECUENCIA DE pH EN DIFERENTES MUESTRAS DE CHILATE.



VALORES DE DENSIDAD OBTENIDOS EN DIFERENTES MUESTRAS DE CHILATE

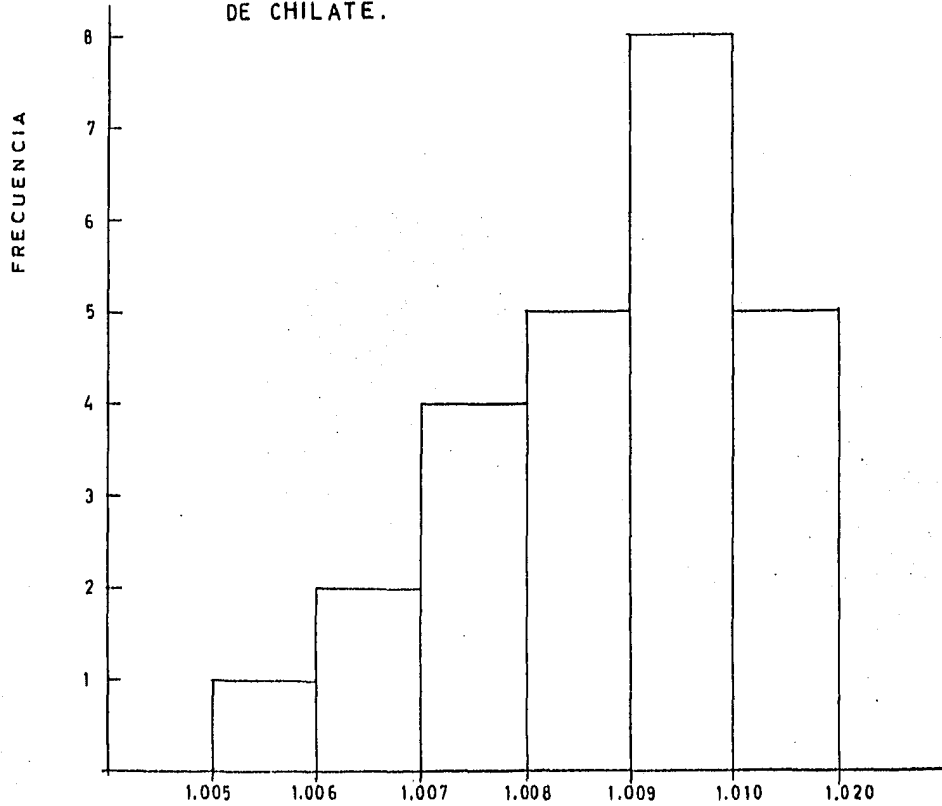
MUESTRA	DENSIDAD (g/cm ³)
1	1.0080
2	1.0070
3	1.0110
4	1.0060
5	1.0100
6	1.0092
7	1.0096
8	1.0114
9	1.0054
10	1.00...
11	1.0084
12	1.0072
13	1.0082
14	1.0090
15	1.0090
16	1.0100
17	1.0074
18	1.0090
19	1.0072
20	1.0084
21	1.0096
22	1.0100
23	1.0084
24	1.0098
25	1.0060

PROMEDIO: 1.0086 g/cm³

MEDIANA: 1.0090 g/cm³

DIAGRAMA 5.5

HISTOGRAMA DE FRECUENCIA DE DENSIDAD EN DIFERENTES MUESTRAS DE CHILATE.

