



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA-ALIMENTOS

TESIS:
“OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO DE
CAFÉ ADICIONADO CON NISINA”

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LIC.QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:
ARIANNA MELENDEZ ROMERO

DIRECTORA INTERNA.
D.C IVONNE PÉREZ XOCHIPA

MAYO 2016

ÍNDICE

Índice.....	I
Índice de Figuras.....	III
Índice de Cuadros.....	IV
1.1. Generalidades del café	3
1.2 Especies de cafetos	3
1.3 Producción de café en México	5
1.4 Bebidas	7
2. Extracto de café	8
2.1 Características microbiológicas del café	15
3. Aditivos Alimentarios	17
4. Bioconservación	18
4.1 Uso de Bacterias Lácticas en la bioconservación	18
4.2 Bacteriocinas	19
4.2.1 Producción y secreción de bacteriocinas	20
4.2.2 Resistencia e inmunidad de a las Bacteriocinas	21
4.2.3 Utilidad de las bacteriocinas en la industria alimentaria	22
5. Nisina	23
5.1 Mecanismo de acción de la Nisina	24
5.2 Usos de la nisina	25
6. JUSTIFICACIÓN	26
7. OBJETIVOS	27
7.1 General	27
7.2 Específicos	27
8. DIAGRAMA DE TRABAJO	28
9. MATERIALES Y MÉTODOS	29
9.1 Material de laboratorio	29
9.2 Material biológico	29
9.3 Métodos	29
10. METODOLOGÍA	31
10.1 Selección y acondicionamiento de la materia prima	31
10.2 Elaboración del extracto de café	31

10.3 Evaluación de °Brix y selección del extracto.	31
10.4 Pruebas bromatológicas aplicables al extracto de café.	32
10.5 Pruebas microbiológicas aplicables al extracto de café.	33
10.6 Evaluación de la Nisina como bioconservador del extracto de café en base a la concentración máxima permitida por la OMS y FDA.	34
11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	36
11.1 Extracto de café 36	36
11.2 Bromatología del extracto de café. 39	39
11.3 Microbiología del extracto de café. 40	40
11.4 Evaluación del bioconservador Nisina sobre microorganismos presentes en el extracto líquido de café. 43	43
12. Conclusiones 48	48
13. Recomendaciones 49	49
14. BIBLIOGRAFÍA: 50	50

Índice de Figuras

Figura	Título de la Figura	Página
1	Producción de especies de cafetos en el mundo.	5
2	Estados productores de café en México.	6
3	Consumo de café en México.	7
4	Incremento del volumen del grano durante la torrefacción.	9
5	Humedad del café durante la torrefacción.	10
6	Estructura química de la Nisina.	23
7	Mecanismo de acción de la Nisina.	24
8	Extracto final de café. (A) en agua a temperatura ambiente y (B) en agua caliente.	37
9	Extracto final de café. (A) molienda fina, (B) molienda media y (C) molienda gruesa.	38
10	Morfología de colonias de <i>Bacillus</i> presentes en el extracto de café.	40
11	Tinción de Gram. Bacterias Gram positivas del genero <i>Bacillus</i> .	41
12	Morfología de colonias en agar papa dextrosa acidificado.	41
13	Morfología de levaduras presentes en el extracto de café.	42
14	Prueba de coliformes totales y fecales negativas.	42
15	Cinética de crecimiento de la Bacteria del genero <i>Bacillus</i> , en caldo Mueller Hinton sin y con nisina a una concentración de 5,000 UI/mL.	43
16	Acción de la nisina a tres concentraciones sobre el extracto de café a 35 °Bx.	45
17	Acción de la nisina a tres concentraciones sobre levaduras en el extracto de café a 35 °Bx.	47

Índice de Cuadros

Cuadro	Título del cuadro	Página
1	Composición promedio, según la especie de café.	5
2	Grado de molienda para café tostado mezclado con azúcar.	11
3	Composición promedio de una taza de café	13
4	Diferentes tipos de extracción	14
5	Etapas de la extracción.	15
6	Principales microorganismos indicadores.	16
7	Usos de la nisina	25
8	Métodos a usar en el experimento	30
9	Características del extracto de café con agua a temperatura ambiente	36
10	Características del extracto de café con agua caliente	37

Resumen

La preocupación creciente por la inocuidad de los alimentos a nivel mundial ha llevado al estudio de diferentes alternativas para obtener alimentos y bebidas seguras. Profundizando en el mercado de las bebidas; el café se ha convertido en la bebida más consumida a nivel mundial y con ello ha aumentado el interés de su estudio, por lo cual el objetivo del presente trabajo fue generar un extracto de café con nisina como bioconservador realizando la evaluación de °Brix en granulometría fina, media y gruesa de café por percolación en batería obteniendo así el extracto de mayor concentración.

Al extracto de café se le realizaron determinaciones de humedad, cenizas, proteínas, extracto etéreo, azúcares totales y azúcares reductores; se practicaron pruebas microbiológicas de *Salmonella*, mesófilos aerobios, coliformes totales, coliformes fecales, hongos y levaduras; en última estancia se evaluaron tres concentraciones de la bacteriocina nisina en el extracto de café para conocer y determinar su efecto como bioconservador.

En la elaboración del extracto de café arábico con granulometría de 0.72 mm la concentración de sólidos solubles fue de 35 °Bx, mientras que en la granulometría gruesa de 1.70 mm solo se obtuvieron 25 °Bx y el menor rendimiento se obtuvo en la granulometría fina de 0.43 mm con tan solo 15 °Bx; en cuanto a pruebas bromatológicas los resultados expresados en base seca (bs) cabe resaltar el contenido de cenizas de 5.9% y de extracto etéreo de 11.2%. Las pruebas microbiológicas arrojaron una cuantificación de 25,000 UFC/mL de bacterias aerobias en agar cuenta estándar a las cuales se les realizó tinción de Gram observándose bacterias gram positivas que corresponden al género *Bacillus*; además, se cuantificaron 17,000 UFC/mL de levaduras en agar papa-dextrosa acidificado. La bacteriocina nisina se evaluó a 2,500 UI/mL, 3,750 UI/mL y a 5,000 UI/mL, encontrándose que se inhibe el crecimiento de la bacteria del género *Bacillus* a desde 3750 UI/mL hasta 5000 UI/mL. En el caso de las levaduras se observan mínimas diferencias para su inhibición en las tres concentraciones evaluadas.

Introducción

El café es la bebida más consumida y el segundo producto más comercializado después del petróleo a nivel mundial, en torno a este se desarrolla toda una industria que mantiene la economía de los países productores del mismo (Baxter. 2010). Las organizaciones cafeteras han sumado esfuerzos por innovar en procesos de mejora total de la bebida y con ello mejorar su calidad (Dórea & Da Costa 2009). Las nuevas alternativas exigen alimentos que no pongan en riesgo de forma directa o indirectamente la salud humana (Escartin. 2010). Por lo tanto, en el mundo actual de la industria del café uno de los retos más importantes es poder garantizar su inocuidad asegurando la estabilidad de la bebida. Dentro de estas alternativas la producción de un extracto de café resultado del proceso de lixiviación, logra reunir las cualidades sensoriales y funcionales del café (Cannell. 2010), sin embargo; los mayores riesgos presentes en el extracto de café son su contenido de agua (aw) 0.95 y la gran cantidad de carbohidratos, haciéndolo susceptible a ser contaminado por una amplia gama de microorganismos poniendo en duda su calidad y seguridad (Pendergrast. 2012). La aplicación de microorganismos como bioconservadores ha cobrado relevancia debido a la resistencia de microorganismos a algunos compuestos químicos y la creciente demanda por consumir alimentos más naturales (Rojas & Vargas 2011). El péptido nisina es la única bacteriocina que ha sido aprobada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para ser utilizada como conservador en la industria alimentaria con una aceptabilidad indiscutible debido a su mínimo impacto en relación a los cambios de las propiedades organolépticas de los alimentos ya que desde el punto de vista del consumo humano las enzimas digestivas pueden degradarla (Tiwari *et al.*, 2009). El uso de Nisina en el extracto de café hace posible conservar las características del grano y poder determinar su uso como antimicrobiano y conservador proporcionando un punto de comparación entre diferentes métodos y conservadores(Carvajal *et al.*, 2009).

1. Café

1.1. Generalidades del café

La planta del café es un arbusto perteneciente a la familia de las *Rubiáceas* y al género *Coffea*, fácilmente reconocible por el crecimiento sus hojas, produce flores de color blanco y cerezos de color rojizo definidos por SAGARPA como el fruto fresco completo del árbol que consta de una serie de capas que envuelven generalmente dos granos de café (Linares & Rinantonio. 2005). Alcanza entre 2 y 12 metros de altura y puede llegar a vivir 50 años. Así la infusión preparada a partir de las semillas de los frutos es denominada café (Aga *et al.*, 2005).

El café se caracteriza por un agradable aroma y sabor, además contiene una inmensa variedad de compuestos químicos responsables de su calidad sensorial y de sus efectos fisiológicos (Consejo Mexicano del Café, 2012).

1.2 Especies de cafetos

Rodríguez & Edurne (2008), mencionan existen aproximadamente 70 especies de cafetos, de las cuales solo 10 especies son las más importantes para la producción, pero la bebida de café se obtiene fundamentalmente de dos: *Coffea Canéphora* conocido como Robusta y *Coffea Arábica*, conocido comúnmente como Arábica.

Astorga *et al.*, (2012), mencionan que el café arábico es la especie más importante en la actualidad, con un crecimiento entre 900 y 2000 metros sobre el nivel del mar, su cultivo es más delicado y requiere mayores cuidados, contabiliza dos terceras partes de la producción mundial y produce un café de mayor calidad. La Figura 1 hace referencia a la producción de café arábico y robusto en el mundo.

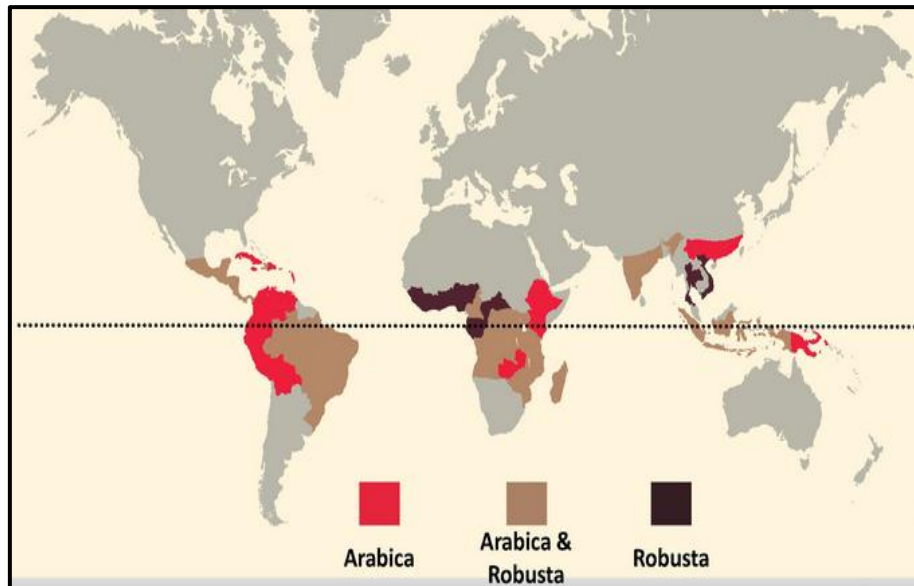


Figura 1. Producción de especies de cafetos en el mundo.

Arábica: posee un sabor dulce y aromático, sensiblemente menos amargo y astringente, contiene de 1.1 a 1.7% de cafeína, obteniendo un café de mejor calidad, y de mayor precio.

Robusta: posee un sabor fuerte y menos aromático, amargo con características ácidas y astringentes, contiene de 2 a 4.5% de cafeína, suele ser muy utilizado en la elaboración de café instantáneo.

Llly & Viani (2005), muestran en el Cuadro 1 el promedio de la composición química del grano de café almendra, según la especie en porcentaje en base seca, donde cabe resaltar el porcentaje de cafeína, sacarosa y polisacáridos de la especie arábica.

Cuadro 1. Composición promedio, según la especie de café.

COMPONENTE QUÍMICO	ARABICA (%)	ROBUSTA (%)
Polisacáridos	50.80	56.40
Sacarosa	8.00	4.00
Azúcares reductores	0.10	0.40
Proteínas	3.20	9.50
Aminoácidos	0.50	0.80
Cafeína	1.20	2.20
Trigonelina	1.00	0.70
Lípidos	16.20	10.00
Ácidos alifáticos	1.10	1.20
Ácido clorogénico	6.90	10.40
Minerales	4.20	4.40
Compuestos aromáticos	Trazas	Trazas

1.3 Producción de café en México

Debido a la topografía, altura, clima y suelo presentes en México es posible cultivar y producir café arábigo en un 98% y robusto en un 2 %, sobre una superficie de 761 mil hectáreas en doce estados de la República Mexicana, situados en la parte centro-sur del país, el estado de Chiapas es el primer productor de café con una participación del 42%, Veracruz con 26%, Puebla con 10% y Oaxaca con un 9%, por lo que estos 4 estados aportan el 84% del total nacional. La Figura 2 muestra la distribución de la producción de café por estado en México (SHCP. 2014).

