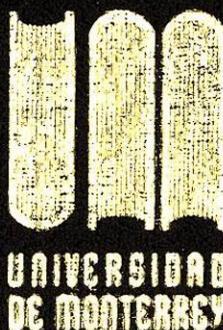


UNIVERSIDAD DE MONTERREY  
DIVISION DE CIENCIAS NATURALES  
Y EXACTAS



AISLAMIENTO E IDENTIFICACION  
 DE LEVADURAS EN YOGURT;

REPORTE DEL PROGRAMA DE  
 EVALUACION FINAL  
 PRESENTADO POR

EVELINA LOUSTAUNAU PELLAT

EN OPCION AL TITULO DE  
 INGENIERO EN ALIMENTOS

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1983

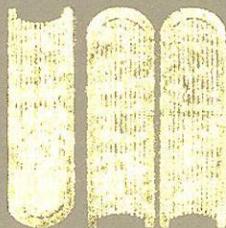
T  
QR151  
L6  
c.1



1080070883

DICNE  
\$100?

UNIVERSIDAD DE MONTERREY  
DIVISION DE CIENCIAS NATURALES  
Y EXACTAS



UNIVERSIDAD  
DE MONTERREY



AISLAMIENTO E IDENTIFICACION  
DE LEVADURAS EN YOGURT

REPORTE DEL PROGRAMA DE  
EVALUACION FINAL  
PRESENTADO POR

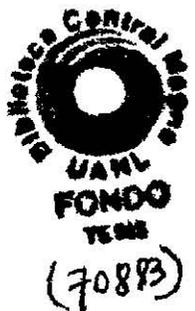
EVELINA LOUSTAUNAU PELLAT

EN OPCION AL TITULO DE  
INGENIERO EN ALIMENTOS

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1983

BIBLIOTECA  
UNIVERSIDAD DE MONTERREY



Nunca  
te conceden un deseo  
sin concederte también la facultad  
de convertirlo en realidad.

Sin embargo,  
es posible que te cueste  
trabajo.

Richard Bach.

A mis padres, Ricardo y Evelina  
por la confianza y apoyo que me  
demostraron durante mi carrera.

Con especial cariño, a quien  
me brindó su tiempo, compren-  
sión y amistad para la reali-  
zación de mi trabajo.

Gracias, Ma. de Lourdes.

## INDICE

|                               | Página |
|-------------------------------|--------|
| INTRODUCCION.....             | 1      |
| MATERIALES Y METODOS.....     | 16     |
| RESULTADOS.....               | 27     |
| DISCUSION Y CONCLUSIONES..... | 33     |
| RESUMEN.....                  | 38     |
| BIBLIOGRAFIA.....             | 39     |

## INTRODUCCION

No es fácil postular una definición para los organismos conocidos colectivamente como "levaduras". Sin embargo, se definen como microorganismos eucarióticos, unicelulares, cuya reproducción vegetativa es típicamente por gemación. Como células individuales, ellas crecen y se reproducen más rápidamente que los mohos filamentosos. Las levaduras, también se diferencian de las algas, por que no llevan a cabo la fotosíntesis y de los protozoarios por su pared celular rígida. Se distinguen de la mayoría de las bacte-rias por su tamaño relativamente más grande y sus caracte-rísticas morfológicas (18,20).

Estas características se aplican a la mayoría de las levaduras, pero existen excepciones, hay especies con propensión a la formación de micelio, otras con división celular por fisión y además otro género que posee conidia sobre esterigmata. Como es discutido por Lodder, el término "levadura" incluye a un grupo heterógeno de microorganismos. Phaff y sus colaboradores han revisado su etimología, señalando que hay una estrecha relación con el proceso de fermentación. De cualquier modo, ellos también concluyen que el término levadura encierra a una colección heterógena de hongos (18).

El estudio de las levaduras esta íntimamente asociado con la fermentación. La idea de que las fermentaciones alcohólicas eran causadas por organismos vivos nació con Linné. En 1680, Leewenhoek fué el primero en describirlas como cuerpos globulares, ovalados o esféricos en su forma. Alrededor de 1825 Mitscherlick, Cagnard-Latour, Schwann y Kützing demostraron que las levaduras de la cerveza y del vino eran células, las cuales se multiplicaban por gemación. Pero la naturaleza de las levaduras fue definitivamente conocida hasta el período en el cual Pasteur comenzó sus investigaciones en la fermentación; demostró en 1859 la imposibilidad de la generación espontánea e introdujo los métodos de cultivos puros, los cuales permitieron un

estudio morfológico de las levaduras (8).

Hansen fue el verdadero fundador del estudio morfológico y fisiológico de las levaduras, estableciendo las características propias para la diferenciación entre las especies. Posteriormente, Buchner al descubrir la zimasa estableció un considerable avance en el campo de la nutrición de las levaduras y del mecanismo de la fermentación alcohólica. En 1912, Guilliermond publicó el primer tratado que incluía las claves para su identificación. En años recientes, ha habido un mayor progreso en los estudios taxonómicos y sistemáticos realizados éstos por investigadores en Delft, Holanda. El último texto en estos estudios fue editado por Lodder, titulado "Las levaduras. Estudio Taxonómico" (8,20).

El número de especies definidas de levaduras es aproximadamente de 500. Comparado este número con otros grupos de microorganismos, es relativamente pequeño, ya que las especies de algas, bacterias y protozoarios se encuentran en miles. Las levaduras varían considerablemente de tamaño, fluctuando entre 1 a 5  $\mu$ m de ancho por 5 a 30  $\mu$ m, o más, de longitud, generalmente tienen forma oval aunque algunas veces son elongadas o esféricas. Sin embargo pueden ser pleomórficas dependiendo de su edad y de la composición del

medio en el cual hayan sido cultivadas. No poseen órganos de locomoción (8,20,24,26).