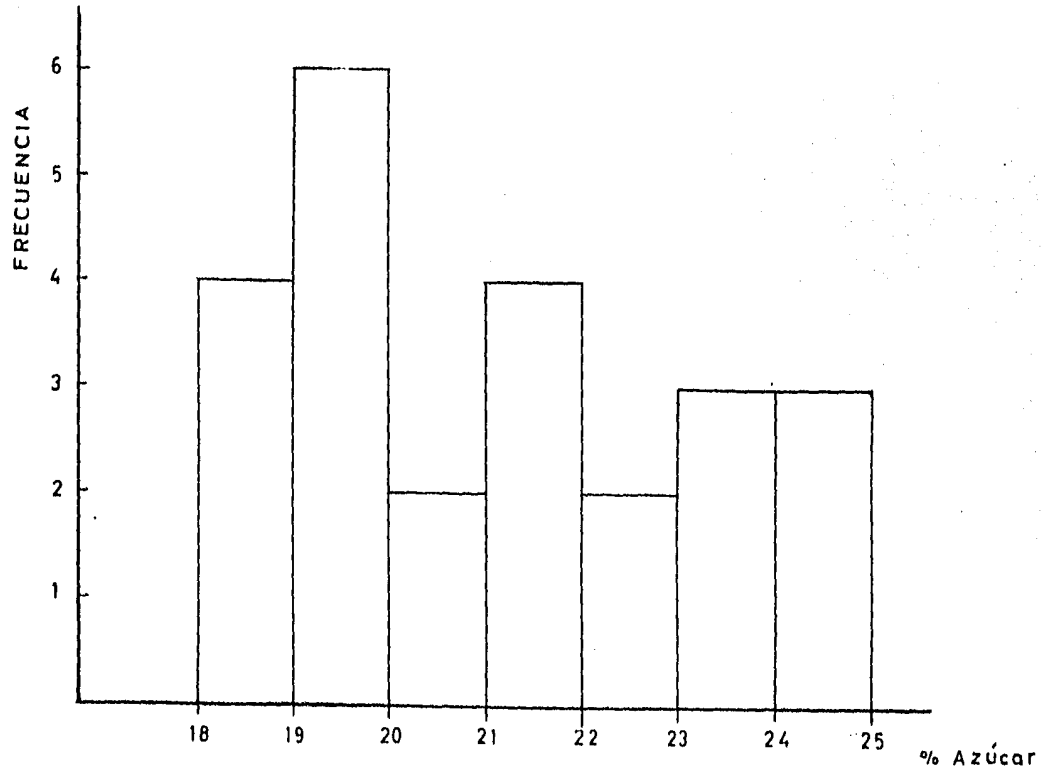


VALORES DE °BRIX OBTENIDOS EN DIFERENTES MUESTRAS
DE CHILATE

<u>MUESTRA</u>	<u>°BRIX</u> % DE AZUCAR
1	23°
2	24
3	21
4	19
5	19
6	18
7	19
8	20
9	19
10	21
11	18
12	22
13	21
14	23
15	24
16	19
17	18
18	20
19	21
20	24
21	23
22	21
23	19
24	18
25	22
PROMEDIO: 19.2% DE AZUCAR	
MEDIANA: 21 % DE AZUCAR	

GRAFICA 5.6

HISTOGRAMA DE FRECUENCIA DE % DE AZUCAR EN DIFERENTES MUESTRAS DE CHILATE.



VALORES DE ACIDEZ OBTENIDOS EN DIFERENTES
MUESTRAS DE CHILATE

<u>MUESTRA</u>	<u>ACIDEZ</u>
1	0.06252
2	0.09378
3	0.04689
4	0.03126
5	0.10941
6	0.06252
7	0.03126
8	0.04689
9	0.06252
10	0.06252
11	0.06252
12	0.07815
13	0.17193
14	0.07815
15	0.04689
16	0.04689
17	0.06252
18	0.04689
19	0.04689
20	0.04689
21	0.07815
22	0.04689
23	0.06252
24	0.03126
25	0.06252

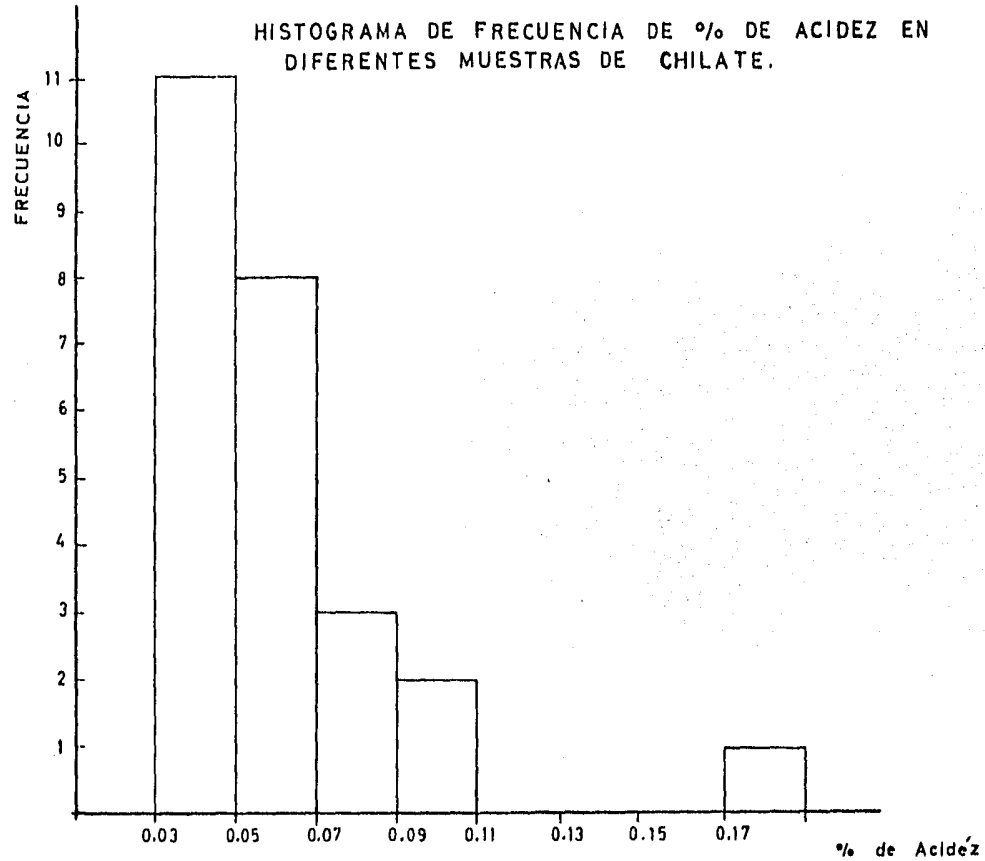
expresada en términos de ácido láctico

PROMEDIO - 0.06314%

MEDIANA - 0.06252%

GRAFICA 5.7

HISTOGRAMA DE FRECUENCIA DE % DE ACIDEZ EN
DIFERENTES MUESTRAS DE CHILATE.