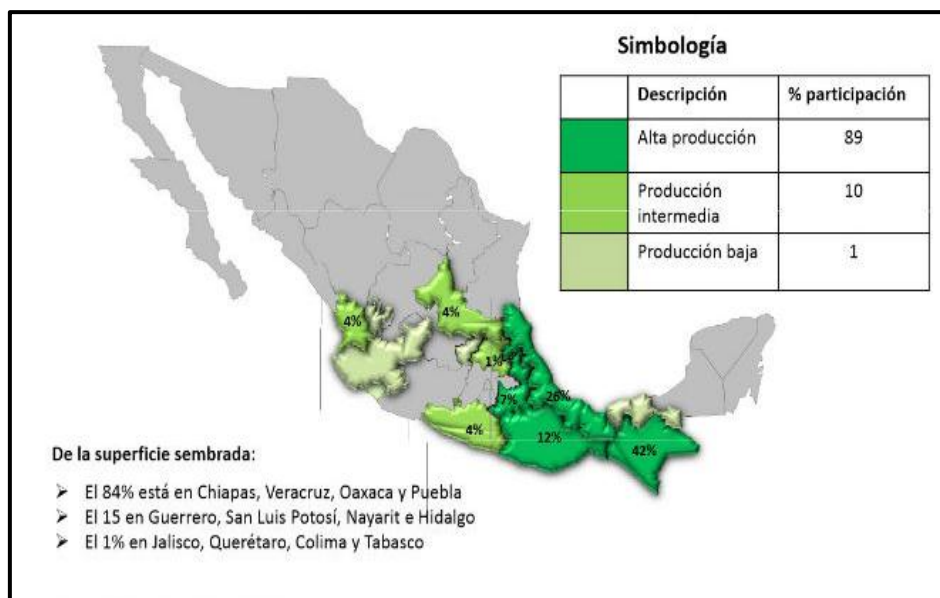


Figura 2. Estados productores de café en México.

ICO (2015), menciona que actualmente, México ocupa el 9º lugar como productor de café verde, después de Brasil, Vietnam, Indonesia, Colombia, Etiopía, Perú, India y Honduras, aportando el 3% del volumen mundial con 1 millón 287 mil 643 toneladas.

El sector cafetalero en México ocupa el cuarto lugar como generador de divisas después del petróleo, las remesas y el turismo (Consejo Mexicano del café. 2012), en 2013 alcanzó 737 mil hectáreas con un valor de 600 mdd, con un consumo de 1.2 kilogramos per cápita sin embargo se pronostica un aumento de consumo en el país que llegara a 980 mdd en 2017, donde México ganara territorio perdido por otros países consumidores (Octavio *et al.*, 2011). La Figura 3 muestra el aumento de consumo de café en México.

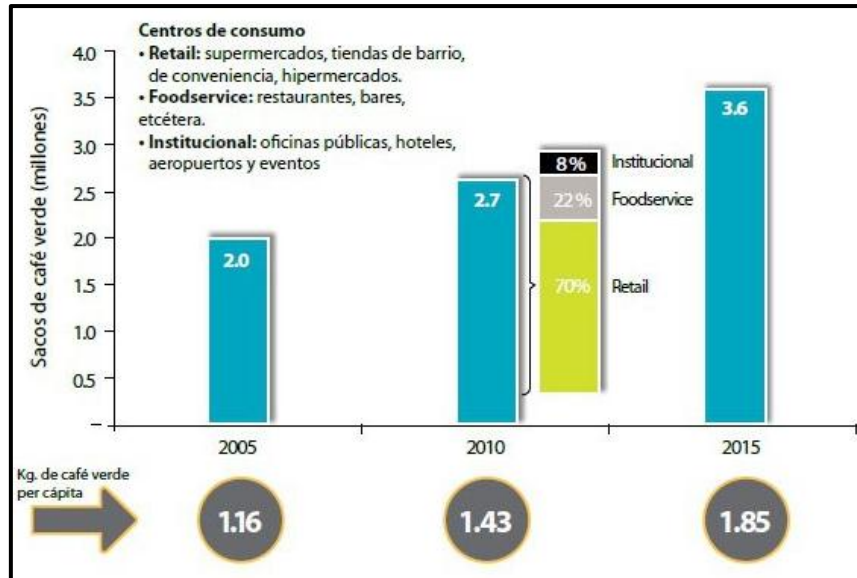


Figura 3. Consumo de café en México.

De este modo en cuanto a su producción total, México exporta alrededor de 84.5% y el 25.5% restante es consumido por la industria nacional productora de cafeína, de café soluble, tostado y molido (Guerra & Moss, 2008).

El sector presenta grandes ventajas en la comercialización ya que existe un uso de variedades híbridas muy reducido, lo mismo que el uso de agroquímicos, factores que son de interés a nivel internacional debido a la tendencia mundial de consumir alimentos sanos. Es posible afirmar que la producción cafetalera de México es prácticamente artesanal y un porcentaje significativo de los productores son principalmente indígenas (ASERCA, 2013).

1.4 Bebidas

Dentro de la industria de los alimentos una rama importante y de alto consumo es la de las bebidas, las cuales se clasifican en primera instancia de acuerdo con su contenido o ausencia de alcohol, esta última hace referencia a aquella bebida no fermentada, carbonatada o no, que se elabora con agua, ingredientes característicos de la propia bebida y productos autorizados, siendo la industria del café la más importante dentro de esta clasificación en el mundo (Calvo *et al.*, 2013).

Así mismo las bebidas concentradas han ganado interés debido a su mayor demanda de nutrientes. Una bebida concentrada se define como aquella combinada con otro alimento o bebida para mejorar el balance nutritivo del producto y que será posteriormente diluida y mezclada para producir un suplemento o un alimento completo (AAFCO, 2000).

2. Extracto de café

Borrelli *et al.*, (2009), definen al extracto líquido de café, como el producto resultante del proceso de lixiviación en el cual se hace pasar un solvente, agua (generalmente a presión y temperatura alta), para extraer los componentes de sabor y aroma del café tostado y molido.

Octavio. (2011), menciona que el primer punto para obtener la bebida es obtener las semillas de los granos de café, eliminando las capas que rodean al fruto; posteriormente, se procede al secado mediante dos métodos: por vía seca o por vía húmeda hasta obtener un grado de humedad inferior al 12%. El producto así obtenido por una u otra vía, es denominado café verde y está listo para ser sometido al siguiente proceso.

Hernández. (2007), menciona que es la torrefacción, la primera operación para el desarrollo de extractos de café, cuyo objetivo principal es proveer al grano de café verde todas las características y cualidades sensoriales apreciables en la bebida, estas se desarrollan al someter a los granos de café almendra verde a calentamiento, abarcando temperaturas entre 180 y 250 °C durante periodos de tiempo que oscilan entre 1 minuto como mínimo y hasta 25 minutos manteniéndolo en continuo movimiento para asegurar un tostado completo del grano, hasta lograr obtener el color deseado que reúna las características de satisfacción de cada mercado o tipo de consumidor.

Flament & Bessiére (2002), mencionan que durante el proceso de torrefacción del café verde se forman los compuestos aromáticos responsables de su aroma tales como: Piridinas, Furanos y Alcoholes.

Así mismo durante el proceso de torrefacción tendrán lugar cambios físicos y químicos que modificarán las características del grano de café verde, el primero de ellos es el aumento del volumen que se presenta a los 150°C como consecuencia de la generación de gases entre ellos CO_2 y CO esto es representado en la Figura 4 que muestra el incremento de volumen con relación al tiempo de tostado, el cual aumenta entre el 30-100%, en segundo lugar habrá pérdida de peso del grano, a los 170°C como consecuencia de la pérdida de H_2O , representado en la Figura 5 el cual se reduce entre un 12 y 23%, finalmente el grano alcanzara una humedad final entre 0.5-3.5% (Zamarripa, 2010).

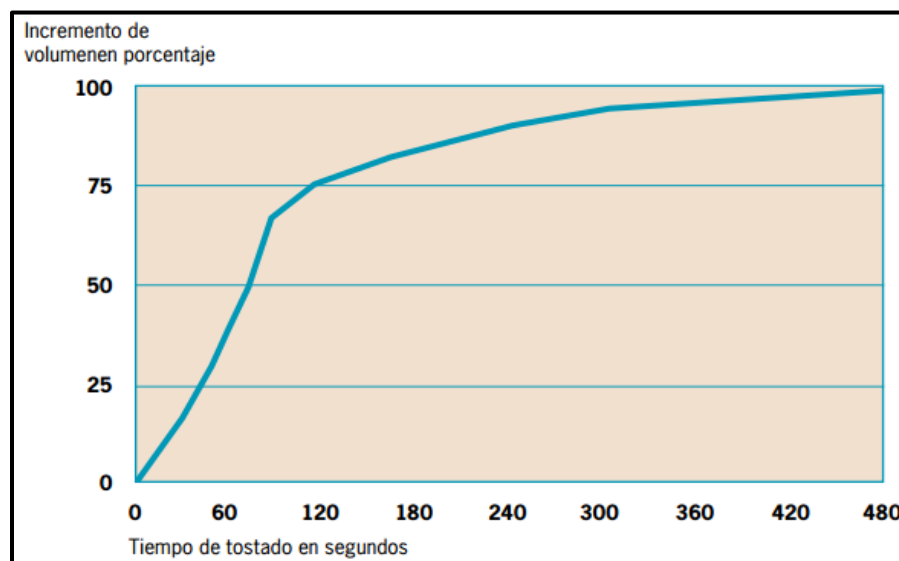


Figura 4: Incremento de volumen del grano durante la torrefacción.

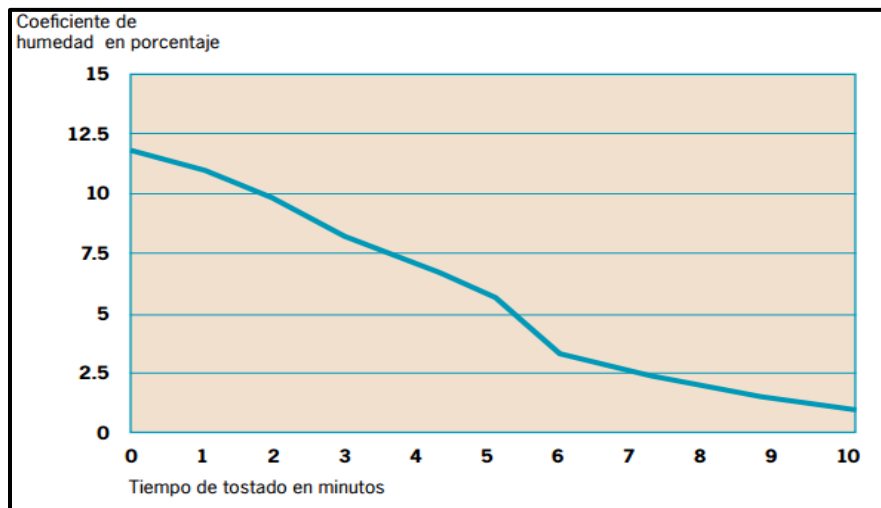


Figura 5. Humedad del café durante la torrefacción.

Gusstain *et al.*, (2007), señala que el color del grano varía radicalmente a lo largo de la torrefacción y depende de la intensidad y duración del proceso. El grado de torrefacción del café se determina cualitativamente por el color. El origen y las propiedades del café, pueden influir en las tonalidades obtenidas durante la torrefacción. En términos generales, cuanto más claro sea el color, menos tostado, el sabor será más suave, más ácido y menos amargo. Cuando más oscuro más tostado, el sabor será más fuerte, menos ácido y más amargo.

Entre los 180 y 200°C, la sacarosa sufre un proceso de deshidratación, hidrolizándose en azúcares simples hasta que la temperatura alcanza el punto de pirolisis. Los ácidos del café se ven afectados directamente con la temperatura de torrefacción, cuando esta es ligera se pierden cerca del 30%, intermedia el 50% y con un tostado oscuro el 70% del total de ácidos en el grano; cuando este alcanza tonos muy oscuros se pierden más del 98% de los ácidos principales (Finnell *et al.*, 2012). Por otra parte las proteínas se desnaturalizan, y se forman sustancias pardas como consecuencia de la reacción de Maillard, los glicéridos se descomponen en ácidos grasos libres. En cuanto a la cafeína, esta se pierde alrededor del 10% y los

compuestos volátiles que proporcionan el aroma quedan atrapados en el interior del grano (Bennidet *et al.*, 2013).

Cuando los granos de café han pasado el proceso de torrefacción, se someten a un enfriamiento rápido para evitar que se quemen en exceso y pierdan los aromas adquiridos y están listos para un segundo proceso correspondiente a la molienda, cuyo principal objetivo es incrementar la superficie específica de extracción para generar mayor interacción entre el agua y el sólido, de este modo poder facilitar la transferencia de sustancias solubles y emulsificantes dentro de la bebida (Esquivel & Jiménez, 2012).

El tamaño de partícula obtenida afecta el tiempo de contacto agua-café para la infusión y a las características organolépticas de la bebida, por ello se debe utilizar una molienda adecuada que garantice la extracción correcta. Los equipos de preparación de acuerdo a su principio de funcionamiento toman diferentes tiempos para preparar la bebida (FNC. 2000). Entre más gruesa sea la molienda, mayor es el tiempo de contacto agua-café y viceversa (Peysson. 2011).

La NMX-F-013 (2000), hace referencia al tamaño de partícula necesario para un determinado método de elaboración (Cuadro 2) donde cabe resaltar el grado de molienda utilizada para percoladora.

Cuadro 2. Grado de molienda para café tostado mezclado con azúcar.

GRADO DE MOLIENDA	TAMAÑO DE PARTICULA (mm)	USO GENERAL
Muy fino	Menor a 0.43	Café expreso
Fino	Mayor a 0.43 y menor de 0.72	Café en filtro utilizado en cafetera
Medio	Mayor a 0.72 y menor de 1.70	Café en percoladora
Grueso	Mayor o igual a 1.70	Industria de café soluble

Pendergrast (2012), mencionan que el grado de molienda fino expondrá demasiada área superficial al agua caliente y producirá un sabor amargo y áspero, por el contrario, si se muele poco y se dejan partículas excesivamente grandes se producirá un café débil, excesivamente acuoso y casi nulo de sabor. Al mismo tiempo el grado de molienda confiere al grano de café un índice de deterioro, el cual aumenta cuando el grano está demasiado molido, esto como resultado de la mayor área superficial expuesta al oxígeno.