Las levaduras se encuentran ampliamente distribuídas en la naturaleza y son diseminadas por los insectos, el viento y las corrientes de aire. La mayoría son saprófitas pero algunas son parásitos obligados o facultativos y pueden causar enfermedades en el ser humano, en los animales y en las plantas (20).

Las levaduras se pueden reproducir por gemación, fisión, o esporulación. El proceso más común es la gemación, en éste aparece la formación de una pequeña prominencia o yema separada de la pared de la célula madre por un collar delgado, que aumenta de tamaño y posteriormente se separa (8,14,20).

La fisión binaria, es un proceso de reproducción vegetativa asexual, siendo muy similar a la reproducción de las bacterias. La célula se hincha o se elonga, el núcleo se divide y se producen las dos nuevas células. Durante los períodos de multiplicación rápida, las células se pueden dividir sin separarse, formando así cadenas de células (10,20).

La esporulación usualmente se refiere a la formación de esporas sexuales (ascosporas y basidiosporas) asociadas con células diferenciadas (asca o basidia) por un proceso que involucra una reducción-división. La esporulación asexual o vegetativa ocurre por formación de esporas tales como: conidia, artrosporas, blastosporas, balistosporas y clamidosporas (20,25).

Para la diferenciación de las levaduras es necesario estudiar ciertas características morfológicas tomando en cuenta la forma y el tamaño de las células, del micelio, del pseudomicelio y la producción de tubos germinales; la forma de reproducción vegetativa; la forma y el número de las ascosporas y la formación de blastosporas, clamidosporas o balistosporas. Macroscópicamente, estos microorganismos producen en medios sólidos colonias pastosas, opacas y con un diámetro aproximado de 0.5 a 3.0 mm. Algunas de ellas se caracterizan por ser pigmentadas, aunque la mayoría son de color crema (10,14,20,24).

Sin embargo, el estudio de la morfología de las levaduras no es suficiente para su identificación en género y especie, por lo que es necesario realizar pruebas bioquímicas. Estas pruebas se basan en la fermentación y la asimilación de carbohidratos, la utilización de diferentes fuentes de

nitrógeno, la producción de la enzima ureasa, la reducción de nitrato, el consumo de oxígeno, etc. (10,12,14,20,30).

Las levaduras crecen en un rango muy amplio de temperaturas de 0 a 47°C, aunque la temperatura óptima para ellas es de 20 a 30°C y las variedades patógenas para el hombre lo hacen entre 30 y 37°C. Se considera que su crecimiento máximo se obtiene en medios ácidos ajustados a un pH entre 3.5 a 3.8 el cual inhibe a la mayoría de las bacterias (20,27,30).

Debido a su amplia distribución en la naturaleza, las levaduras son contaminantes comunes de los alimentos y de los productos fermentados. Aunque la presencia de estos organismos se considera normal en muchos productos, en otros puede ser causa de su deterioro, es decir, son los responsables de cambios no deseados en alimentos y bebidas, ya sea durante el proceso o subsecuentemente. Estos cambios pueden limitarse sólo a una alteración en la apariencia del producto por el crecimiento de las levaduras. Este deterioro es comúnmente reconocido debido a la aparición de una capa polvorienta o pegajosa en productos sólidos, de una película o de una turbidez en los productos líquidos (17,22,37).

Los productos metabólicos de las levaduras ocasionan el de

sarrollo de sabores y olores no naturales en el producto, así como un aumento en el pH debido a la utilización de ácidos orgánicos importantes en productos fermentados. Muchas levaduras son capaces de utilizar los ácidos láctico, acético y cítrico, que generalmente se emplean como preservativos alimenticios y una reducción en la concentración de éstos proporciona las condiciones favorables para el deterioro de los alimentos por las bacterias. Además, los preservativos comunes tales como: benzoato, propionato y sorbato también pueden ser utilizados por algunas especies de levaduras (17,22,37).

Es importante resaltar que no se han registrado intoxicaciones o infecciones causadas por la presencia de levaduras en los alimentos aún cuando existen levaduras patógenas, a diferencia de los casos con especies bacterianas y fúngicas (3,17,22).

Entre las condiciones que determinan el crecimiento de las levaduras sobre los alimentos para contribuir a su deterioro se encuentran: la composición química, la acidez o pH, los nutrientes disponibles y el potencial de óxido-reducción en el alimento; la temperatura de almacenamiento, la humedad relativa del medio ambiente y del producto, el tipo de empaquetamiento, la presencia y concentración de oxi

geno en el envase, la presencia de algunos compuestos inhibidores, etc. (17,22,37).

Tomando en cuenta estas condiciones se han realizado estudios recientemente y se ha encontrado que los productos alimenticios con una mayor incidencia de contaminación por levaduras han sido los productos lácteos fermentados. En este tipo de productos lácteos la única forma de conservación de la leche es la fermentación acidificante que realizan las bacterias lácticas. Pero se trata de una protección de duración limitada debido a que un bajo valor de pH no se opone a la invasión por las levaduras (2,36).

La producción de leches fermentadas la ha venido realizando el hombre desde el principio de los tiempos. La industria láctea en la actualidad acidifica la leche introduciendo ciertos microorganismos y controlando su crecimiento y su actividad, mediante la regulación de la temperatura con el fin de preparar una gran variedad de leches fermentadas entre las cuales se encuentran: leche agria cultivada, leche búlgara, leche acidófila, kefir, kumis, skyr, taette, yogurt y otras muy similares (6,23).