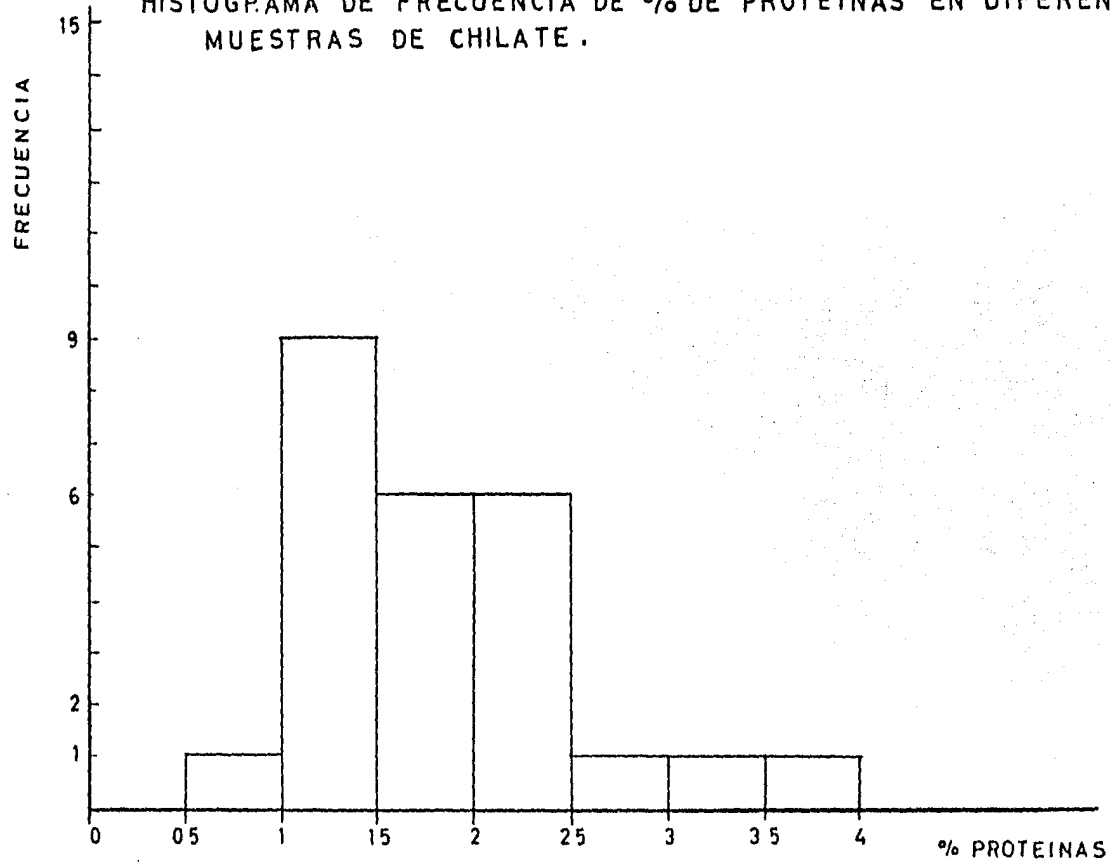


VALORES DE % DE PROTEINAS OBTENIDOS EN DIFERENTES
MUESTRAS DE CHILATE

MUESTRA	% PROTEINAS
1	1.321
2	2.280
3	1,727
4	2.128
5	3.572
6	2.280
7	0.304
8	1.368
9	1.596
10	1.216
11	0.912
12	1.292
13	1.321
14	1.0523
15	1.216
16	1.585
17	2.052
18	1.426
19	1.620
20	1.592
21	2.250
22	3.425
23	2.324
24	1.462
25	1.823
PROMEDIO 1.72588	
MEDIANA 1.5928	

GRAFICA 5.8

HISTOGRAMA DE FRECUENCIA DE % DE PROTEINAS EN DIFERENTES MUESTRAS DE CHILATE.