Finalmente el grano de café tostado y molido, es sometido a un último proceso correspondiente a la extracción, en la cual los sólidos solubles y los compuestos aromáticos son extraídos mediante un proceso de lixiviación (Puerta 2008). En la industria el proceso de percolación por batería es el sistema más comúnmente utilizado, donde el café tostado y molido es mantenido en un lecho estático dentro de una columna vertical con separación interna de líquido de una columna a la siguiente, donde el número de columnas de una batería oscila entre 5 y 8 (Ortega *et al.*, 2008).

Finalizado el proceso la composición química del café está condicionada por la especie de grano, la altitud de la plantación, los factores edafológicos, climáticos y la torrefacción (Riedemann 2007).

La NMX-173. (2011), muestra en el Cuadro 3 la composición final promedio de una taza de café constituida de 7 gramos de café tostado y molido con 200 ml de agua caliente, resultante del proceso de extracción donde cabe resaltar la cantidad de agua final.

Cuadro 3. Composición promedio de una taza de café.

COMPONENTE	CANTIDAD	COMPONENTE	CANTIDAD
Agua	98.75%	Azúcares reductores	19 mg
Ácido clorogénico	100 mg	Polisacáridos	236 mg
Ácido quinico	40 mg	Melanoidinas	272.8 mg
Ácido cítrico	60 mg	Péptidos	75 mg
Ácido acético	35 mg	Lípidos	1mg
Ácido málico	20 mg	Potasio	105 mg
Otros ácidos	56 mg	Otros minerales	Trazas
Cafeína	90 mg	Otros 800 compuestos	Trazas

Rojas J. (2007), menciona que existen diferentes tipos de extracción (Cuadro 4) y estas a su vez se encuentran divididas en diferentes etapas (Cuadro 5), señalado esto cabe resaltar que una extracción óptima se obtiene a alta temperatura y su concentración está determinada por la extracción de sólidos solubles.

Cuadro 4. Diferentes tipos de extracción.

TIPOS DE EXTRACCIÓN	CARACTERÍSTICAS
Óptima	Se logra con una temperatura de agua entre 88 y 92°C, una correcta molienda según el equipo, un lecho de café entre 2.5-5 cm de profundidad y una relación justa de agua y café. Extracción óptima.
Baja	Se logra con temperatura agua baja, la molienda del café tostado es gruesa, el lecho de café es poco profundo y el tiempo de contacto agua-café es muy corto. Extracción por debajo del 18%.
Excesiva	Se logra con molienda muy fina, la profundidad del lecho del café es mayor al necesario, el tiempo de contacto agua-café es muy largo, la cantidad de agua es mayor a la requerida para la cantidad de café. Extracción deficiente, mala calidad del extracto; que se caracteriza por un sabor amargo y áspero.

Cuadro 5. Etapas de la extracción.

ETAPAS DE EXTRACCIÓN	CAMBIOS
Humectación	Las partículas absorben agua en una cantidad igual al doble de su peso.
Extracción de solubles	Los sólidos solubles del café, son extraídos por el agua provocando un aumento rápido de la concentración, cuanto mayor sea ésta, mayor será el rendimiento de la extracción.
Hidrólisis	Rompimiento y solubilización de grandes moléculas de carbohidratos que dan moléculas más pequeñas solubles en agua.

2.1 Características microbiológicas del café.

Forbes. (2007), la inocuidad es una característica que junto con las cualidades nutricionales, organolépticas y comerciales, componen la calidad total de un alimento, de esta forma la inocuidad nos da la garantía de que los alimentos no van a causar daño a la persona consumidora.

La calidad microbiológica del café es fundamental para su conservación y vida de anaquel, la ausencia de microorganismos garantiza la inocuidad de la bebida y la descarta de ser causante de enfermedades transmitidas por alimentos o bebidas (Pierson & Smoot, 2001).

El extracto de café está conformado por una serie de nutrientes que tienen un efecto selectivo sobre el crecimiento de la flora microbiana, la cual se desarrolla en función de parámetros físico-químicos de la bebida y características de cada

microorganismo. Debido a las condiciones del medio, solamente una pequeña cantidad de los diferentes microorganismos existentes será capaz de multiplicarse y producir alteraciones en la bebida las cuales estarán en función del tipo y número de agentes microbianos presentes en el medio (Frazier & Westhoff, 2000).

Uno de los mayores riesgos que se presenta en el extracto de café es su alto valor de actividad de agua, el cual es de 0.95, al mismo tiempo es un indicador del crecimiento microbiano y de la velocidad de deterioro de la bebida mostrando la cantidad de agua disponible metabólicamente para los microorganismos (Puerta. 2008).

Además de la actividad de agua; el pH y la concentración de carbohidratos tienen un papel crucial en el desarrollo de microorganismos favoreciendo su metabolismo. Por estas razones, las normas en materia de alimentos generalmente establecen la calidad microbiológica en términos de microorganismos indicadores (CNEPS, 2010).

NTC 4675. (1999), en el Cuadro 6 se hace referencia a los principales grupos de microorganismos que ponen en manifiesto un manejo inadecuado o contaminación, lo que eleva la probabilidad de encontrar microorganismos patógenos en bebidas, que pueden causar una alteración en las características organolépticas de la bebida y un daño o enfermedad a la salud humana.

Cuadro 6: Principales microorganismos indicadores.

INDICADORES DE CONDICIONES DE MANEJO
Mesófilos aerobios
Hongos y Levaduras
Coliformes totales, <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i>

La Norma Mexicana NMX-F-013-2000. CAFÉ PURO TOSTADO, EN GRANO O MOLIDO, SIN DESCAFEINAR O DESCAFEINADO, ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA establece la ausencia de coliformes y *Salmonella* en café. Al mismo tiempo como complemento microbiológico la NORMA TÉCNICA COLOMBIANA 4675. CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA EL EXTRACTO LIQUIDO DE CAFÉ, establece: mesófilos aerobios menor de 1000 UFC/ml; mohos y levaduras, menor de 100 UFC/ml y negativo para coliformes totales y fecales.

Castro y Valbuena (2009), mencionan que una de las alternativas modernas que puede contribuir significativamente a lograr la inocuidad de los alimentos es coadyuvar en la preservación de la salud humana con la Bioconservación, considerada como un enfoque ecológico para mejorar la seguridad y alargar la vida de anaquel de los alimentos.

3. Aditivos Alimentarios

Según el Codex alimentarius, el concepto de aditivo se refiere a cualquier sustancia que, independientemente de su valor nutricional, se añade intencionalmente a un alimento con fines tecnológicos en cantidades controladas (Cubero *et al.*, 2009).

Multon. (2010), menciona que una sustancia es admitida como aditivo si esta se encuentra bien caracterizada químicamente y se deben superar los controles toxicológicos establecidos por parte de los correspondientes organismos sanitarios. Uno de los motivos por los que deberá establecerse la necesidad de un aditivo es conservar la calidad nutritiva de un alimento para aumentar su estabilidad o mejorar sus propiedades organolépticas. Los aditivos de mayor importancia son los conservadores cuya función es inhibir el deterioro de los alimentos a causa de la actividad de los microorganismos (bacterias, levaduras y mohos). El problema de las alteraciones microbianas de los alimentos tiene implicaciones económicas, tanto para los fabricantes, como para distribuidores y consumidores, es por ello que en los últimos años se han investigado nuevas alternativas de conservación alimentaria que resulten más naturales y eficientes sin necesidad de utilizar métodos químicos.

4. Bioconservación

Vásquez *et al.*, (2009), señala que la bioconservación puede ser definida como la extensión de la vida de anaquel y seguridad de un alimento a través del uso de microbiota natural o controlada y/o sus compuestos antimicrobianos. La bioconservación de alimentos incluye técnicas utilizadas para obtener alimentos más seguros hasta la generación de alimentos mínimamente procesados y sin aditivos. Por lo anterior, la bioconservación ha tomado un gran auge basándose en el efecto de los llamados bioconservadores que aumentan la vida útil e incrementan la seguridad de los alimentos sin perder la esencia de cada uno de ellos.

4.1 Uso de Bacterias Lácticas en la bioconservación

Las bacterias lácticas incluyen cocos y bacilos Gram positivos, ácido tolerantes, la mayoría crece a un pH entre 4.0 y 4.5, generalmente inmóviles, no esporulados, su característica principal es la producción de ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Feria 2007).

Estos microorganismos son generalmente utilizados como cultivos iniciadores en la elaboración y conservación de productos lácteos tales como el yogurt, leche acidificada, mantequilla, crema y quesos; así también como en el procesamiento de carnes, bebidas alcohólicas y vegetales (Tiwari *et al.*, 2010).

Las bacterias lácticas se agrupan en dos grupos homofermentadoras y heterofermentadoras, el primer grupo posee la enzima aldosa y producen ácido láctico como el producto principal de la fermentación de la glucosa, el segundo grupo convierte hexosas a pentosas produciendo ácido láctico y cantidades significativas de acetato etanol y CO₂ (Monroy *et al.*, 2009).

Entre las principales funciones de las BAL son la producción de ácidos, inhibición de microorganismos indeseables, reducción de riesgos higiénicos, coagulación de la leche, reducción del contenido de azúcares, formación de aromas como los producidos por el diacetilo y acetaldehído en la mantequilla, producción de gas requerido para la formación de hoyos en ciertos tipos de quesos y proteólisis

necesaria para la maduración de los mismos, además de que disminuyen la lipólisis, lo cual evita la rancidez en los productos lácteos (Jeevaratnam *et al.*, 2010).

No obstante, estas bacterias también producen otras sustancias antagonistas dentro de las cuales se destacan el diacetilo, peróxido de hidrógeno, acetaldehído, compuestos no proteicos de bajo peso molecular y las bacteriocinas (Dabes *et al.*, 2009).

4.2 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos sintetizadas en el ribosoma de las BAL, la célula productora sintetiza una molécula que la inmuniza contra la propia bacteriocina. La producción ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, así las bacteriocinas con actividad antimicrobiana son segregadas por las bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores (Motta & Brandelli, 2008). Estas sustancias con frecuencia actúan frente a bacterias gram positivas y gram negativas, inhibiendo su crecimiento o desarrollo, sin embargo, estudios recientes afirman que también poseen un efecto inhibitorio frente a hongos y algunas levaduras (Svetoch *et al.*, 2008).

Las bacteriocinas usadas en la industria alimentaria deben cumplir una serie de requisitos: ser producidas por bacterias de grado alimentario (con estatus de QPS), deben ser preferiblemente termorresistentes, con actividad inhibidora de bacterias patógenas o alterantes del alimento, no deben llevar asociado ningún riesgo para la salud humana, su adición debe conllevar un efecto beneficioso, como puede ser un aumento de la seguridad, la calidad o la conservación del aroma y propiedades organolépticas del alimento, nunca deben adicionarse en concentraciones superiores a las encontradas en sus fuentes de investigación aprobadas, por último, deben de poseer actividad altamente específica y actuar únicamente contra bacterias patógenas o alterantes. (Cotter & Hill 2005).

Castellano *et al.*, (2008). La clasificación de las bacteriocinas de acuerdo a características físicas, químicas y genéticas se divide en las siguientes clases:

Clase I - Lantibióticos: Son péptidos pequeños (menos de 5 kDa), contienen en su estructura aminoácidos atípicos o modificados como lantionina, metil-lantionina y a aminoácidos insaturados como dehidroxilamina y dehidrobutirina, referenciados como lantibióticos. A este grupo pertenece la nisina, que es la bacteriocina mejor caracterizada, y comercializada para su uso como aditivo alimentario.

Clase II: Son péptidos pequeños termoestables (menos de 10 kDa). Su característica principal es la termoresistencia la cual parece estar relacionada con su estructura molecular, normalmente compuesta por péptidos pequeños que no presentan estructura terciaria. Entre las bacteriocinas más estudiadas de este grupo se encuentra la Lactocina 27.

Clase III: Proteínas termolábiles de peso molecular mayor 30 kDa. Entre ellas la helveticina.

4.2.1 Producción y secreción de bacteriocinas

La producción de bacteriocinas parece depender del crecimiento y actividad fisiológica de la cepa productora. La mayoría de las bacteriocinas que se han estudiado hasta el momento presentan una cinética de metabolito primario y en consecuencia, su producción está correlacionada con el aumento de la biomasa (Vidhyasagar & Jeevaratnam, 2013).

Las bacteriocinas se sintetizan en los ribosomas a partir de transcritos procedentes de la expresión del correspondiente gen estructural. Se traducen como prepéptidos inactivos con una extensión aminoterminal de 24 a 30 residuos en el caso de los lantibióticos o más corta de 18-24 residuos, en las bacteriocinas no lantibióticos (Jozala *et al.*, 2013).

El péptido líder actúa como sistema protector manteniendo la bacteriocina inactiva en el interior de la célula productora. No obstante, al menos en el caso de la nisina, su presencia es necesaria para que ocurra una biosíntesis correcta, siendo probablemente reconocida por las proteínas de modificación y transporte (Jozala *et al.*, 2008). La secreción de las bacteriocinas a través de la membrana citoplasmática se produce por la actividad de transportadores específicos. En las bacteriocinas clase II estos transportadores tienen una doble función: translocar la bacteriocina al exterior y actuar como peptidasas específicas (Cabo *et al.*, 2011).

4.2.2 Resistencia e inmunidad de a las Bacteriocinas

Escorlinia *et al.*, (2010), menciona que las bacterias sensibles pueden desarrollar diversos mecanismos de resistencia frente a la acción de las bacteriocinas. En los últimos años las investigaciones han sugerido que la composición de la pared celular de las bacterias Gram positivas podría ejercer un papel protector, al igual que ocurre con la membrana externa en las Gram negativas. Otro mecanismo de resistencia podría deberse a la pérdida del receptor específico de acción de la bacteriocina.