Entre las más conocidas está el yogurt que es la forma tradicional de leche ácida de Bulgaria y de los países limi-

tantes. Este producto lácteo fermentado es muy popular en Europa, Asia y Africa y se conoce con diferentes escrituras y pronunciaciones en varias partes del mundo: yogurt, yoghurt, yahourt o yaourt y con varios nombres: leben o leben raib (Egipto-Arabia), madzoon o matzoon (Armenia), naja (Bulgaria) y dahi (India), pero el producto a excepción de su origen, es esencialmente el mismo (5,13,23).

En muchos países desarrollados de Asia y Africa, el yogurt se produce dejando agriar la leche en forma natural para después ser consumido por la población adulta, en mayor proporción que la leche fresca entera. En general, se considera como un producto digno de confianza que representa una fuente adecuada de nutrientes básicos, que lo convierte en un alimento casi completo (13).

El acreditado valor nutritivo del yogurt de aumentar la longevidad fue conferido por Metchnikoff a la actividad beneficiosa de sus microorganismos sobre la flora intestinal de aquellos que lo ingieren. Esta teoría no se acepta actualmente ya que el valor nutritivo del yogurt se atribuye a la materia prima que se utiliza para su producción. El contenido de proteínas, tiamina y riboflavina es mayor en el yogurt que en la leche, mientras que el de vitamina A es menor. En relación al contenido de los elementos nutri-

tivos que suministran energía entre el producto y la materia prima existe poca diferencia, más sin embargo la edulcoración del yogurt lo transforma en una mayor fuente de energía (23).

Actualmente el consumidor en América se ha conscientizado de las excelentes propiedades del yogurt, aumentando así su consumo, sobretodo por la adición de azúcar, fruta y esencias (13,33).

Tradicionalmente, el yogurt era elaborado con la leche concentrada por ebullición, pero hoy en día es un producto de la fermentación láctica de leche entera homogeneizada, parcial o totalmente desnatada con o sin adición de sólidos de leche descremada en polvo, utilizando como cultivo iniciador a las especies microbianas de Streptococcus thermophilus y Lactobacillus bulgaricus, encontrándose ambas en una activa relación simbiótica. Para obtener una consistencia, un sabor y un olor óptimos en el yogurt muchos investigadores aseguran que estos dos organismos deben estar presentes en la misma proporción en el cultivo iniciador, ya que el predominio de cualquiera de las dos especies pueden causar alteraciones en el mismo (5,29).

Para la obtención del yogurt, la leche se pasteuriza a

87.8°C por 16 segundos o a 82.2°C por 30 minutos. Se enfría a 45°C, para después ser inoculado con el cultivo iniciador antes mencionado. La leche tibia una vez pasteurizada e inoculada, se empaqueta en envases encerados o plásticos con tapa de plástico o de aluminio. La incubación se lleva a cabo a 40-45°C y cuando se ha desarrollado la acidez apropiada, ésta se detiene haciendo circular agua fría o corriente de aire hasta alcanzar una temperatura de 16°C, para posteriormente pasar al cuarto frío a 4°C para terminar su enfriamiento (5,13,19).

El producto final debe tener una acidez no mayor del 1-1.2%, la cual puede elevarse a un 1.5% durante su distribución. Su pH es usualmente de 4.4 a 4.2, aunque puede descender a 4.0. El yogurt tiene un sabor ácido no intenso; una textura fina y suave, que va desde un firme gel hasta un líquido viscoso, dependiendo de la técnica de fabricación y no debe espesarse demasiado con estabilizadores, porque pierde sus cualidades refrescantes de sabor. Se ha confirmado que los ácidos láctico y acético, acetaldehído y otros productos secundarios del metabolismo de las bacterias son los responsables del sabor y del aroma del yogurt siendo el principal productor de este fenómeno el acetaldehído (7,13,23).

La forma sencilla del yogurt es la natural, pero puede modificarse por la adición de fruta o bien, colocando una capa de fruta o conserva en el fondo del envase, con el fin de que el consumidor termine la mezcla de éstos al momento de servirlo o también utilizando esencias de frutas como saborizantes. El yogurt de sabor tiene una vida de anaquel menor que la del yogurt natural (5,13).

El yogurt puede desarrollar un sabor áspero y un cuerpo espeso, como resultado de una excesiva acidez y/o una cantidad de estabilizadores. La acidez puede regularse mediante un cuidadoso control del cultivo iniciador y con un enfriamiento rápido del producto. Los defectos en la textura y la separación del suero en el yogurt son causados por una temperatura de incubación excesiva o irregular, un enfriamiento insuficiente, la falta de cuidado en el manejo del coágulo o gel y el exceso de estabilizadores o el uso de los no adecuados. Otro defecto del yogurt es un sabor amargo, generalmente causado por organismos del agriado plano, Bacillus subtilis y B. cereus. Estos microorganismos esporulados aeróbicos sobreviven a muy altas temperaturas y su habitat natural es el suelo. Las levaduras y los mohos también pueden invadir al yogurt natural y al yogurt con fruta, porque su bajo pH constituye un ambiente selectivo para el crecimiento de estos organismos. Además,

la incorporación de fruta y azúcar dentro del yogurt ha ampliado el riesgo de deterioro por levaduras ya que representa fuentes adicionales de contaminación y de sustratos fermentables. La contaminación del yogurt por levaduras se reconoce generalmente por el desarrollo de una falta de sabor la pérdida de textura debido a la producción de gas y el abombamiento y explosión del envase. (13,33).