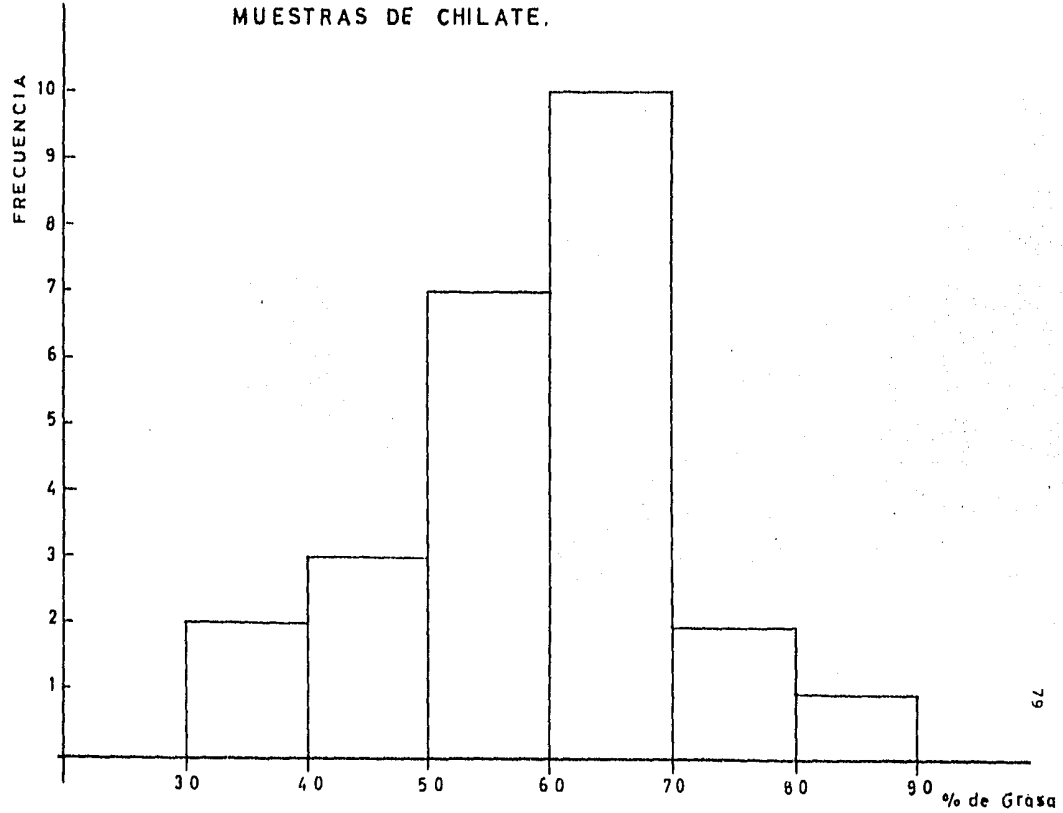
VALORES DE % DE GRASAS OBTENIDOS EN DIFERENTES
MUESTRAS DE CHILATE

<u>MUESTRA</u>	<u>% DE GRASAS</u>
1	5.1815
2	7.435
3	6.743
4	3.395
5	4.379
6	6.2130
7	6.126
8	5.533
9	3.970
10	6.495
11	8.770
12	5.146
13	6.830
14	6.789
15	5.997
16	6.432
17	6.831
18	5.894
19	6.546
20	7.854
21	4.562
22	5.324
23	6.220
24	5.243
25	4.462

PROMEDIO: 5.935 %
MEDIANA: 6.126 %

DIAGRAMA 5.9

HISTOGRAMA DE FRECUENCIA DE % DE GRASA EN DIFERENTES MUESTRAS DE CHILATE.