Por otro lado, las bacterias productoras de bacteriocinas han desarrollado mecanismos de inmunidad que eviten su suicidio, particularmente en aquellos casos en los que la bacteriocina no precisa de receptores específicos para alcanzar su blanco de acción (Jeevaratnam *et al.*, 2010). Los mecanismos de inmunidad presentes en las bacterias productoras no se conocen en detalle, pero en la mayor parte de los casos a partir de datos genéticos, se asume que la inmunidad se debe a una proteína probablemente asociada a la membrana y codificada por un gen que forma parte del mismo operón de la bacteriocina. En el caso de la nisina la inmunidad de la bacteria productora se debe a la actividad de una lipoproteína de inmunidad conocida como (NisI) y a un sistema de transporte, constituido por dos proteínas de membrana (NisEG) y una proteína citoplasmática (NisF), cuya función es captar la nisina adsorbida en la membrana y transportarla hacia el exterior o hacia el citoplasma celular para su degradación (Monroy *et al.*, 2009).

4.2.3 Utilidad de las bacteriocinas en la industria alimentaria

La necesidad de ofrecer alimentos “frescos” mínimamente procesados y el creciente rechazo del consumidor hacia los aditivos químicos han llevado a la industria alimentaria a reconsiderar el potencial antimicrobiano de las bacterias lácticas como una nueva estrategia de conservación. De todas las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas, las bacteriocinas aparecen como las más adecuadas desde un punto de vista tecnológico para ser utilizadas como conservadores de grado alimentario. En principio, su naturaleza peptídica permite su degradación por las enzimas digestivas, resultando así presuntamente inocuas para el consumidor y su microbiota intestinal y, en algunos casos, su espectro de acción incluye a los potenciales patógenos y alterantes asociados a los alimentos (*B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Clostridium* spp., etc.). Por último, sus propiedades físicoquímicas las hacen resistentes a los tratamientos térmicos y cambios de pH que sufren los alimentos durante su fabricación y almacenamiento y, además, su pequeño tamaño permite la difusión en sistemas semisólidos, propios de la mayoría de los productos alimentarios. Adicionalmente, las bacterias lácticas ofrecen la posibilidad de producir bacteriocinas in situ durante el proceso de fabricación (Auliffe & Ross, 2009). De hecho, se ha demostrado que muchos de los cultivos iniciadores utilizados en sistemas alimentarios producen bacteriocinas. Por lo tanto, se podría evitar la adición directa de una preparación pura de la bacteriocina, que implicaría un mayor gasto económico. La inclusión de cepas bacteriocinogénicas en los cultivos iniciadores puede realizarse siguiendo 2 estrategias diferentes: i) utilizar la cepa productora como cultivo iniciador puro o bien, ii) como cultivo iniciador mixto, combinando la cepa productora con una segunda especie microbiana resistente a la bacteriocina. El *Lactococcus lactis* fue la primera cepa utilizada para producir a la bacteriocina nisina, la cual fue utilizada por primera vez como conservador para evitar la hinchazón tardía de los quesos (debida a la producción de gas por *Clostridium* spp.) e inhibir el crecimiento de *S. aureus*. A partir de este

momento y hasta la fecha actual, la utilización de la nisina ha aumentado exponencialmente (Delves & Dinory, 2006).

5. Nisina

En 1933 se describió por primera vez una sustancia de naturaleza peptídica con actividad antimicrobiana producida por cepas de la especie *Lactococcus lactis* que posteriormente se denominó nisina (Alegría *et al.*, 2010).

La nisina, es un péptido pequeño de 34 aminoácidos, termoresistente, tiene carácter catiónico y es una molécula anfipática, contiene la mayoría de los aminoácidos cargados e hidrofílicos. Además tiene una cara hidrofóbica y otra hidrofílica (Faustino *et al.*, 2013). Russell & Warwick (2008), muestra la estructura de la bacteriocina nisina representada en la Figura 6.

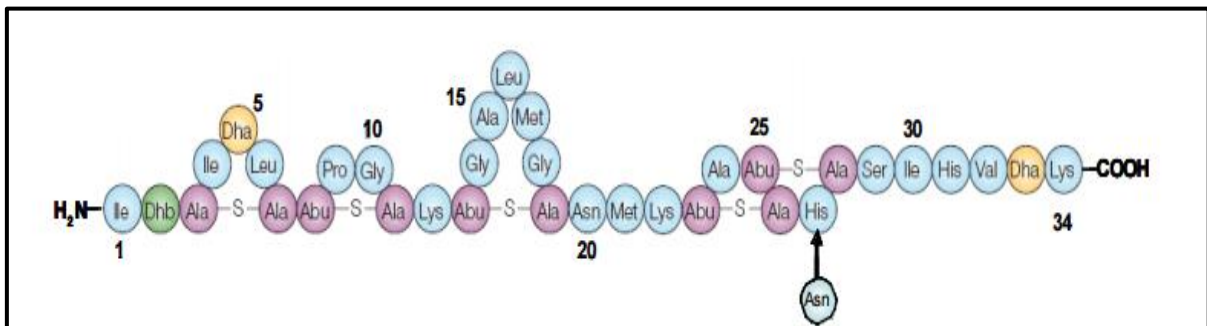


Figura 6: Estructura química de la nisina.

La nisina fue la primera bacteriocina analizada para su uso en alimentos; por tanto, es la bacteriocina con el historial más largo de uso seguro en alimentación, en 1969 se aprobó su uso en alimentos por la OMS y en 1988, fue aprobada por la FDA (Cotter & Hill, 2005).

De acuerdo con el Codex Alimentarius la nisina puede ser usada a una concentración máxima de 125 mg/L (Sangronis y García, 2007).

Entre las características más notables de la nisina se encuentran su estable acción en alimentos a pH ácido y su alta solubilidad en temperaturas altas, además el péptido es inocuo y no produce cambios en las características organolépticas de los alimentos (Verschuere *et al.*, 2000).

5.1 Mecanismo de acción de la Nisina

El mecanismo de acción de la nisina es una unión inicial a la membrana bacteriana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y la nisina con su carga neta positiva (Field *et al.*, 2008).

Después se produce la inserción de la nisina en la bicapa lipídica, de este modo se forman poros en la membrana bacteriana la cual queda permeabilizada, y comienza a perder iones y metabolitos fundamentales para su supervivencia provocándole finalmente la muerte (Faustino *et al.*, 2013).

Gálvez *et al.* (2009), muestra en la Figura 7 el mecanismo de acción de la nisina, por la formación de poros y la desintegración completa de la célula.

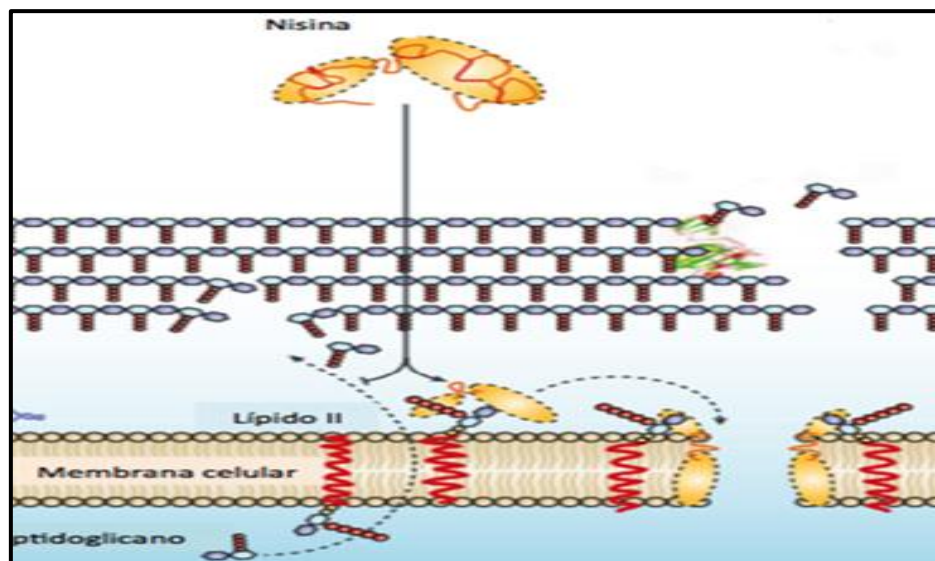


Figura 7: Mecanismo de acción de la nisina

Finalmente la nisina es considerada un bioconservador puesto que extiende la vida útil, aumenta la seguridad de los alimentos y proviene de un microorganismo productos, a diferencia de los conservadores químicos tradicionales, que son altamente cuestionados por sus efectos tóxicos en el consumidor (Fernández, 2000)

5.2 Usos de la nisina

Angelidis *et al.*, (2008), menciona que el uso de la nisina como bioconservador está ampliamente distribuido en el mundo, su uso está cubierto por diversas patentes europeas y norteamericanas. La nula toxicidad de la nisina hacia los humanos y los animales, adema de su actividad dirigida hacia bacterias patógenas, ha permitido que se investiguen aplicaciones biomédicas y se refuercen sus usos ya conocidos donde resalta su uso en alimentos (Cuadro 7).

Cuadro 7. Usos de la nisina

Aplicación	Uso
Biomedicina	Actividad contra patógenos resistentes a las terapias convencionales con antibióticos.
Ginecología	Actividad anticonceptiva y protección vaginal en estudios <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> en conejos y ratones
Microbiología	Actividad antimicrobiana contra <i>Staphilococcus aureus</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> .
Alimentos	Reducción de la intensidad de tratamientos térmicos de alimentos enlatados.
Vinos	Control de la fermentación maloláctica
Cerveza	Control de su fermentación

6. JUSTIFICACIÓN

El crecimiento económico de las industrias de café y la globalización de los mercados han propiciado un ambiente más exigente y competitivo, con nuevos productos y mejores tecnologías para su desarrollo. Así, al ser el café la bebida más comercializada y de mayor impacto social en el mundo, surge la necesidad de generar una alternativa metodológica de extracción, la cual permita reunir las características sensoriales y funcionales del café, que al mismo tiempo se sostenga en un método que garantice un mayor rendimiento y asegure una menor pérdida económica, logrando elevar la calidad de la bebida y con ello la satisfacción del consumidor.

Al mismo tiempo el generar nuevos productos, exige crear alimentos seguros con el objetivo de no afectar directa o indirectamente la salud humana, debido a ello, se buscan alternativas naturales e inofensivas que garanticen la inocuidad de la bebida, aumenten la vida de anaquel y garanticen su estabilidad, en ello radica el uso de un bioconservador siendo una alternativa para contrarrestar el uso de conservadores químicos y no alterar sus propiedades organolépticas.

7. OBJETIVOS

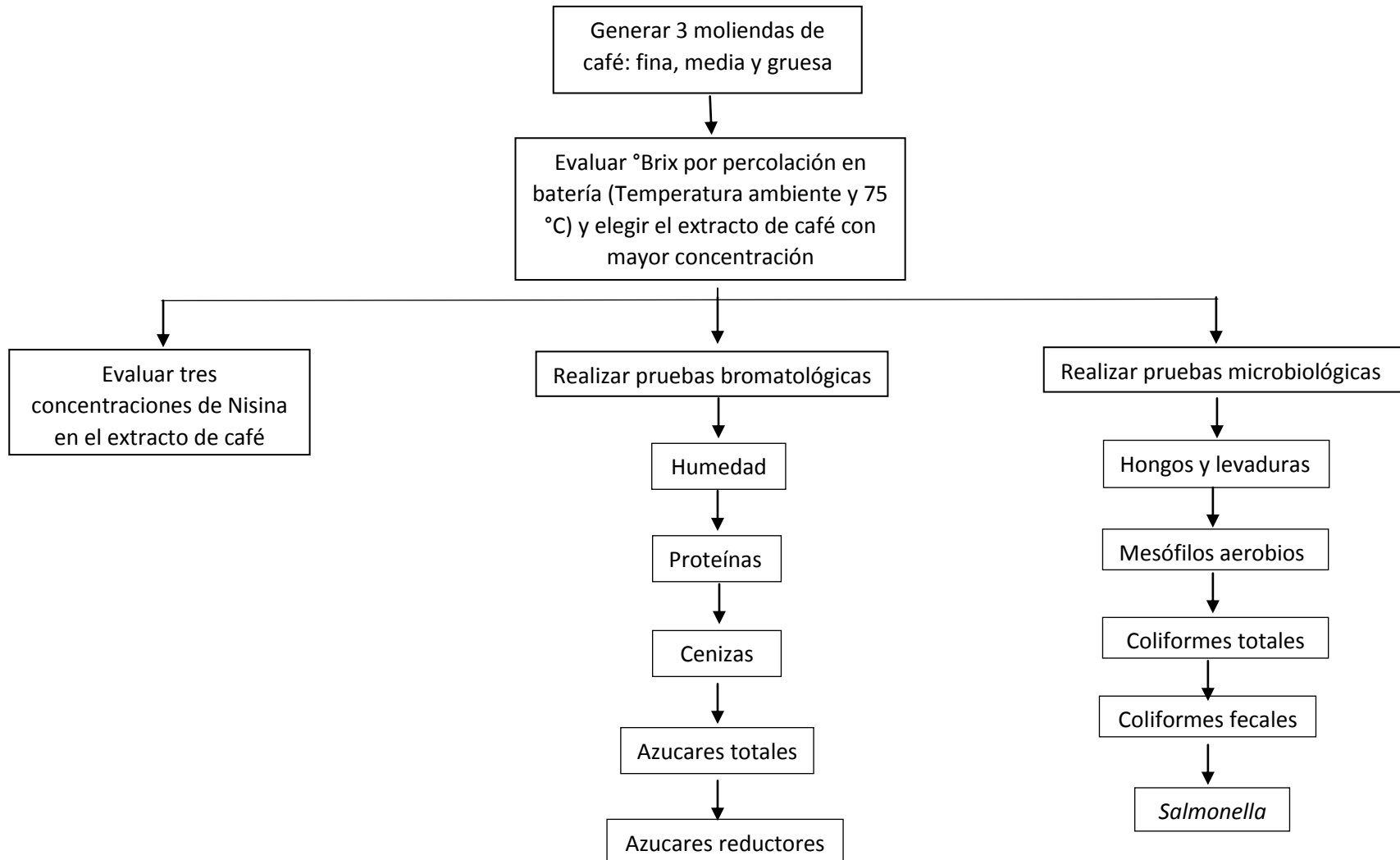
7.1 General

Obtener un extracto de café adicionado con nisina como bioconservador.