El aire es otro medio portador de microorganismos que ocasiona la contaminación en las plantas lácteas. El límite permitido de levaduras en el aire es el 0.1 a 10 células por cada 10 litros. Las principales fuentes de contaminación del aire son: el hombre, los sistemas de ventilación, el drenaje de piso, la basura y el polvo del exterior de la planta. Otro factor a tomar en cuenta, por su importancia en las industrias lácteas es el contenido microbiano del agua utilizada en la rehidratación de la leche para la fabricación del yogurt. Si ésta contiene levaduras capaces de alterar el producto, aumentará el número de envases estropeados al final del proceso y durante su almacenamiento (6,21,31,32).

El deterioro de los alimentos por levaduras puede ser disminuido llevando a la práctica un control higiénico y microbiológico de las materias primas y durante el proceso,

un almacenamiento adecuado con temperatura y niveles de humedad específicos y con el uso del tratamiento térmico y de agentes preservativos apropiados (37).

El procesado aséptico de la fruta que se incorpora en el yogurt, en la nieve y en otros lácteos se ha venido realizando últimamente a través de intercambiadores de calor de superficie raspadora a altas temperaturas entre 93 y 121°C para después ser vaciada y envasada en recipientes estériles. El proceso antes mencionado ayuda a retener el color natural y el sabor fresco de la fruta, mantiene una mayor consistencia, extiende la vida de anaquel y no requiere de refrigeración (1,9,11,34,35).

Se ha visto que la pasteurización del yogurt a una temperatura de 58°C por 5 minutos una vez envasado, o bien a una de 65°C por 30 segundos en flujo continuo aumentan la vida de anaquel, evitan una mayor acidificación y el desarrollo de una falta de sabor en el producto (15,33).

Cuando el producto se manufactura en condiciones óptimas de higiene, el yogurt no debe contener más de una célula de levadura por gramo de producto, y su vida de anaquel debe ser de 3 a 4 semanas si es almacenado bajo condiciones de refrigeración correctas (5°C) (33).

En Australia y los Estados Unidos de América se han realizado estudios analizando muestras de yogurt para determinar la presencia de levaduras, inoculando la muestra en agar extracto de malta con oxitetraciclina. Del total de muestras examinadas el 45% mostraron una cuenta total de levadura mayor a  $10^3$  células por gramo de producto. Entre las principales especies aisladas e identificadas se encuentran las pertenecientes a los géneros: Torulopsis, Kluyveromyces, Saccharomyces, Candida, Rhodotorula, Pichia, Debaryomyces y Sporobolomyces. El desarrollo de estos organismos en el yogurt está relacionado con su habilidad para crecer a temperaturas de refrigeración fermentar lactosa y sacarosa e hidrolizar la caseína de la leche (4,33).

Debido al aumento que ha tenido en los últimos años el consumo del yogurt natural y con fruta, se ha querido enfocar esta investigación al aislamiento e identificación de levaduras en el mismo, con el fin de determinar la presencia de estos microorganismos en el producto y la calidad del proceso de su manufactura.

## MATERIALES Y METODOS

Para la realización de esta investigación se seleccionaron al azar un total de 60 muestras de yogurt natural y de yogurt con fruta, envasadas en recipientes de plástico con tapa de aluminio. Estas muestras se obtuvieron en diferentes localidades del municipio de Garza García, Nuevo León.

Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Microbiología de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Monterrey, en el período comprendido en-

tre los meses de Enero a Abril de 1983.

A cada una de las muestras se les realizaron las siguientes pruebas: cuenta total, aislamiento e identificación de levaduras.

#### I. RECOLECCION DE LA MUESTRA.

Las muestras se recolectan directamente del lugar de distribución y se transportan inmediatamente al laboratorio.

#### II. PREPARACION DE LA MUESTRA.

Las muestras se homogeneizan invirtiendo rápidamente los envases de yogurt (alrededor de 25 veces). Antes de abrir el envase, se limpia con torunda de algodón impregnada de etanol la parte exterior que rodea el área de donde será removida la muestra.

#### III. CUENTA TOTAL DE LEVADURAS.

Se preparan diluciones de yogurt 1:2, 1:10, y 1:100 en solución de peptona al 1% estéril, utilizando técnica aséptica.

En cajas Petri conteniendo agar extracto de malta con oxite traciclina (R-1) se extienden 0.2 ml de cada dilución utilizando una varilla de vidrio y estriando con ella en tres planos a 90°. Se incuban las placas a temperatura ambiente

por 4 días. Se cuentan las colonias en las placas, se multiplica por la dilución y por 5 para obtener el número de células por gramo de producto.

#### IV. AISLAMIENTO DE LEVADURAS.

Las colonias diferentes se subcultivan por estrías en placas de agar Sabouraud dextrosa para obtener un cultivo puro. La incubación se realiza a temperatura ambiente por 4 días. Se observan las características morfológicas de la colonia y los resultados se comparan con la tabla descrita por Koneman y otros (12).

#### V. IDENTIFICACION.

Una vez obtenidos los cultivos puros se prosigue a realizar las siguientes pruebas morfológicas y bioquímicas:

##### a) Prueba de tubos germinales.

1. En un tubo de ensayo de 13 X 100 mm se colocan 0.5 ml de suero humano.
2. Se suspende en el suero un inóculo muy pequeño de una colonia de levadura.
3. El tubo se incuba a 37°C por 4 horas.
4. Se coloca una gota del suero conteniendo las células de levadura en un portaobjetos y se examinan al microscopio con el objetivo seco débil para observar la presencia de

tubos germinales.

b) Producción de clamidosporas.