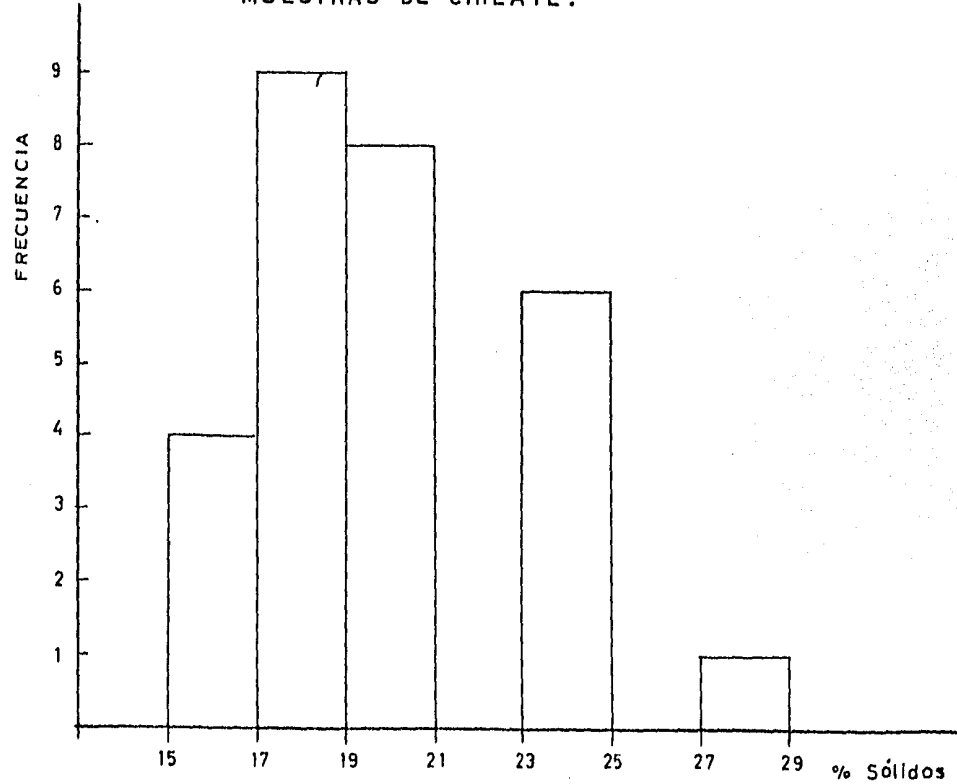
VALORES DE SOLIDOS OBTENIDOS EN DIFERENTES
MUESTRAS DE CHILATE

<u>MUESTRA</u>	<u>SOLIDOS</u>
1	18.1574
2	17.6825
3	20.3945
4	17.1951
5	15.9066
6	23.4624
7	17.8133
8	20.5439
9	24.6602
10	24.5088
11	28.7501
12	16.1630
13	19.1425
14	17.5836
15	15.0693
16	16.1718
17	18.9580
18	20.5317
19	17.1815
20	24.3521
21	19.1825
22	23.4650
23	24.5532
24	18.1837
25	17.6819

PROMEDIO - 19.8917%

MEDIANA - 18.9580%

GRAFICA 5.10
HISTOGRAMA DE FRECUENCIA DE % DE SOLIDOS EN DIFERENTES
MUESTRAS DE CHILATE.



VALORES DE CENIZAS OBTENIDOS DE DIFERENTES
MUESTRAS DE CHILATE

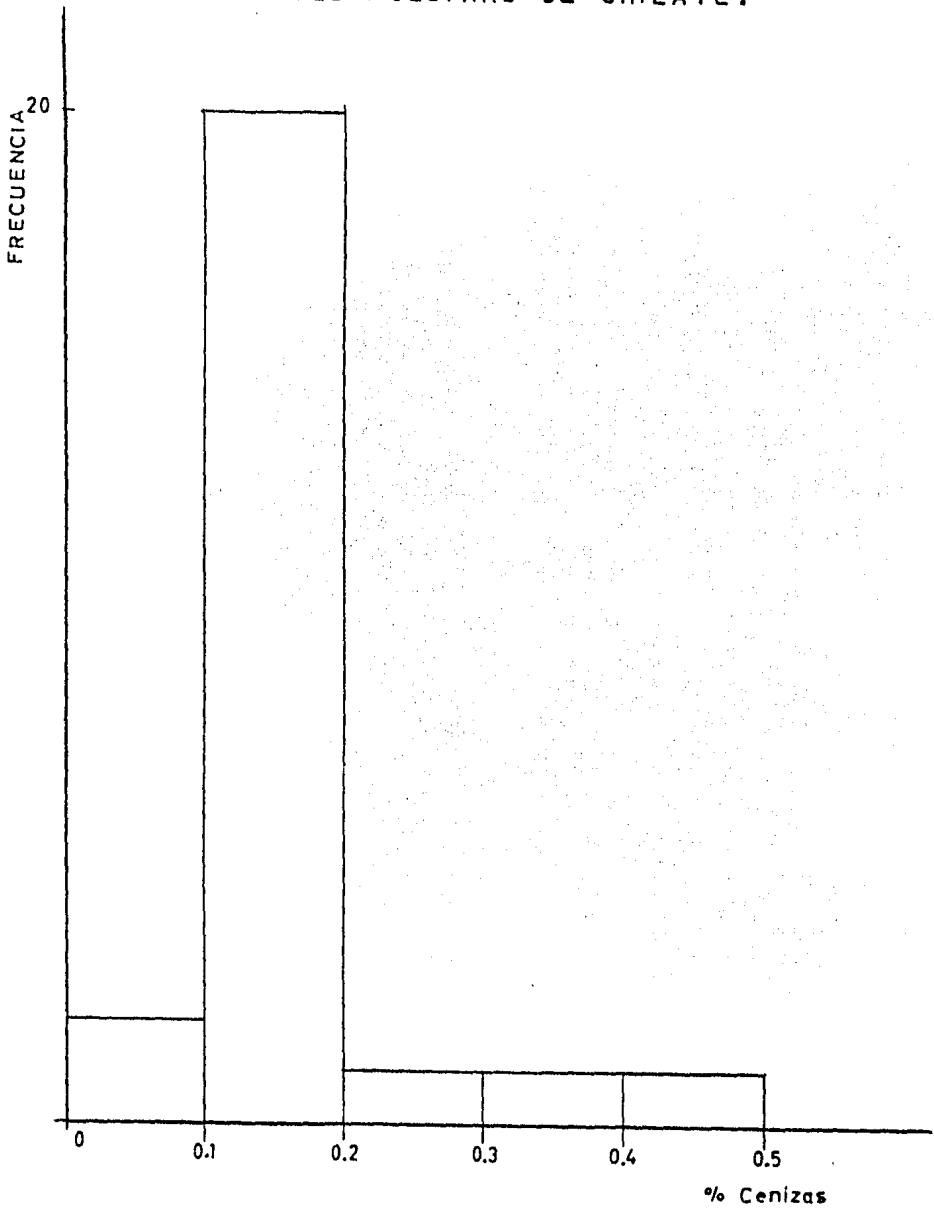
<u>MUESTRA</u>	<u>%CENIZAS</u>
1	0.1324
2	0.1274
3	0.2035
4	0.1183
5	0.1855
6	0.4793
7	0.1902
8	0.1982
9	0.0532
10	0.1220
11	0.1445
12	0.1316
13	0.1682
14	0.0901
15	0.1928
16	0.1678
17	0.1460
18	0.1578
19	0.1925
20	0.1672
21	0.1879
22	0.3912
23	0.1314
24	0.1487
25	0.1878