7.2 Específicos

- Evaluar °Brix en tres granulometrías de café por percolación en batería a dos diferentes temperaturas.
- Realizar pruebas bromatológicas y microbiológicas al extracto de café con mayor concentración de °Brix.
- Evaluar tres concentraciones de nisina para disminuir o eliminar la carga de microorganismos presente en el extracto de café de mayor concentración de °Brix.

8. DIAGRAMA DE TRABAJO



9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Material de laboratorio

Se utilizó material de vidrio y reactivos grado analítico necesarios para el desarrollo de pruebas bromatológicas y microbiológicas realizadas al extracto de café.

9.2 Material biológico

Se utilizó café arabico tostado proveniente de la sierra norte de Puebla sembrado a más de 850 metros sobre el nivel del mar.

- Nisina comercial (Nisin).

9.3 Métodos

Los métodos se muestran a continuación en el cuadro 8.

Cuadro 8. Métodos a usar en el experimento.

DETERMINACIÓN	TÉCNICA	REFERENCIA
Extracción de café	Percolación en batería	NMX-F-013-2000. Café puro tostado, en grano o molido, sin descafeinar o descafeinado. Especificaciones y métodos de prueba.
Humedad	Calentamiento directo	NMX-F-083-1986. Determinación de humedad en productos alimenticios.
Ceniza	Calcinación	NMX-F-066-S-1978. Determinación de cenizas en alimentos.
Extracto etéreo	Soxhlet	NMX-F-089-S-1978. Determinación de extracto etéreo (método Soxhlet) en alimentos.
Azúcares totales	Lane-Eynon	NMX-F-312-1978. Determinación de azúcares reductores y totales en alimentos.
Azúcares reductores	Lane-Eynon	NMX-F-312-1978. Determinación de azúcares reductores y totales en alimentos.
Proteínas	Kjendhal	NMX-F-068-S-1980. Determinación de proteínas en alimentos.
Mesófilos aerobios	Vertido en placa	NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
Hongos	Vertido en placa	NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
Levaduras	Vertido en placa	NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
Coliformestotales	Vertido en placa	NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.
Coliformes fecales	Númeromás probable	NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes.
<i>Salmonella</i>	Pre-enriquecimiento, enriquecimiento, aislamiento, identificación y confirmación.	NOM-114-SSA1-1994. Bienes y Servicios. “Método para la determinación de <i>Salmonella</i> en alimentos”.

10. METODOLOGÍA

10.1 Selección y acondicionamiento de la materia prima.

Se utilizó café arábico tostado proveniente de la sierra norte de Puebla sembrado a más de 850 metros sobre el nivel del mar. El café tostado fue sometido al proceso de molienda, utilizando tamiz de malla No.40 US estándar para obtener la granulometría gruesa, tamiz No.25 US estándar para la granulometría media y tamiz No.12 US estándar para obtener granulometría fina. Obtenidas las tres granulometrías de café se guardaron en bolsas herméticas por separado a 4 °C.

10.2 Elaboración del extracto de café.

Linares & Rinantonio (2005), mencionan que para obtener un extracto de café óptimo el mejor método es la percolación en batería ya que se logra obtener un extracto que reúne todas las características propias del café, es por ello que se utilizó un equipo de vidrio de dos baterías acondicionado con una separación interna entre batería y batería, adicionado con sellos herméticos con el fin de evitar cualquier tipo de pérdida del extracto, listo el equipo se tomaron 200 gramos de cada una de las tres granulometrías: fina, media y gruesa. La muestra se adiciono a la primera batería a la cual se le agregó agua a temperatura ambiente para obtener el extracto final, obteniendo tres extractos de café resultado de cada grado de molienda, el procedimiento se realizó nuevamente sustituyendo el agua a temperatura ambiente por agua caliente a 75°C.

10.3 Evaluación de °Brix y selección del extracto.

Castaño y Quintero (2008), mencionan que el rendimiento en una extracción de café está en función de la concentración de sólidos solubles ya que permiten evaluar la composición final en función de la parte utilizable de fruto, lo cual puede verse reflejado conociendo la concentración de °Bx.

Es por ello que se evaluó el rendimiento de cada extracción a las 8 horas, determinando su concentración de °Bx por refractometría. Además, se determinó el pH de cada uno de los extractos utilizando potenciómetro.

10.4 Pruebas bromatológicas aplicables al extracto de café.

Puerta. (2011) menciona que la cantidad de agua presente en el café juega un papel importante para la conservación de las características físicas, sensoriales y microbianas de la bebida. Por ello al extracto de café de mayor concentración de °Bx, se le realizó la prueba de humedad haciendo referencia a la NMX-F-083-1986.

El contenido de cenizas en el extracto de café como menciona (Sivetz & Desrosier. 2013), indica el porcentaje de materia inorgánica presente en el alimento, dando la suma total de minerales presentes, valores altos parecen estar relacionados con la estabilidad microbiológica del alimento lo que puede retardar el crecimiento de ciertos microorganismos. La prueba de cenizas se realizó conforme a lo establecido en la NMX-F-066-S-1978.

La incorporación de proteínas en la dieta es fundamental para la nutrición humana conociendo su valor biológico, la cantidad de proteínas presentes en los alimentos varía de acuerdo a su naturaleza (Avanza. 2001). La prueba de proteínas se realizó conforme se establece en la NMX-F-068-S-1980.

Vicentt. (2008), menciona que el extracto etéreo es uno de los principales componentes del café donde resalta la cantidad de ácidos grasos. SAGARPA (2006) menciona que la cantidad de lípidos y ácidos grasos implica un efecto benéfico sobre el aroma y sabor de la bebida dando como resultado un café de mayor calidad. La prueba de extracto etéreo se realizó de acuerdo con lo establecido en la NMX-F-089-S-1978.

La cantidad de azúcares totales y reductores, indica la cantidad de carbohidratos disponibles para el metabolismo de ciertos microorganismos debido a esto valores bajos logran reducir alteraciones en el sabor y olor de la bebida, esta prueba se basó en la NMX-F-312-1978

10.5 Pruebas microbiológicas aplicables al extracto de café.

Swanson *et al.*, (2009) menciona que el estudio microbiológico de los alimentos engloba una serie de técnicas estandarizadas con el fin de conocer las características positivas y negativas de los alimentos, donde el desarrollo de microorganismos está en función del valor nutricional del mismo. Dentro de las pruebas microbiológicas más importantes se encuentra el recuento de Mesófilos aerobios al ser el número más grande microorganismos, lo que indica una visión general de la microbiología del alimento que puede englobar microorganismos patógenos o no. Esta prueba se llevó a cabo de acuerdo a lo establecido en la NOM-092-SSA1-1994.

Schlegel. (2008) menciona que la presencia de mohos y levaduras, puede provocar el deterioro fisicoquímico de alimentos debido a la utilización de sus nutrientes alterando el sabor, color y olor del alimento. Puerta. (2008), indica que la importancia de su cuantificación radica en su capacidad de generar metabolitos termoresistentes, modificar sustratos desfavorables y favorecer el crecimiento de patógenos, lo que indica de la calidad sanitaria del alimento. La prueba se llevó a cabo siguiendo la metodología señalada la NOM-111-SSA1-1994.

Establecidos los conteos bacterianos se realizó tinción de Gram, a cada una de las diferentes colonias.

Kornacki & Johnson (2011), la prueba de coliformes totales, indica la presencia de microorganismo Gram negativos, aerobios o anaerobios que fermentan la lactosa con producción de gas, su uso es como indicadores sanitarios al poner en evidencia prácticas sanitarias deficientes en el manejo y en la fabricación de los alimentos, lo que implica un riesgo sanitario a la salud humana. La prueba se desempeñó siguiendo la metodología señalada en la NOM-113-SSA1-1994.

Madigan y Martinko, (2008), mencionan que el grupo de coliformes fecales está constituido por bacterias Gram-negativas capaces de fermentar la lactosa con producción de gas, en el que el género más importante es *Escherichia coli*. Geo F y Stephen. (2012), mencionan que su búsqueda en alimentos indica malas prácticas sanitarias indicando contaminación fecal por la presencia de estos microorganismos en hábitat intestinal. Es por ello que la prueba se llevó a cabo siguiendo la metodología señalada en la NOM-112-SSA1-1994.

Al mismo tiempo se procedió a realizar la prueba para la identificación de *Salmonella*, siguiendo la metodología establecida en la NOM-114-SSA1-1994.

10.6 Evaluación de la Nisina como bioconservador del extracto de café en base a la concentración máxima permitida por la OMS y FDA.

Para evaluar el uso del bioconservador (nisina), frente a microorganismos del género *Bacillus* se adiciono en una concentración conocida de estos, en caldo Mueller Hilton realizando una cinética de crecimiento, con el fin de conocer si existía sensibilidad de estos microorganismos frente al bioconservador. Para ello se ajustó una solución a la escala 0.5 de Mc Farland. Fernández (2000), menciona que la escala de Mc Farland es utilizada para conocer el número de UFC/mL con apoyo de una escala que va de 0.5 a 10, con el objetivo de mantener estandarizada la prueba. Faustino *et al.*, (2013), menciona que una cinética microbiana tiene como objetivo conocer la forma de crecimiento del microorganismo de estudio, lo que contribuye a mejoras en el cultivo según sea su fin.

Rojas & Vargas, (2011), tomando en cuenta la sensibilidad de estos microorganismos y conociendo la concentración máxima permitida por la FDA y la OMS para el uso de la nisina correspondiente a 5000 UI/mL (125mg/L). Se evaluó el crecimiento de ambos microorganismos a la concentración máxima y dos más 3750 UI/ml y 2500 UI/ml de nisina.

Una vez lista la solución de nisina, MSPS. (2012), menciona que la nisina tiene un efecto mayor cuando es adicionada en alimentos o bebidas de pH bajos por ello se determinó el valor de pH a los extractos de café.

Faustino *et al.*, (2013), mencionan que la nisina es un bioconservador que actúa sobre bacterias Gram positivas y estudios recientes sugieren que también inhibe el crecimiento de algunos hongos y levaduras donde se puede notar la inhibición o muerte de estos microorganismos desde las primeras horas posteriores a ser adicionado. Por ello se tomó la decisión de realizar cinéticas de crecimiento microbianas a las diferentes concentraciones de nisina en el extracto de café de mayor concentración (°Bx) para conocer su acción frente a *Bacillus* y levaduras.

11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

11.1 Extracto de café

El extracto de café obtenido por percolación en batería utilizando agua a temperatura ambiente como disolvente, en las 3 granulometrías (fina, media y gruesa) de café después de 8 horas de extracción tuvo una concentración final de 5 °Bx. El Cuadro 9 muestra las principales características del extracto obtenido de las tres moliendas donde cabe resaltar el bajo rendimiento de la extracción en cuanto a volumen final y concentración (°BX).

Cuadro 9. Características del extracto de café con agua a temperatura ambiente.

Grado de molienda	Aumento del volumen del grano	Volumen final	Concentración (°Bx)	Ph
Fina	50%	100 ml	5 °Bx	5.2
Media	30%	91 ml	5 °Bx	5.2
Gruesa	30%	88 ml	5 °Bx	5.2

La Figura 8 muestra la diferencia de color del extracto de café con agua a temperatura ambiente (A) y con agua caliente (B), donde se puede observar un color café oscuro en el extracto obtenido a partir de agua caliente como disolvente a diferencia del obtenido en agua a temperatura ambiente.

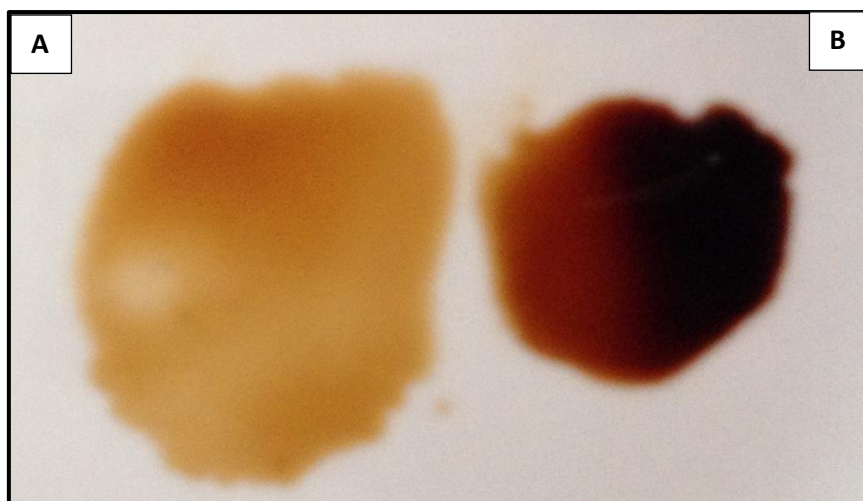


Figura 8. Extracto final de café. (A) En agua a temperatura ambiente y (B) en agua caliente.

En cuanto al extracto de café obtenido a partir de agua caliente como disolvente, presenta diferencias significativas en las 3 granulometrías (fina, media y gruesa) de café, después de las 8 horas de extracción. El Cuadro 10 muestra las principales características de los extractos de café, donde resalta el elaborado a partir de granulometría media, por su alto contenido de °Bx y mayor volumen final.