1. Se toma una colonia aislada y se inocula en placas conteniendo agar harina de maíz (R-2) haciendo 3 cortes paralelos con un ángulo de 45° y separados 0.30 cm uno del otro.
2. Se incuba la placa a temperatura ambiente por 24 a 48 horas.
3. Se coloca un cubreobjetos en el área donde se obtuvo crecimiento y se observan al microscopio las características morfológicas de las células de levaduras.

Los resultados se comparan con la tabla descrita por Koneman y otros (12).

c) Producción de ureasa.

1. En un tubo de prueba con caldo urea se coloca un inóculo grande de una colonia aislada de levadura.
2. Se incuba a temperatura ambiente por lo menos 72 horas.

Esta prueba se considera positiva cuando el indicador vira a rosa o rojo.

d) Reducción de nitrato.

1. Se inoculan las levaduras en tubos conteniendo medio se-

misólido nitrato indol.

2. Se incuba a temperatura ambiente por 48 a 72 horas.
3. A cada uno de los tubos se les agregan 6 gotas de ácido sulfanílico (R-3) y alfa-naftilamina (R-4) y se mezcla.

Esta prueba se considera positiva con el desarrollo de un color rojo. A los tubos nitrato negativos se debe agregar zinc en polvo para determinar la presencia de algún residuo de nitrato. El desarrollo de un color rojo después de añadir el zinc indica una prueba real negativa, puesto que este metal reduce el nitrato a nitrito. Este paso adicional detecta reacciones falsas negativas, siendo útil cuando el organismo a probar sintetiza una alta concentración de nitrato reductasa, la cual degrada el nitrato hasta ion amonio, o bien, si durante la incubación, se reduce totalmente el sustrato.

e) Fermentación y asimilación de carbohidratos.

1. Se añaden 10 ml del caldo de fermentación de carbohidratos (R-5) a tubos de ensayo de 18 x 150 mm con tubos Durham invertidos. Se esterilizan en autoclave a 121°C por 15 minutos.
2. A cada uno de los tubos se les agregan con técnica aséptica 0.5 ml de los carbohidratos: dextrosa, lactosa, Maltosa y sacarosa respectivamente, y se inoculan con

0.2 ml de una suspensión salina de levaduras.

3. Se incuban a temperatura ambiente por 14 días.

La producción de gas demuestra únicamente la fermentación de carbohidratos por las levaduras. El cambio del indicador de púrpura a amarillo indica producción de ácido y asimilación de carbohidratos.

f) Producción de ascosporas.

1. Se inocula una colonia aislada de levadura en cajas Petri conteniendo agar para ascosporas (R-7).

2. Se incuba a temperatura ambiente por 5 a 10 días.

3. Se realiza un montaje húmedo de las levaduras en un portaobjetos y se deja secar al aire.

4. Se tinte por el método de Kinyoun.

Tinción de Kinyoun:

1. Se aplica carbolfuchina Kinyoun por 5 minutos (R-8).

2. Se lava con agua destilada.

3. Se lava con etanol al 50%, hasta que se remueva el exceso del colorante.

4. Se lava con agua destilada.

5. Se lava con una solución acuosa de  $H_2SO_4$  al 1% por 3 minutos.

6. Se agrega azul de metileno (R-9) por un minuto.

7. Se lava con agua destilada.
8. Se deja secar al aire y se examina al microscopio con el objetivo de inmersión para observar la presencia de ascoporas ácido resistentes.

Se identifican las especies de levaduras tomando como referencia las claves estándares de identificación (10,12,16).

## REACTIVOS

### (R-1) AGAR EXTRACTO DE MALTA CON OXITETRACICLINA.

El agar extracto de malta se rehidrata de acuerdo a las instrucciones y se esteriliza a 121°C por 15 minutos. El medio se enfría a 45 ± 1°C y se añaden 10 mg de oxitetraciclina (+) por cada 100 ml del medio.

### (R-2) AGAR HARINA DE MAIZ.

|                     |           |
|---------------------|-----------|
| Harina de maíz..... | 62.5 g    |
| Agua destilada..... | 1500.0 ml |

Se suspende la harina de maíz en el agua destilada y se calienta en baño de agua a 52°C por una hora. Se filtra y se lleva a un volumen de 1500 ml con agua destilada. Se agregan 19.0 g de agar y se calienta hasta ebullición para disolver. Se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 minutos.

### (R-3) ACIDO SULFANILICO.

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| Acido sulfanílico..... | 8.0 g     |
| Acido acético.....     | 1000.0 ml |

Se disuelve el ácido sulfanílico en el ácido acético.

(+) Terramicina, Pfizer.

(R-4) ALFA-NAFTILAMINA.

|                       |           |
|-----------------------|-----------|
| Alfa-naftilamina..... | 5.0 g     |
| Acido acético.....    | 1000.0 ml |

Se disuelve el alfa-naftilamina en al ácido acético.

(R-5) CALDO PARA FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS.

a) Caldo Base.