PROMEDIO - 0.1766%

MEDIANA - 0.1672%

GRAFICA 5.11

HISTOGRAMA DE FRECUENCIA DE % DE CENIZAS EN DIFERENTES MUESTRAS DE CHILATE.



VI. DISCUSION

El estudio bacteriológico se hizo en 40 muestras de chilate de distintos lugares de Acapulco, con los que se obtuvieron los resultados siguientes:

En la tabla 5.1. podemos observar que en la cuenta de organismos mesofílicos aerobios se tuvo un promedio de 3 391 750 col/ml y el rango de más frecuencia está comprendido entre 10 000 y 100 000 col/ml (gráfica 5.1.), siendo la muestra No. 13 la que tuvo un menor número de organismos mesofílicos aerobios (19 000 col/ml) y la muestra No. 21 la que tuvo un mayor número de organismos mesofílicos aerobios (21 000 000 col/ml). Estos datos nos demuestran que existe una elevada contaminación debida probablemente al aire, al polvo, o a las condiciones de higiene en que se elabora.

Los datos de esta bebida comparados con los del criterio microbiológico de aceptación establecida por la Secretaría de Salud para aguas frescas (menos de 10 000 col/ml de organismos mesofílicos aerobios) sería no aceptable para el consumo humano.

En la tabla 5.2. que corresponde a la cuenta de organismos coliformes, podemos observar un promedio de 70 375 col/ml, siendo la muestra No. 6 la que tuvo menor cantidad (2 200 col/ml de organismos coliformes) y las muestras 4 y 5 las que tuvieron mayor cantidad (640 000 col/ml). En la gráfica 5.2. se puede observar que el rango de más frecuencia está entre 10 000 y 50 000 col/ml.

Estos datos indican una mala calidad sanitaria ya sea por contaminación fecal en el agua o de la materia prima con que fue elaborada esta bebida o bien por malas prácticas higiénicas.

Sin embargo, debe tomarse en cuenta que el chilate contiene nutrientes que hacen que los organismos coliformes prosperen o al menos sobrevivan sin que haya tenido contacto inmediato con materia fecal. Así, cuando entran en contacto con el alimento pronto alcanzan cifras elevadas.

En la tabla 5.3. podemos observar los microorganismos que fueron encontrados en cada muestra de chilate siendo más frecuente las bacterias del género Enterobacter. La frecuencia en que fue encontrada es de 27 veces en las 40 muestras analizadas (gráfica 5.3.), es decir, un 67.5%. En segundo lugar de frecuencia se encontró Klebsiella: 22 veces, es decir, un 55%. En tercer lugar Serratia: 7 veces; E. Coli: 6 veces. Otras bacterias encontradas con menos frecuencia fueron: Hafnia: 2 veces; Proteus: 2 veces; y Citrobacter, Edwardsiella y Paracolom: 1 vez.

Todas las bacterias encontradas a excepción de Proteus son consideradas no nocivas para el hombre, sin embargo, pueden ocasionar trastornos intestinales cuando se encuentran en mayor cantidad a lo permisible en el cuerpo humano o cuando la persona que ha ingerido el alimento su sistema inmunológico se encuentra deprimido.

Uno de los propósitos de este trabajo era aislar Salmonella de esta bebida, la cual no se encontró en las 40 muestras de chilate analizadas. Probablemente su desarrollo pudo verse impedido por varios factores entre ellos: la presencia de otros microorganismos como E. coli, que ejercen un efecto antagónico con Salmonella, o bien por los ácidos presentes en esta bebida pues se sabe que el crecimiento de Salmonella se inhibe a pH ácido. Sin embargo,

no se descarta la posibilidad de aislar esta bacteria, debido a que en el chilate coexisten otras sustancias que a la vez estimulan su desarrollo, por lo que se considera necesario hacer más ensayos sobre la investigación de Salmonella en este producto.

Analizando los datos obtenidos en cada uno de los parámetros físicos y químicos en 25 muestras de chilate, podemos observar en la tabla 5.4, que los valores de pH obtenidos indican que es una bebida ligeramente ácida con tendencia a acidificarse más con el transcurso del tiempo, debido a la fermentación de los carbohidratos presentes en esta bebida. En la gráfica 5.4. se observa que el rango de mayor frecuencia comprende entre 6 y 6.5.