Cuadro 10. Características del extracto de café con agua caliente.

Grado de molienda	Aumento del volumen del grano	Volumen final	Concentración (°Bx)	pH
Fina	60%	310 ml	15°Bx	5.2
Media	80%	310 ml	35 °Bx	5.2
Gruesa	80%	300 ml	25 °Bx	5.2

La Figura 9 muestra los extractos finales de café a diferentes grados de molienda, con agua caliente donde se observa color característico del grano en molienda media.

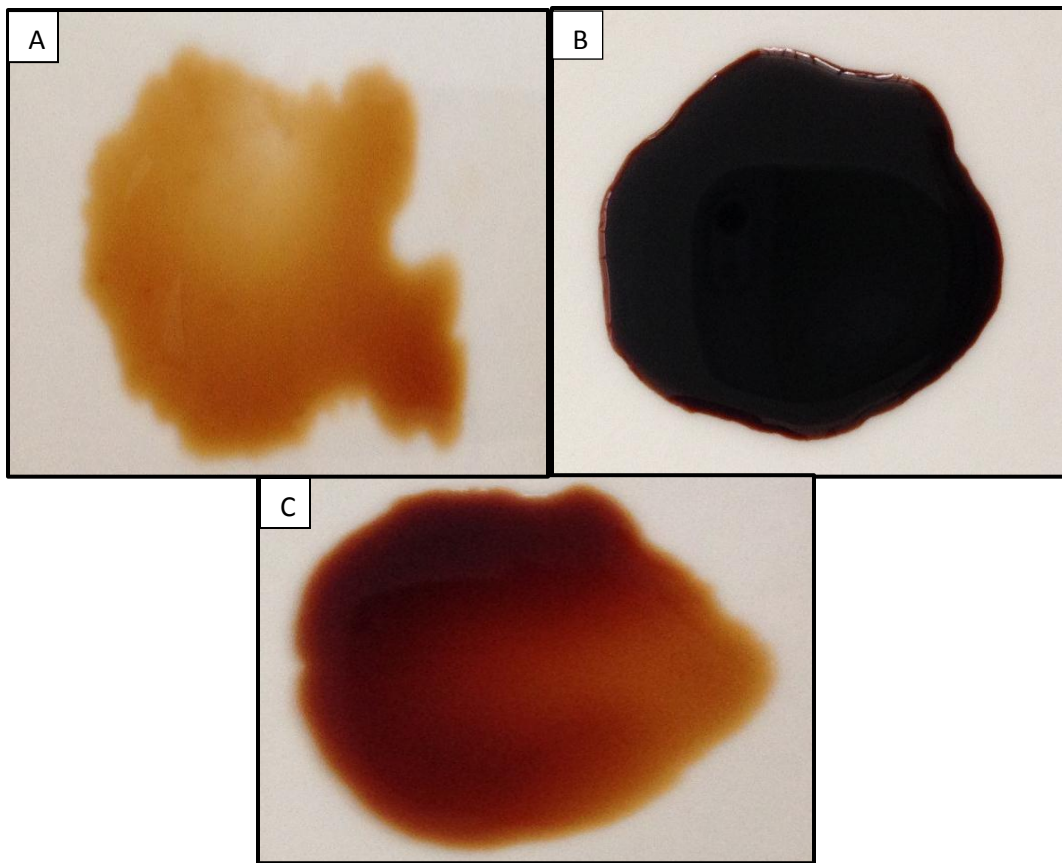


Figura 9. Extracto final. (A) molienda fina, (B) molienda media y (C) molienda gruesa.

Ortega *et al.*,(2008), menciona que el primer cambio es el aumento paulatino de volumen del grano lo que ocasiona que el agua moje gradualmente cada partícula de café mejorando la interacción solido-líquido logrando una óptima extracción de solidos solubles, dando como resultado un extracto de café de mayor concentración utilizando molienda fina a diferencia de esto en el presente trabajo se obtuvo mayor concentración ($^{\circ}\text{Bx}$) en molienda media, debido a que la temperatura de agua utilizada aumento la superficie especifica de interacción entre el soluto y solvente, sin provocar daños las partículas de café lo que dio como resultado un extracto de mayor concentración ($^{\circ}\text{Bx}$).

Así comparando los resultados fue posible seleccionar, el mejor extracto de café en función del grado de molienda y rendimiento en cuanto a volumen final y concentración de $^{\circ}\text{Brix}$ seleccionando al extracto obtenido de la molienda media.

11.2 Bromatología del extracto de café.

La prueba de humedad a partir de la pérdida de agua en el café arrojó un porcentaje de 94.32%, de esta forma el 5.68% restante son solutos. Buitrago (2008), menciona que el agua dentro de los alimentos se encuentra como “agua libre” y “agua ligada” el agua libre es la forma predominante y es liberada del alimento con gran facilidad, mientras que el agua ligada está combinada o absorbida a proteínas, hidratos de carbono u otras partículas coloidales y no puede ser totalmente removida de una estructura, además menciona que el café es una bebida conformada mayoritariamente por agua. La NMX-F-013-2000 señala que el porcentaje de humedad debe ser entre el 94 y 96%, comparado a lo anterior el porcentaje de humedad se encuentra dentro de los valores de referencia.

El contenido de cenizas fue de 4.9% bs, lo que indica que se encuentra dentro de los valores de referencia establecidos por la NMX-F-013-2000, la cual indica un porcentaje entre 4-17% bs de cenizas. Aurand (2008), menciona que porcentajes de cenizas cercanos al 5% bs, permiten visualizar la composición del extracto de café, al conocer la cantidad de minerales presentes libres o asociados.

El resultado de la prueba de proteínas fue de 1%, que en comparación con lo mencionado por Hernández (2007) que indica que el extracto de café puede estar conformado hasta por el 3% bs de proteínas, se obtuvo un valor bajo que podría ser explicado por el proceso de torrefacción al cual es sometido el café a altas temperaturas donde pueden haberse desnaturalizado proteínas presentes en el extracto. La NMX-F-013-2000 menciona que el porcentaje de proteínas es de hasta 4% bs en el grano de café por lo cual su ausencia de estas, no es relevante en la composición del café. En comparación a esto el extracto de café cuenta con un porcentaje normal de proteínas.

La cantidad de extracto etéreo presente en el extracto de café fue de 11.2% bs, considerando que la NMX-F-013-2000, establece valores normales de 8-18 % bs, el porcentaje de extracto etéreo en el extracto de café se encuentra dentro de los valores normales, lo que indica que a pesar de utilizar como solvente agua caliente,

esta no daña los ácidos grasos presentes en el café lo que aporta un valor nutricional a la bebida.

La cuantificación de azúcares totales y azúcares reductores fue de 5.0% y 2% respectivamente que comparado con lo indicado en la NMX-F-013-2000 que establece valores de 5-7 % de azúcares totales y 2-6%, los valores se encuentran dentro de lo normal.

11.3 Microbiología del extracto de café.

El resultado de la prueba de mesofilos aerobios arrojó un número considerable de este grupo de microorganismos, donde su presencia es como indicadores que reflejan una deficiencia en la calidad sanitaria del alimento. Este resultado indica que existen condiciones favorables para el desarrollo de patógenos causantes de enfermedades transmitidas por los alimentos por ello resulta importante una observación microscópica. Las placas de mesofilos aerobios pusieron en manifiesto colonias blancas de tamaño grande, con bordes irregulares (Figura.10) a las que se les realizó tinción de Gram encontrando bacterias del género *Bacillus* gran positivas (Figura 11).



Figura 10. Morfología de colonias de *Bacillus* presentes en el extracto de café.

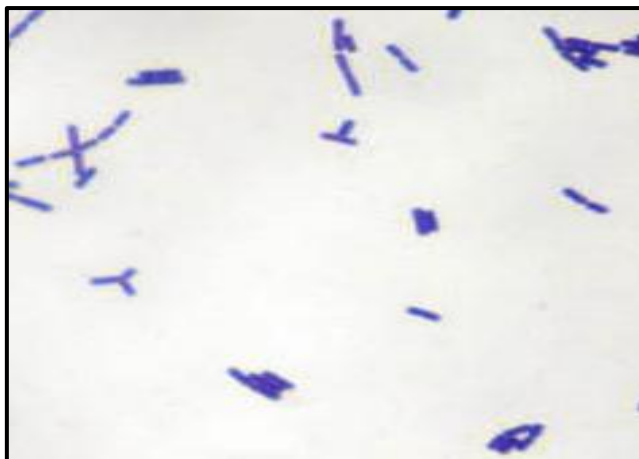


Figura 11. Tinción de Gram. Bacterias Gram positivas del genero *Bacillus*.

La morfología de las levaduras fue puntiforme, redondas, color rosa y aspecto brillante (Figura 12). La figura 13 muestra su morfología en microscopio. La presencia de levaduras puede alterar la estabilidad del extracto de café modificando sus características, además de reducir su tiempo de conservación debido a la fermentación que se ve favorecida por el valor de pH.

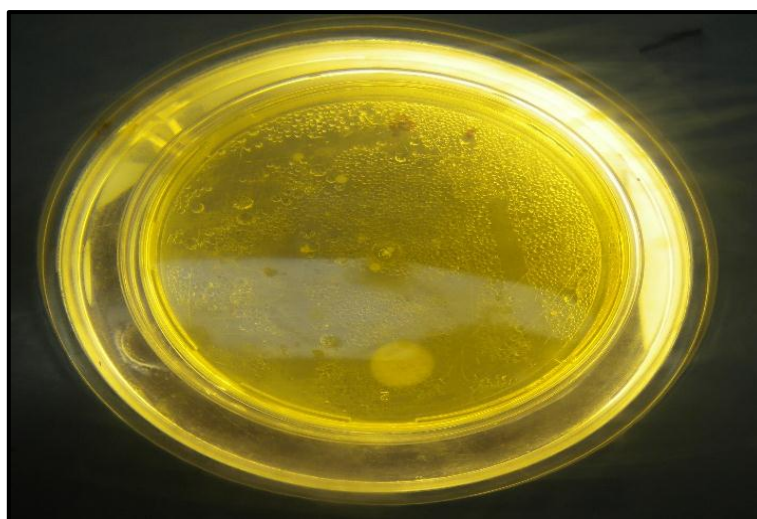


Figura 12. Morfología de colonias en agar papa dextrosa acidificado.

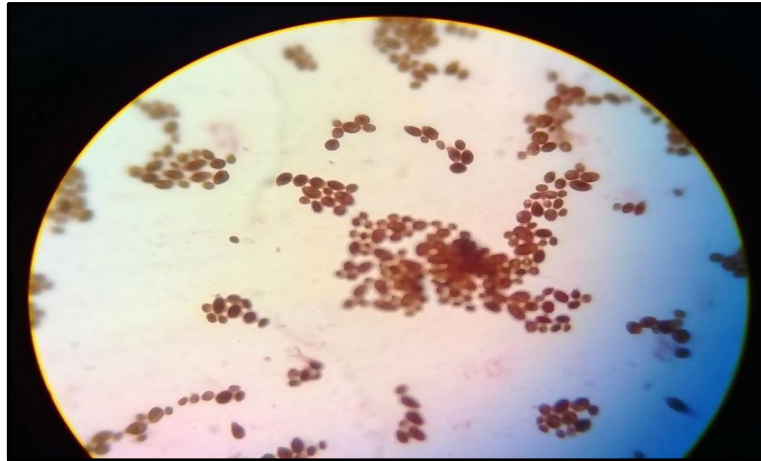


Figura 13. Morfología de levaduras presentes en el extracto de café.

Las pruebas de coliformes totales y coliformes fecales fueron negativas, esto indica que las prácticas sanitarias en el manejo del café y en la elaboración del extracto fueron las adecuadas, evitando riesgos sanitarios que involucren la salud humana. La Figura 14 muestra las pruebas negativas de coliformes totales y coliformes fecales del extracto de café. La NTC-4675-1999, establece que las pruebas de coliformes totales y fecales, deben ser negativas para extractos de café, lo que coincide con los resultados obtenidos.



Figura 14. Prueba de coliformes totales y fecales negativas.

La prueba de *Salmonella* fue negativa lo que coincide con lo establecido por la NTC-4675-1999, la cual señala que el café debe estar nulo de este tipo de microorganismos que pueden causar algún daño a la salud.

11.4 Evaluación del bioconservador Nisina sobre microorganismos presentes en el extracto líquido de café.

La cinética de crecimiento de bacterias del genero *Bacillus* en caldo Mueller Hilton adicionado con nisina a una concentración de 5,000 UI/mL es representada en la Figura15, donde cabe resaltar el efecto inhibitorio del bioconservador.

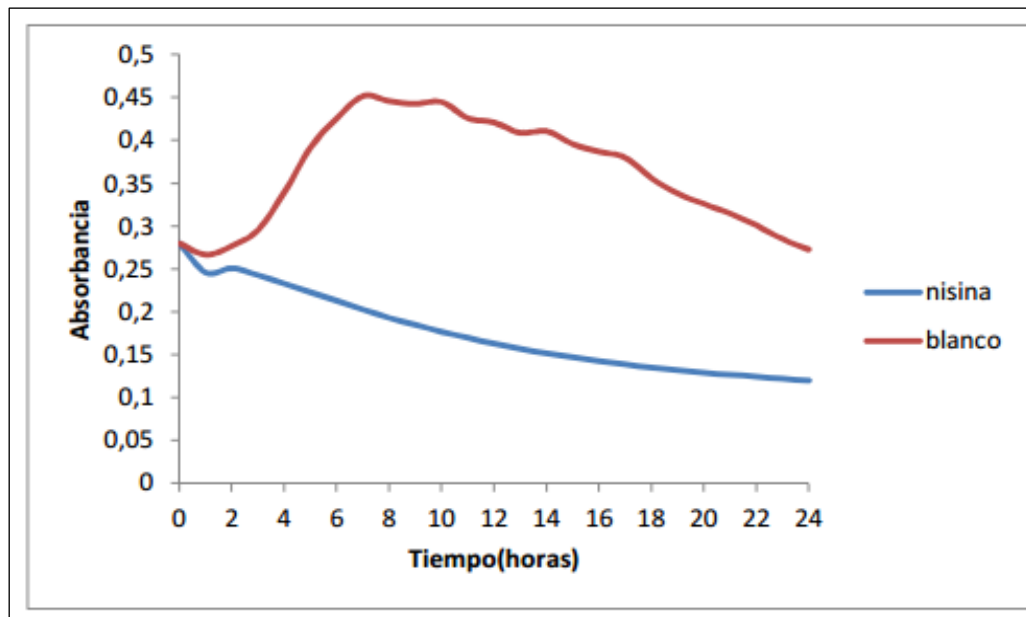


Figura 15. Cinética de crecimiento de la Bacteria del genero *Bacillus*, en caldo Mueller Hinton sin y con nisina a una concentración de 5,000 UI/mL.