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| Peptona.....           | 10.0 g    |
| NaCl.....              | 5.0 g     |
| Extracto de carne..... | 3.0 g     |
| NaOH (1N).....         | 1.0 ml    |
| Agua destilada.....    | 1000.0 ml |

Se mezclan todos los componentes en el agua destilada y se disuelve por ebullición.

b) Indicador (Púrpura de bromocresol).

|                             |           |
|-----------------------------|-----------|
| Púrpura de bromocresol..... | 0.04 g    |
| Agua destilada.....         | 100.00 ml |

Se disuelve el púrpura de bromocresol en agua destilada y se ajusta la solución a un pH alcalino con NaOH (1N). Se deja reposar toda la noche. Se añade a la solución HCl (1N) hasta que se alcanza un pH neutro y por último se agrega una gota de ácido o álcali para obtener el cambio total

de color.

Se añade 100 ml del indicador por cada litro de caldo base.

(R-6) SOLUCION DE CARBOHIDRATO.

|                     |          |
|---------------------|----------|
| Carbohidrato.....   | 20.0 g   |
| Agua destilada..... | 100.0 ml |

Se añade el carbohidrato al agua destilada. Se disuelve colocando en baño de agua a 56°C por unos minutos. Se esteriliza por filtración.

(R-7) AGAR PARA ASCOSPORAS.

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| Acetato de potasio.....   | 10.0 g    |
| Extracto de levadura..... | 2.5 g     |
| Dextrosa.....             | 1.0 g     |
| Agar.....                 | 30.0 g    |
| Agua destilada.....       | 1000.0 ml |

Se mezclan los componentes en agua destilada. Se calientan agitando frecuentemente y se lleva a ebullición para disolver. Se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 minutos.

(R-8) CARBOL-FUCHINA.

|                     |       |
|---------------------|-------|
| Fuchina básica..... | 4.0 g |
|---------------------|-------|

Alcohol etílico 95%..... 20.0 ml

Disolver el colorante en el alcohol y dejar reposar por  
24 horas. Añadir:

Fenol (conc)..... 8.0 ml

Agua destilada..... 100.0 ml

(R-9) AZUL DE METILENO.

Azul de metileno ..... 0.3 g

Alcohol etílico 95%..... 99.0 ml

Disolver el colorante en el alcohol y aforar a 100 ml  
con agua destilada.

## RESULTADOS

Se analizaron 60 muestras de yogurt natural y con fruta, de las cuales un 20% (12) presentó una contaminación significativa por levaduras. El recuento de estos microorganismos osciló entre  $10^1$  y  $10^5$  células por gramo de producto (Tabla 1). Por otra parte, se observa en la misma tabla que un alto porcentaje (80) de las muestras analizadas no contenían levaduras.

La distribución del total de muestras estudiadas en relación al número de especies aisladas, se presenta en la Tabla 2, observándose como combinación máxima 3 especies

por muestra.

En la Tabla 3 se agruparon las muestras en base al tipo de yogurt analizado (natural y con fruta), encontrándose una mayor frecuencia de muestras contaminadas por levaduras (16.66%) en el yogurt que contenía fruta.

Se aislaron un total de 20 cepas de levaduras, de las cuales la mayoría se identificaron hasta el nivel de especie y se distribuyeron en 5 géneros: Rhodotorula (8), Torulopsis (5), Candida (3), Cryptococcus (3) y Kluyveromyces (1). Los géneros Rhodotorula y Torulopsis predominaron en el total de muestras examinadas en un 13.33% y 8.33% respectivamente.

TABLA 1

Cuenta total de levaduras  
de las muestras de yogurt

| células/gramo   | Número de muestras | % del total de muestras |
|-----------------|--------------------|-------------------------|
| 0               | 48                 | 80.00                   |
| 1 - $10^1$      | 3                  | 5.00                    |
| $10^1$ - $10^2$ | 4                  | 6.66                    |
| $10^2$ - $10^3$ | 2                  | 3.33                    |
| $10^3$ - $10^4$ | 2                  | 3.33                    |
| $10^4$ - $10^5$ | 1                  | 1.66                    |
| TOTALES         | 60                 | 100.00                  |

TABLA 2

Distribución del número de muestras analizadas\*  
 en relación al número de especies de levaduras aisladas

| Número de muestras | Número de especies por muestra | frecuencia porcentual |
|--------------------|--------------------------------|-----------------------|
| 48                 | 0                              | 80.00                 |
| 6                  | 1                              | 10.00                 |
| 4                  | 2                              | 6.66                  |
| 2                  | 3                              | 3.33                  |
|                    |                                | 100.00                |

\* Total de muestras: 60

TABLA 3

Frecuencia de muestras contaminadas  
en relación al tipo de yogurt analizado

| Tipo de yogurt | Número de muestras | Muestras contaminadas | (%)*  |
|----------------|--------------------|-----------------------|-------|
| natural        | 15                 | 2                     | 13.33 |
| con fruta      | 45                 | 10                    | 22.22 |

\* Frecuencia porcentual de contaminación en cada tipo de yogurt analizado.

TABLA 4

Frecuencia de las levaduras aisladas  
en el total de muestras examinadas.

| Levaduras aisladas            | Número de muestras | (%)* |
|-------------------------------|--------------------|------|
| <u>Rhodotorula</u> sp.        | 4                  | 6.66 |
| <u>Rhodotorula glutinis</u>   | 2                  | 3.33 |
| <u>Rhodotorula rubra</u>      | 2                  | 3.33 |
| <u>Torulopsis candida</u>     | 2                  | 3.33 |
| <u>Torulopsis stellata</u>    | 2                  | 3.33 |
| <u>Candida parapsilosis</u>   | 2                  | 3.33 |
| <u>Cryptococcus terreus</u>   | 2                  | 3.33 |
| <u>Candida krusei</u>         | 1                  | 1.66 |
| <u>Cryptococcus gastricus</u> | 1                  | 1.66 |
| <u>Kluyveromyces</u> sp.      | 1                  | 1.66 |
| <u>Torulopsis</u> sp.         | 1                  | 1.66 |

\* Porcentaje del total de muestras.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

Con el creciente desarrollo tecnológico de la industria alimenticia cada día se producen nuevos alimentos o se mejoran los ya existentes, incrementándose de esta forma el riesgo de contaminación de los productos a lo largo del proceso. Por este motivo es importante determinar el contenido microbiano de los alimentos, como lo es el yogurt y principalmente el yogurt con fruta, ya que se ha convertido en un producto de gran consumo.