La tabla 5.5. corresponde a los datos obtenidos de densidad. Se observa que hay muy poca variación en la concentración de los constituyentes que forman esta bebida, siendo el intervalo de mayor frecuencia entre 1.009 y 1.010 (gráfica 5.5.)

En la tabla 5.6. se observa que los valores obtenidos de $^{\circ}$ Brix (% de sacarosa), hay poca diferencia entre una muestra y otra, lo cual indica que existe casi la misma concentración de azúcar en cada una de las muestras. Sin embargo, se observa en la gráfica 5.6., un rango de mayor frecuencia entre 19 y 20% de sacarosa.

En la tabla 5.7., referente al % de acidez, se observa que generalmente las muestras de chilate son poco ácidas. En la gráfica 5.7., se observa que el rango de mayor frecuencia está entre 0.03 y 0.05% de acidez. Se nota además que la muestra No. 13 es un poco más ácida (0.17193%), debido posiblemente a que tenía más tiempo de ser muestreada y se empezaba a fermentar.

En la tabla 5.8, correspondiente a los valores obtenidos de % de proteínas, se observa que hay poca cantidad de proteínas en esta bebida, sin embargo, puede considerarse como nutritiva en comparación con algunas otras bebidas. En la gráfica 5.8, se observa que el intervalo de mayor frecuencia está entre 1 y 1.5% de proteínas, siendo el dato más bajo el de la muestra No. 7 (0.304%), y el más alto el de la muestra No. 5 (3.572%).

En la tabla 5.9, se observan los valores obtenidos del % de grasa presente en las diferentes muestras de chilate, siendo el valor más bajo el de la muestra No. 4 (3.3956%) y el más alto el de la muestra No. 11 (8.770%). El rango de mayor frecuencia, que se observa en la gráfica 5.9, está entre 6 y 7% de grasa.

Los valores de sólidos obtenidos en diferentes muestras de chilate se observan en la tabla No. 5.10., siendo el porcentaje de sólidos más bajo el de la muestra 15 (15.0693%) y el más alto de la muestra 9 (24.6602%). En la gráfica No. 5.10, se observa que el intervalo de mayor frecuencia se encuentra entre 17 y 19% de sólidos.

Los valores de cenizas obtenidos, se observan en la tabla No. 5.11., donde podemos notar que el valor más bajo de cenizas corresponde a la muestra No. 11 (0.0532%), y el más alto se obtuvo en la muestra No. 6 (0.4793%). En la gráfica No. 5.11., se puede observar que el porcentaje de cenizas de la mayoría de las muestras de chilate se encuentra en el rango de frecuencia entre 0.1 y 0.2% de cenizas.

VII. RESUMEN Y CONCLUSIONES

En el estudio presentado se anotan generalidades sobre los constituyentes (cacao, arroz, azúcar y canela), y compuestos químicos (agua, carbohidratos, proteínas y grasas); sus propiedades físicas y químicas, así como las causas de deterioro que puede sufrir el chilate.

Se señalaron las bacterias encontradas con más frecuencia en los alimentos, sus características morfológicas y bioquímicas.

Se realizaron varios métodos bacteriológicos sensibles y reproducibles para conocer la calidad sanitaria que prevalece en este tipo de bebida; estos métodos fueron:

- a) Recuento de Organismos mesofílicos aerobios
- b) Recuento de Organismos Coliformes e Identificación
- c) Investigación de Salmonella

Se obtuvo un promedio de 3 391 750 col/ml de organismos mesofílicos aerobios y 70 375 col/ml de Organismos coliformes. Las bacterias que se encontraron con más frecuencia fueron Enterobacter y Klebsiella.

No se encontró Salmonella en las 40 muestras de chilate analizadas.

En el estudio físico y químico se analizaron 25 muestras de chilate en el que se obtuvo un promedio de:

pH	6
Densidad	1.0086 g/cm ³
Sacarosa	19.2%
Acidez	0.06314%
Proteínas	1.572%
Grasas	6.128%
Sólidos	19.8917%
Cenizas	0.1766%

CONCLUSIONES

Por los resultados obtenidos en el estudio bacteriológico, se demuestra que es deficiente la calidad sanitaria de éste producto, debido al elevado número de organismos mesofílicos aerobios y sobre todo el elevado número de organismos coliformes, los cuales son considerados como indicadores de contaminación fecal, aunque sólo E. coli puede considerarse más indicativa de contaminación reciente o peligrosa que la de los otros coliformes por ser ésta de origen intestinal. Sin embargo, puede predecirse que la contaminación principal es debida a prácticas higiénicas inadecuadas, puesto que se encontró con más frecuencia Enterobacter que es una bacteria que habita fundamentalmente el suelo y los vegetales.