Esto se utilizó como fundamento para evaluar tres concentraciones de nisina: 5000 UI/mL, 3750 UI/mL y 2500 UI/mL, por medio de la cinética de crecimiento de ambos microorganismos usando como sustrato el extracto de café seleccionado a 35 °Bx durante 24 horas.

En la Figura 16 se puede observar el comportamiento de las bacterias del género *Bacillus* a las tres concentraciones de nisina antes mencionadas en el extracto de café. Donde se aprecia que el comportamiento de estos microorganismos a una concentración inicial de 1.5×10^8 UFC/mL a una concentración de nisina de 5000 UI/mL tiene un efecto casi inmediato destacando el decrecimiento de este microorganismo en la fase exponencial que pone en evidencia la capacidad bactericida del bioconservador sin embargo esta misma inhibición se observa a concentración de 3750 IU/mL. A medida que la concentración de nisina disminuye el efecto cambia de ser bactericida a bacteriostático hasta que no se percibe ningún efecto inhibitorio sobre estos microorganismos. El decrecimiento de este microorganismo asegura la calidad del café, ya que muchas veces este no es utilizado de inmediato por lo que podría haber factores a su alrededor que alteren su calidad.

La inhibición observada experimentalmente se puede explicar porque la nisina ejerce su acción sobre bacterias formando un complejo con el lípido II, un precursor en la formación de la pared celular de las bacterias gram positivas, el complejo se inserta sobre la membrana citoplasmática formando poros permitiendo que los componentes celulares salgan dando como resultado la muerte de la bacteria Joerger. (2009)

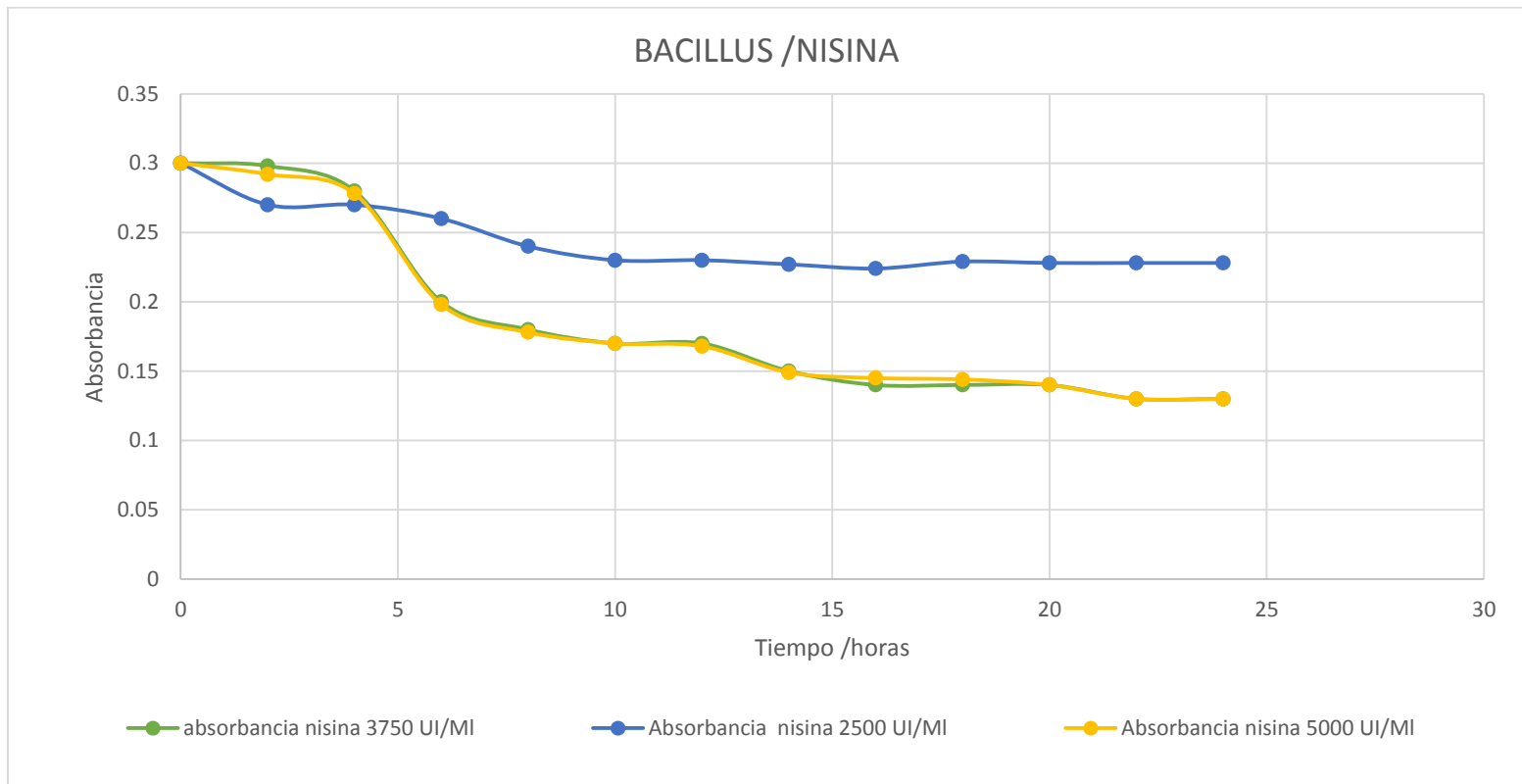


Figura 16. Acción de la nisina a tres concentraciones sobre el extracto de café a 35 °Bx.

En la Figura 17 se puede observar el comportamiento de las levaduras a las tres concentraciones de nisina antes mencionadas en el extracto de café. Para las levaduras resulta un poco menos evidente el efecto de la nisina donde se observan cambios similares en su decrecimiento, lo que indica que su acción sobre levaduras es bacteriostática.

El mecanismo de acción en levaduras no es conocido, sin embargo; se ha demostrado que la nisina tiene un efecto inhibitorio en algunas de ellas.

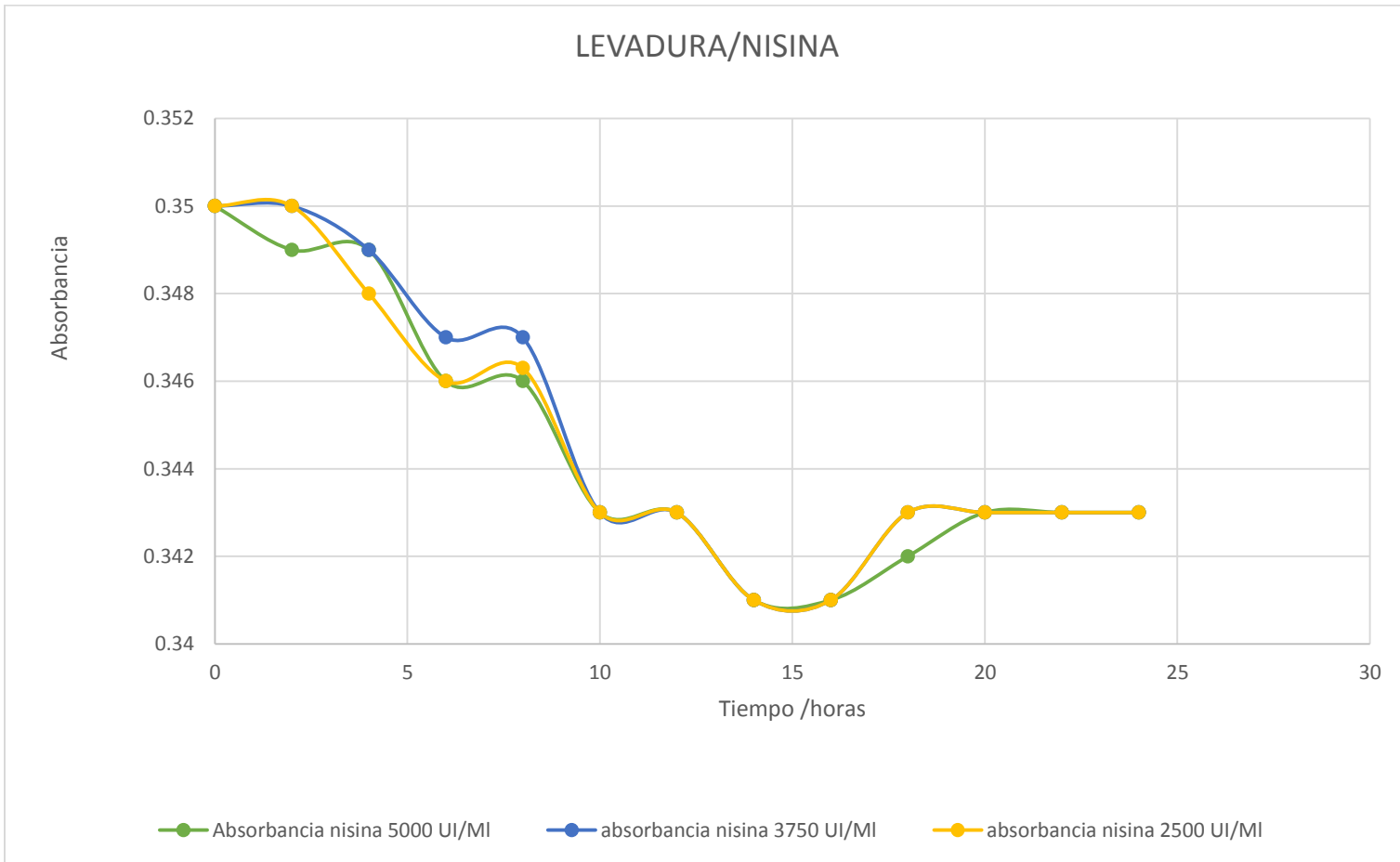


Figura 17. Acción de la nisina a tres concentraciones sobre levaduras en el extracto de café a 35 °Bx.

12. Conclusiones

El mejor extracto de café se obtuvo por percolación en batería utilizando agua caliente a partir de la molienda media obteniendo 310 ml del extracto a 35 °Bx.

Las pruebas bromatológicas realizadas al extracto de café, permiten concluir que su porcentaje de humedad, cenizas, proteínas, extracto etéreo, azúcares totales y azúcares reductores se encuentran dentro de los valores normales establecidos por la Norma Mexicana NMX-F-013-2000. CAFÉ PURO TOSTADO, EN GRANO O MOLIDO, SIN DESCAFEINAR O DESCAFEINADO, ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA así como por la NORMA TÉCNICA COLOMBIANA 4675. CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA EL EXTRACTO LIQUIDO DE CAFÉ.

Las pruebas microbiológicas arrojaron conteos superiores a los establecidos por la NORMA TÉCNICA COLOMBIANA 4675. CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA EL EXTRACTO LIQUIDO DE CAFÉ, en Mesofilos aerobios y Levaduras.

El bioconservador (Nisina) puede ser utilizado a una concentración de 3750 UI/mL ejerciendo un efecto inhibitorio frente a bacterias del genero *Bacillus*.

La nisina puede ser utilizada como bioconservador frente a levaduras en el extracto de café a una concentración de 2500 UI/mL debido a que presenta diferencias mínimas de inhibición a las tres concentraciones.

A medida que la concentración de nisina disminuye el efecto cambia de ser bactericida a bacteriostático hasta que no se percibe ningún efecto inhibitorio sobre estos microorganismos.

13. Recomendaciones

Hacer la identificación de la especie de los microorganismos aislados en el extracto de café a 35 °Bx.

Evaluar la estabilidad microbiológica del extracto de café adicionado con nisina en tiempos mayores a las 24 horas con el fin de determinar si su uso es efectivo en periodos mayores de tiempo como días e incluso meses logrando mantener la inhibición de estos microorganismos.

Evaluar si la adición de nisina no altera atribuciones propias del café como olor, sabor y color en periodos mayores de tiempo.

Evaluar diferentes concentraciones iniciales de microorganismos con el fin de determinar a qué concentración ejerce mayor efecto el bioconservador y determinar sus rangos de acción.

Evaluar la metodología en cepas nativas de estos microorganismos y comparar con los resultados obtenidos.