La importancia de determinar la presencia de microorganismos

mos no propios en este tipo de productos se basa en primer lugar, en que se pueden encontrar entre éstos, gérmenes potencialmente patógenos para el hombre y por otra parte los capaces de ocasionar alteraciones indeseables en los alimentos. Entre los organismos capaces de disminuir la calidad del producto se encuentran las levaduras, por lo que se consideró relevante llevar a cabo en este estudio su recuento total en el yogurt natural y con fruta.

Los resultados obtenidos demuestran que un 20% de las muestras analizadas contenían cifras comprendidas entre  $10^1$  y  $10^5$  células por gramo de producto y considerando que los límites recomendados que garantizan una alta calidad del producto, establecen que el yogurt no debe presentar más de una célula por gramo, se puede concluir que el índice de contaminación es significativo lo que demuestra fallas en el control microbiológico durante el procesado de estos alimentos.

Debido al bajo pH que caracteriza al yogurt, éste se convierte en un medio propicio para el desarrollo de levaduras y si además se considera que la fruta puede constituir hasta el 10% del volumen final del yogurt, es esencial que este ingrediente no contenga levaduras viables para evitar que llegue a ser una fuente importante de contaminación.

Tomando en cuenta lo anterior, se recomienda que la fruta se someta a un tratamiento térmico para eliminar a estos organismos y que se utilice de inmediato para evitar contaminaciones posteriores durante el almacenamiento. Por otra parte, la adición de fruta y azúcar en el yogurt amplía el riesgo de deterioro de este producto, pues además de representar una fuente de contaminación, proveen a las levaduras de sustratos fermentables.

El desarrollo de las diferentes especies de levaduras en el yogurt está en relación con las diversas fuentes de contaminación y su capacidad para fermentar y/o asimilar los carbohidratos que se encuentran presentes en este producto como son la lactosa y la sacarosa, por esta razón es fácil asociar a las levaduras lactosa-fermentativas con los productos lácteos (33).

Es importante comentar que la mayoría de las especies de levaduras son capaces de utilizar la glucosa y el uso de azúcar invertida por algunos productores de yogurt conduce a la presencia de glucosa y fructosa y como resultado del metabolismo bacteriano de la lactosa que contiene la leche se puede encontrar bajas concentraciones de galactosa. Estos tres azúcares pueden actuar como sustratos fermentables favoreciendo de esta forma el crecimiento de las levaduras in

capaces de fermentar los carbohidratos propios del yogurt, como es Candida krusei (33).

El género que se aisló con mayor frecuencia fue Rhodotorula (13.33%), cuyos miembros producen colonias planas, circulares, con pigmento carotenoide que varía de amarillo a rojo (16). Sin embargo, la cuenta total para estas especies fue menor a 100 organismos por gramo de producto, con lo cual se deduce que por tratarse de microorganismos oxidativos son contaminantes incapaces de desarrollarse bajo las condiciones anaeróbicas que prevalecen en el yogurt.

La especie Torulopsis candida se aisló en dos de las muestras contaminadas y presentó la mayor cuenta de levaduras, hecho que confirma que este organismo es capaz de multiplicarse en este producto pues resiste la temperatura de refrigeración (5°C), utiliza la caseína de la leche y el ácido láctico y además puede fermentar la sacarosa (33).

Tomando en cuenta que no se realizó la identificación hasta el nivel de especie de todas las cepas aisladas, se recomienda que en estudios posteriores se lleven a cabo pruebas adicionales para lograr la especiación de las levaduras, además de tomar en cuenta una serie de factores que pueden influir en el grado de contaminación como por ejemplo: la

temperatura de refrigeración durante el almacenamiento del yogurt, la capacidad de las levaduras de utilizar preservativos y la determinación de las posibles fuentes que permiten la entrada de estos gérmenes al yogurt ya sea durante su elaboración, envasado y almacenamiento, como el aire y el agua utilizada en la rehidratación de la leche en polvo.

En base a lo anteriormente expuesto y de acuerdo a los resultados se puede concluir lo siguiente:

1. Las muestras analizadas presentaron un índice elevado de contaminación debido a la presencia de una considerable variedad de especies de levaduras.
2. La adición de fruta al yogurt aumenta el riesgo de alteraciones al producto.
3. El control higiénico durante la manufactura del yogurt fue insuficiente.

Por lo tanto, la determinación de la presencia de levaduras en la fruta, en otros ingredientes y en el producto final es un aspecto importante del control de calidad del yogurt tomando en cuenta que este alimento es consumido por el hombre.

## RESUMEN

Se determinó la presencia de levaduras en yogurt natural y con fruta, adquiridos en diferentes localidades del municipio de Garza García, N.L. Se utilizó para su aislamiento agar extracto de malta con oxitetraciclina y se identificaron por pruebas morfológicas y bioquímicas.