Por lo anterior, se considera necesario llevar a cabo un control sanitario más estricto en la elaboración de esta bebida, ya que se puede considerar como un peligro potencial al consumir este producto cuando está contaminado. Debido a los nutrientes que contiene, hacen de ella un medio favorable para que se desarrollen con más facilidad los microorganismos del medio ambiente que la han contaminado, además en un momento dado puede contener microorganismos patógenos que pueden ocasionar enfermedades infecciosas graves. Para evitar esta situación, se sugiere orientar a las personas que elaboran esta bebida para que lo hagan con la mayor limpieza posible y a la vez se les practique un análisis bacteriológico de manos, uñas, etc., el cual deberá realizarse por lo menos cada 6 meses; así mismo analizar muestras de chilate periódicamente para lograr un mayor control sanitario además de

llegar a establecer normas de calidad o criterios microbiológicos de aceptación en este producto.

En cuanto a los datos obtenidos en el análisis bromatológico se concluye que el chilate es una bebida que guarda cierto valor nutritivo por la cantidad de proteínas y minerales que contiene, sin embargo, puede considerarse principalmente energética por contener mayor cantidad de sacarosa y grasas, además de los carbohidratos contenidos en el cacao y en el arroz.

Creo necesario que se continúe haciendo investigaciones acerca del valor nutricional de esta bebida, pues los resultados arrojados en este análisis no pueden ser comparados con parámetros ya establecidos, porque a la fecha no existe ningún estudio realizado a nivel de propiedades físicas y químicas del chilate, por lo que éste trabajo queda como antecedente para quien quiera continuar con estudios referentes a la calidad nutricional de ésta bebida refrescante.

Tomando en cuenta que en la actualidad, el país atraviesa por una crisis socio-económica muy fuerte, sería ideal poder en un futuro, modificar las propiedades nutricionales del chilate y en un momento dado, si no igualar a un alimento básico (como la leche), sí poder sustituirlo, para poder mantener a flote la alimentación que día con día se hace más difícil llevarla a cabo con plenitud.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. American Public Health (1967). Association Standard. Methods for Examination of Dairy Products. Edition APHA, New York, 12 th.
2. American Public Health (1966). Association Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Edition APHA, Inc. New York.
3. Application Microbiology, 20:849, 1970
4. Biagi, Francisco (1980). Enfermedades Parasitarias. 2a. Edición. La Prensa Médica Mexicana. pg. 314, 315.
5. Burrows, William (1974). Tratado de Microbiología. Editorial Interamericana (México) pgs. 246-254
6. Cowan y Steel's (1979). Manual para la identificación de Bacterias de importancia médica. Cfa. Edit. Continental, S.A. de C.V. México, pg. 149-166
7. Cheftel, J. C. y Cheftel A.H. (1980) Introducción a la Bioquímica de los alimentos. Edit. Acribia, Zaragoza, (España).
8. Desroiser, N. W. (1967). Conservación de los alimentos. Editorial Omega.
9. Desroiser, N. W. Elementos de Tecnología de Alimentos. Editorial Continental, S.A. de C.V. México, D.F. Pgs. 31, 36, 38, 39, 42, 68.
10. Enciclopedia de México. Tomo II (1977). Cd. de México. Pg. 403
11. Fernández Escartfn, E. (1984). Microbiología Sanitaria de Agua y Alimentos. Vol. I. Universidad de Guadalajara (México)
12. Finegold Sidney: Martin W. J. (1983). Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. (Argentina).
13. Food and Drug Administration (1976). Bacteriological Analytical Manual.

14. Frazier, W.C. (1976). Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza (España). Pg. 53-56.
15. Georgala y Boothroyd (1965). J. Appl. Bact. 28:210
16. Goldsmith and Lattref. (1955). Applied. Microbiol 3:195
17. Koneman E., Allen, S. Dewell, V. R. Sommers, H. (1983) Diagnóstico Microbiológico, Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires (Argentina) Pg. 152-185.
18. Manuales para Educación Agropecuaria (1982)
Control de Calidad de productos agropecuarios. Editorial Trillas (México)
19. Manuales para Educación Agropecuaria (1981)
Elaboración de Productos Agrícolas. Edit. Trillas (México)
Pg. 105-108
20. Manual de Laboratorio de Microbiología Sanitaria (1983). Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México, D.F.
21. Pizarro Suárez L. (1975). "La Salmonella como contaminante de alimentos". Rev. Tecnología de alimentos. Vol. III:3-9
22. Potter, Norman. (1983). La Ciencia de los alimentos. EDUTEX, S.A. (México).
23. Ramos Córdoba, Mario (1976). "Manual de Métodos de Análisis de Leche y Lacticiños". Edición del autor. México, D.F.
24. Standar Methods for the Examination of Dairy Products (1972) APHA.
25. Taylor and Harris (1965). American Journal Clinical Pathologic 44:476.
26. Tacher, F. S. (1973) Análisis Microbiológicos de los alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza (España).
27. Técnicas para el Análisis Físicoquímico de Alimentos (1975). Dirección General de Investigación en Salud Pública. Secretaría de Salubridad y Asistencia. México, D. F.
28. Técnicas para el muestreo y análisis microbiológico de alimentos. (1975). Dirección General de Investigación en Salud Pública. Secretaría de Salubridad y Asistencia. México, D.F.