14. BIBLIOGRAFÍA:

- AAFCO (Association of American Feed Control Officials). (2000). Official Publication, Association of American Feed Control Inc. West Lafayette, IN 47971 USA, p.444.
- Aga E., Bekele E., Bryngelsson T. (2005). Inter-simple sequence repeat (ISSR) variation in forest coffee trees (*Coffea Arabica*). *Genética* 124(2-3), p.213-221.
- Alegría Á., Delgado S., Roces C., López B., Mayo B. (2010). Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *International journal of food microbiology*, 143(1), p.61-66.
- Angelidis A. S., Chronis E. N., Papageorgiou D. K., Kazakis I. I., Arsenoglou K., C Stathopoulos G. A. (2008). Non-lactic acid, contaminating microbial flora in ready-to-eat foods: A potential food-quality index. *Food microbiology*, 23(1), p.95-100.
- Aserca A. (2013). Cumbre Latinoamericana del Café. Agosto 2013. Recuperado el 08 de Diciembre de 2014 en <http://www.mexbest.com/es/eventos-y-misiones-comerciales/cumbrelatinoamericana-del-caf.html>.
- Astorga C., Topart P., Bertrand B., Lashermes P. (2012). La caracterización de las variedades de café (*Coffea arábica*) por los marcadores moleculares: ¿mito o realidad?, *Boletín Promecafe* no. 93. p. 9-13.
- Auliffe O., Ross R., Hill C. (2009). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *España*, 30(5), p 134-135.
- Aurand L. W. (2008). Food Composition and Analysis. An AVI Book. The Journal of Biological Chemistry. New York, 12(3) p. 02-06.
- Avanza M. (2001). Proteínas funcionales. *Jornada de biología y química*. 272(2), p.19-20.
- Baxter J. (2010). *El libro del café*. Madrid: Susaeta Ediciones, p.17-19.
- Bennidet G. L., Fetell B., Henny C. A. (2013). Influence of addition of green tea and green coffee on the properties of products. *Food Research International*, 50(1), p. 149-160.
- Borrelli R. C., Esposito F., Napolitano A., Ritieni A., Fogliano V. (2009). Characterization of a new potential functional ingredient: coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), p.1338-1343.

- Buitrago B. (2008). Determinación del contenido de humedad en tiempo real durante el secado en silios. Informe anual de actividades. Chinchina: Cenicafe, p.13
- Cabo M., Murado M., González M., Pastoriza L. (2011). Effects of aeration and pH gradient on nisin production. A mathematical model. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(4-5), p.264-273.
- Calvo B., Gómez C., López N., Royo B. (2013). *Nutrición, Salud y Alimentos funcionales*. España: Arazandi, p. 15-25.
- Cannell M. G. R. (2010). Physiology of the coffee crop. In Clifford, MN; Willson, KC. *Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage*. London, RU, Croom helm, p.108-134.
- Carvajal O., Nolasco C., Bujang K., Ishizaki A. (2009). Production of nisin Z using *Lactococcus lactis* IO-1 from hydrolyzed sago starch. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36(3), p. 409-415.
- Castaño C., Quintero G. P. (2008). Calidad de extractos de café perforado por broca obtenidos por crioconcentración. *Cenicafé* 55(3), p183-201.
- Castellano P., Belfiore C., Fadda S., Vignolo G. (2008). *A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina*, *Meat science* 79 (3), p.483 - 499.
- Castro G., Valbuena E. (2009). Bioconservación: alternativa para mejorar la calidad de los quesos. Fundación Girarz, Ediciones Astro Data S.A. p 920-929.
- Consejo Mexicano del Café. (2012). *Cultura del Café. Cafés de México*, 76, p.1-3.
- Consejo Nacional de Evaluación de la Política de Desarrollo Social. (2010). *Dimensiones de la seguridad alimentaria: Evaluación estratégica de nutrición y abasto*. México, DF. p. 2-8
- Cotter P. D., Hill R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol*, p. 777-788.
- Cubero N., Montferrer A., Villalta J. (2009). *Aditivos alimentarios* Editorial Mundi-Prensa Libros, S.A. Madrid, p.34-45.
- Dabes A. C., Santos W. L. M., Pereira E. M. (2009) Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas aisladas de productos cárnicos frente a *Listeria monocytogenes*

- y *Staphylococcus aureus*. *Arq. Brasileiro Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 53(1), p.1 -7.
- Delves G., Dinnory R. (2008). *Nisin as a food preservative*. *Food Australia*; 57, p. 527-525.
- Dórea G., Da Costa T. H. (2009). *Is coffee a functional food?*. *Br. James*. 2005; 93(6), p. 80-82.
- Escartin F. E. (2010), *Microbiología e inocuidad de los alimentos*. Universidad Autónoma de Querétaro, México. p. 520-527.
- Escorlinia D., Ferrocino L., Storia A., Mauriello G. (2010). Development of spoilage microbiota in beef stored in nisin activated packaging. *Food Microbiology*, 27(1), p. 137-143.
- Esquivel P., Jiménez V. (2012). Functional properties of coffee and coffee by products. *Food Research International*, 46(2), p.488-495.
- Faustino H., James C., Gimmes J. (2013). Nisin biotechnological production and application: a review. *Tren in Food Technol*; 20, p.146-154.
- Federación Nacional De Cafeteros – FNC. (2000). Bogotá. Colombia. *Café. Normas sobre la calidad del café*. Bogotá, FNC, 1988. 4 p. 6. *Caracterización granulométrica del café tostado y molido colombiano*. Manizales, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería y Arquitectura p.131 (Tesis: Ingeniero Químico).
- Feria P. F. (2007). *Aislamiento y caracterización Bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 en suero de leche*. Tesis Msc Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Medellín - Colombia, p 84.
- Fernández J. (2000). *Microbiología e inocuidad de los alimentos*. Universidad Autónoma de Querétaro, México. p. 105-110.
- Field D., Connor P. M., Cotter P. D., Hill C., Ross R. P. (2008). The generation of nisin variants with enhanced activity against specific gram-positive pathogens. *Molecular microbiology*, 69(1), p. 218-230.

- Finnell B., Penny J., Lomery C. (2012). Influence of roasting conditions on fatty acids and oxidative changes of Robusta coffee oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(9), p.1052-1061.
- Flament I., Bessièrè Y. (2002). Coffee flavor chemistry. *Agricultural Research*, 13, p. 32-34.
- Forbes B. A. (2007). *Diagnostic microbiology* (11th. Ed), Missouri. Mosby. p. 211-245.
- Frazier W. C., Westhoff D. C. (2000) *Microbiología de los Alimentos*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, p 5-7.
- Gálvez A., Abriouel H., López R. L. (2009). *Bacteriocin-based strategies for food biopreservation*. *International journal of food microbiology*, 120(1), p.51-70.
- Geo F y Stephen J. (2012). *Microbiología Médica de Jawetz*. Manual Moderno 17a Edición, p. 274-275
- Guerra G., Moss C. B. (2008). Mathematical model for Mexican coffee market. *Gestão de Negócios*. 6(5), p.27-33.
- Gusstain H., Torres A., Lopez H., Monte B. (2007). Analysis of the heat and mass transfer during coffee batch roasting (2a Ed.) Madrid España: Engineering. 78, p.1141-1148.
- Hernández J. A. (2007). Analysis of the heat and mass transfer during coffee batch roasting (2a Ed.) Madrid España: Engineering. 78, p.1141-1148.
- International Coffee Organization (2015). Coffee market report. *Agricultural Research*, 24, p. 3-16.
- Jeevaratnam K., Jamuna M., Bawa A. (2010). Biological preservation of foods- Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Indian J Biotechnology*. 4(6) p.446-454.
- Joerger R. (2009). Alternatives to antibiotics: Bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Science*, 82(4), p.640-647.
- Jozala A. F., Silva D. P., Vicente A. A., Teixeira J. A., Júnior A. P., Penna T. C. (2013). Processing of byproducts to improve nisin production by *Lactococcus lactis*. *African Journal of Biotechnology*, 10(66), p.14920-14925.

- Jozala A., Lopes A., Mazzola P., Magalhaes P., Vessoni T., Pessoa A. (2008). Liquid-liquid extraction of commercial and biosynthesized nisin by aqueous two-phase micellar systems. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(2), p.107-112.
- Kornacki J.L., Johnson J.L. (2011) "Enterobacteriaceae, Coliforms, and Escherichia coli as Quality and Safety Indicators". In: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4th ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.) APHA. Washington p.69-82.
- Linares A., Rinantonio V. (2005). *Espresso coffee: The science of quality*. Elsevier, 52, p.23-45.
- Lilly B., Viani A. (2005). *Espresso coffee: The science of quality*. Elsevier, 52, p.398.
- Madigan T., Martinko J. (2008). Brock, *Biology of Microorganisms*, 11a Ed, p 935-936.
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2012). Ministerio de Salud y Protección Social. Disponible en: www.minsalud.gov.co/Normatividad/Proyecto%20de%20Resoluci%C3%B3n%20lista%20positiva%20de%20aditivos.pdf.
- Monroy M., Castro T., Fernández F. J., Mayorga L. (2009). Revisión Bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *Contactos*, 73(5), p.63-72.
- Motta A. S., Brandelli A. (2008). Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocin-like substance by *Bacillus* sp. Strain P34. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(5), p.641-646.
- Multon L. (2010). *Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias* (2ª ed.). Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, p.04-18.
- NMX-F-013-2000. Café puro tostado, en grano o molido, sin descafeinar o descafeinado. Especificaciones y métodos de prueba.
- Norma Mexicana NMX-F-066-S-1978. Determinación de cenizas en alimentos.
- Norma Mexicana NMX-F-068-S-1980. Determinación de proteínas en alimentos.
- Norma Mexicana NMX-F-083-1986. Determinación de humedad en productos alimenticios.

Norma Mexicana NMX-F-089-S-1978. Determinación de extracto etéreo (método Soxhlet) en alimentos.

Norma Mexicana NMX-F-312-1978. Determinación de azúcares reductores y totales en alimentos.

NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes.

NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

NOM-114-SSA1-1994. Bienes y Servicios. "Método para la determinación de Salmonella en alimentos".

Norma Mexicana NMX-F-013-2000. Café puro tostado, en grano o molido, sin descafeinar o descafeinado. Especificaciones y métodos de prueba.

Norma Mexicana NMX-f-173-scfi-2011, Café tostado con azúcar y café tostado mezclado con azúcar. Diario Oficial de la Federación Septiembre 2011.

Norma Técnica Colombiana NTC-4675-1999. Criterios microbiológicos para el extracto líquido de café.

Octavio P. (2011). Composición de una taza de café y su consumo. *Cenicafé*, 414, p. 1-14.

Ortega A., Borges P., Roncal E., Rogert E., Pino J. (2008). "Obtención de extracto de café por percolación". *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 18(3), p.52.

Pendergrast M. (2012). "El Café (Historia de la semilla que cambió el mundo)" (1.a edición ed.). Barcelona: Javier Vergara, p. 4-8.

Peysson R. S. (2011). *Historia del café: El mundo del café*. Barcelona: Ultramar Eds. S.A, p. 5-21.

Pierson L., Smoot M. (2001). Indicator microorganisms and microbiological criteria. *Food Microbiology. Fundamentals and frontiers*. (2nd Ed).USA. p. 71-87.

- Puerta G.I. (2008). Riesgos para la calidad y la inocuidad del café. Chinchiná, Cenicafé (Avances técnicos No.371) p.18
- Puerta V. (2008). Factores para preservar la calidad del café. *Cenicafé*, 352, p. 3-11.
- Puerta V. (2011), Composición de una taza de café. *Cenicafé*, 414, p. 1-14.
- Riedemann C. (2007). La focalización de los subsidios a los granos en México. Polis: Investigación y Análisis Sociopolítico y Psicosocial, p. 69-103.
- Rodríguez A., Edurne L. O. (2008). Bases de la alimentación humana (2da Ed). España: Gesbiblo. Cap. 5, p.2-8.
- Rojas C., Vargas P. (2011). Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. *Tecnología en marcha*, 21(2), p. 9-16.
- Rojas J. (2007). Green coffee storage. In Wintgens, JN. Ed. *Coffee: growing, processing, sustainable production: a guidebook for growers, processors, traders, and researchers*. Corseaux, CH, Wiley-VCH. p. 733-750.
- Russell N., Warwick G. (2008). Food preservatives. Ed. Wkap. Estados Unidos p. 147-148
- SAGARPA, (2006). Fomento productivo del café mexicano. *Claridades agropecuarias*, 89, p.18-22.
- Sangronis, E., García J. (2007). Efecto de la adición de nisina en los parámetros físicos, químicos y sensoriales del queso "telita". *An. Venez. de Nutrición.*, 20 (1), p.12-16.
- Schlegel H. (2008). Microbiología general. Barcelona: Ediciones Omega, p.448
- Secretaría de Hacienda y Crédito Público, (2014). Panorama del café. *Financiera nacional de desarrollo*, 28, p.123-125.
- Sivetz M., Desrosier N. W. (2013). *Coffee technology*. Westport, Connecticut: AVI Publishing Company, p.176.
- Svetoch E. A., Eruslanov B. V., Perelygin V. V., Mitsevich E. V., Mitsevich I. P., Borzenkov V. N., Stern N. J. (2008). Diverse antimicrobial killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 bacteriocin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(6), p.1942-1948.

- Swanson K.M., Petran R.L., Hanlin J.H. (2009) "Culture Methods for Enumeration of Microorganisms". In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.) APHA. Washington p. 53-67.
- Tiwari B. K., Valdramidis V. P., O'Donnell C. P., Muthukumarappan K., Bourke P. Cullen P. J. (2010). Application of natural antimicrobials for food preservation. *J Agric Food Chem*, 57(14), p. 5987-6000.
- Vásquez S. M., Suárez H., Zapata B.S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*, 36(1), p.64-71.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos & Verstraete, W., Probiotic bacteria as biological agents in aquaculture, *Micro. And Mole. Biol. Rev.*, 64 (4) 655-671, 2000.
- Vicentt R. R., Solar F. M. (2008), Bases de la alimentación humana (2da Ed). Netbiblo, S.L. p. 300-323.
- Vidhyasagar V., Jeevaratnam K. (2013). Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties in vitro. *Journal of Functional Foods*, 5(1), p.235-243.
- Zamarripa C. (2010). Coffee propagation. In Wintgens, JN. Ed. Coffee: growing, processing, sustainable production: a guidebook for growers, processors, traders, and researchers. Corseaux, CH, Wiley-VCH. p. 87-136.