De las 60 muestras examinadas 12 (20%) presentaron contaminación por levaduras. Se aislaron e identificaron un total de 20 cepas pertenecientes a los géneros: Candida, Cryptococcus, Kluyveromyces, Rhodotorula y Torulopsis.

## BIBLIOGRAFIA

1. Aseptic processing of fruit. 1980. Dairy Sci. Abstr. 42: 7146.
2. Alais, Ch. 1971. Ciencia de la leche. C.E.C.S.A, Barcelona, España.
3. Anderson, A.W. 1971. The significance of yeasts and molds in foods. Food Technol. 31: 47-51.
4. Dubois, G., F. Desaulniers-Therrien, and R. Charbonneau. 1981. Yeast contamination in stirred yogurt. Dairy

Sci. Abstr. 43: 934.

5. Emmons, D.B. and S.L. Tuckey. 1967. Cottage cheese and cultured milk products. Chas. Pfizer and Co., Inc., U.S.A.
6. Frazier, W.C. 1976, Microbiologia de los alimentos. 2a. ed. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
7. Gorner, F. 1980. Aroma of cultured milk products. Dairy Sci. Abstr. 42: 3896.
8. Guilliermond, A. and F.W. Tanner. 1980. The yeasts. John Wiley and Sons, Inc., New York.
9. Jedwabnik, M. 1982. Aseptic fruits - advantages over regular fruits as seen by a dairy processor. Dairy Sci. Abstr. 44: 1483.
10. Joklik, W.K., H.P. Willett, and D.B. Amos. 1980. Zins- ser Microbiology. 17th. ed. Appleton Century Crofts, New York,
11. Kivi, G.C. 1982. Why process fruits aseptically? Dairy Sci. Abstr. 44: 1485.

12. Koneman, W.E., G.D. Roberts, and S.E. Wright. 1979.  
Practical Laboratory Mycology. 2nd. ed. The Williams  
and Wilkins Co., Baltimore, Md.
13. Kosikowski, F. 1977. Cheese and fermented milk foods.  
2nd. ed. Edwards Brothers, Inc., Ann Arbor, Mich.
14. Lodder, J. 1970, The yeasts, A Taxonomic Study. 2nd. ed.  
North-Holland Pub. Co., Amsterdam.
15. Loo, L.G.W. van der, 1980. Prolonging the storage life  
of stirred yogurt by heat treatment. Dairy Sci.  
Abstr. 42: 4196.
16. Mc. Ginnis, M.R. 1980. Laboratory Handbook of Medical  
Mycology. Academic Press, Inc., New York.
17. Miller, M.W. 1979. Yeasts in food spoilage: an update.  
Food Technol. 33: 76-80.
18. Niels, A.W. 1981. Yeasts cell envelopes biochemistry,  
biophysics, and ultrastructure. Vol. I. C.R.C. Press,  
Boca Raton, Flo.
19. Pederson, C.S. 1979. Microbiology of food fermentations

2nd. ed. The Avi Publishing Co., Inc., Westport,  
Conn.

20. Pelczar, M.J., R.D. Reid, and E.C.S. Chan. 1977. Microbiology. 4th. ed. Mc. Graw-Hill Book Co., U.S.A.
21. Peyrot, M.J. and J.P. Larpent, 1982. Problems posed by the manufacture of yoghurt in the Congo Republic. Dairy Sci. Abstr., 44: 1702.
22. Phaff, H.J., M.W. Miller, and E.M. Mrak. 1978. The life of yeasts. 2nd. ed. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
23. Porter, J.W.G. 1981. Leche y productos lácteos. 2a. ed. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
24. Prescott, S.C. and C.G. Dunn. 1962. Microbiología Industrial. 3a. ed. Aguilar, S.A. de Ediciones, España.
25. Reed, G. and H.J. Peppler, 1973. Yeast Technology. The Avi Publishing Co., Inc., Westport, Conn.
26. Rose, A.H. and J.S. Harrison. 1969. The yeasts: biology of yeasts. Vol. I. Academic Press Inc., New York.

27. Rose, A.H. and J.S. Harrison. 1974, The yeasts: physiology and biochemistry of yeasts. 3rd. ed. Vol. II. Academic Press Inc., New York.
28. Sánchez, M.A. 1961. Principios de Microbiología Industrial. Editorial Química, S.A., México.
29. Sandine, W.E., W.M., Hill, and H. Thompson. 1976. Acid producing microorganism. In "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods," ed. M.L. Speck, p. 215. Am. Public Health Assn., Washington, D.C.
30. Skinner, F.A., S.M. Passmore. and R.R. Davenport. 1980. Biology and activities of yeasts. Academic Press Inc., New York.
31. Sørensen, N.D. 1980. Significance of air contamination for hygiene of product manufacture. Dairy Sci. Abstr. 42: 5913.
32. Sullivan, J.J. 1980, Air Microbiology and dairy processing. Dairy Sci. Abstr. 42: 3746.
33. Suriyarachchi, V.R, and H. Fleet. 1981. Occurrence and

902312

growth of yeasts in yogurts. Appl. Environ. Micro-  
biol. 42: 574-579.

34. Szemplenski, T.E. 1980. Aseptic processing of fruit based products for yoghurt and ice cream toppings. Dairy Sci. Abstr. 42: 7145.
35. Szemplenski, T.E. 1982. Aseptic processing of fruit for yogurt. Dairy Sci. Abstr. 44: 1484.
36. Varabioff, Y. 1980. Spoilage and keeping quality of yoghurt. Dairy Sci. Abstr. 42: 1712.
37. Walker, H.W. 1977. Spoilage of food by yeasts. Food Technol. 31: 57-65.

