



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Comportamiento de microorganismos patógenos durante la elaboración de bebidas sustitutas de leche a base de avena”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

PRESENTA

Q.F.B. LUIS IVÁN MORALES MARTÍNEZ

DIRIGIDA POR:

DRA. MONTSERRAT HERNÁNDEZ ITURRIAGA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2021.



Universidad Autónoma De Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

TESIS

“Comportamiento de microorganismos patógenos durante la elaboración de bebidas sustitutas de leche a base de avena”

Como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Presenta:

Q.F.B. Luis Iván Morales Martínez

Dirigida Por:

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga

SINODALES

Dra. Montserrat Hernández Iturriaga
Presidente

Dra. Sofía María Arvizu Medrano
Secretario

Dra. Marcela Gaytán Martínez
Vocal

Dr. Eduardo Morales Sánchez
Suplente

Dr. Jesús Alejandro Aldrete Tapia
Vocal

Centro universitario, Querétaro, Qro.
Enero, 2022
México

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Dra. Montserrat Hernández Iturriaga por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, guiarme y apoyarme con su catedra que serán necesarios para continuar con mi formación no académica, y porque no, por ser una amiga cuando fue necesario.

A mis sinodales Dra. Sofía María Arvizu Medrano, Dra. Marcela Gaytán Martínez, Dr. Eduardo Morales Sánchez y Dr. Ale Aldrete por toda su guía apoyo, comentarios y observaciones realizadas ya que sin ellas no hubiera alcanzado el nivel necesario para concluir los objetivos que se habían planteado. Y al Dr. Peniche profesor, guía y amigo, gracias QEPD.

Agradezco a CONACYT por brindar el apoyo necesario que permitieron concluir con éxito este proyecto, y formar parte de este noble sistema que es la investigación.

Agradezco a mis padres Mtro. Jose Luis Morales y Q.F.B. Verónica Martínez, no solo por ser los mejores “patrocinadores” que un individuo en crecimiento merezca, también confiar en que era y soy capaz de lograr mis propios objetivos, brindarme su cariño incondicional y desmostarme que “él no se puede” es solo una ilusión, muchas gracias no los hubiera hecho sin ustedes.

A la Mtra. Ix-chel Hernández y Mtro. Marco Mercado por no solo convencerme en estudiar un posgrado, si no por continuar con su guía durante esta etapa de mi vida.

A la M.C. Andrea Calderón, no tengo palabras para agradecerte todo el apoyo, amor y tu paciencia que he tenido el benéfico de recibir de tu parte “Asin you cosa rara”.

Mi hermana Lic. Anaid Morales, mis amigos M.C.T.A. Gabriela Mina, M.C.T.A. Nayeli Soria, M.C. Adán Espinosa y compañeros de maestría por formar parte de esta etapa de crecimiento personal y mantenerme con ánimo y hacerme reír en momentos difíciles

Un profundo agradecimiento a C. María del Carmen Campos, que con mucha paciencia extendió sus obligaciones más allá sus responsabilidades laborales, facilitándome la realización de trámites institucionales de los cuales carezco de conocimientos y experiencia.

Al Dr. Felix Luna Morales, gracias por ser la primera persona que me permitió adentrarme al campo de la investigación, siendo un ejemplo a seguir al darme su apoyo, demostrarme el beneficio de la paciencia, guiarme para mi crecimiento personal y laboral, sin importar la decisión que tomase.

Para aquellos perdedores del sistema que se rindieron y dejaron de luchar por sus sueños, dificultándome el cumplimiento de mis objetivos, que, sin su ayuda no hubiera caído para volver a levantarme, no hubiera aprendido para ser más fuerte y sobretodo no tendría las motivaciones para seguir adelante, ya que son el reflejo de lo que no quiera ser. Gracias.

RESUMEN

Las bebidas elaboradas con semillas, frutos secos, leguminosas y cereales, como la avena, se han vuelto populares en los últimos años. Durante la preparación de bebidas artesanales, se puede incurrir en deficiencias en las buenas prácticas sanitarias generando riesgos a la salud del consumidor. En este trabajo se evaluó el comportamiento de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* en diferentes etapas de la preparación de bebidas de avena a nivel casero. En avena cruda se cuantificó el contenido de bacterias mesófilas aerobias (BMA), coliformes totales, coliformes fecales, hongos y levaduras, y se determinó la presencia de *L. monocytogenes* y *S. enterica*. Avena cruda se inoculó con una mezcla de cinco cepas de *L. monocytogenes* (7.06 ± 0.18 Log UFC mL⁻¹) y *S. enterica* (7.14 ± 0.05 Log UFC mL⁻¹) y se almacenó a 25 °C durante 165 días. La avena Inoculada se sometió a remojo durante 12 h a 25 °C, y cada 4 h se cuantificó la población de *L. monocytogenes* y *S. enterica*. Posteriormente, utilizando avena inoculada con y sin remojo, se prepararon bebidas (calientes y frías) empleando una máquina de uso casero. Finalmente, las bebidas elaboradas se almacenaron durante 7 días a 5 °C. Se cuantificaron las poblaciones de los patógenos después de la elaboración de la bebida de avena y durante el almacenamiento. En la avena cruda el contenido de BMA fue 1.48 ± 0.18 Log UFC g⁻¹, los indicadores microbianos restantes estuvieron por debajo del límite de detección (<10 UFC g⁻¹) y sólo *Salmonella* fue detectada (10 %). Durante el almacenamiento de la avena inoculada, ambos patógenos disminuyeron lentamente y después de 165 días de almacenamiento aún estaban presentes *L. monocytogenes* (1.83 Log UFC g⁻¹) y *S. enterica* (1.27 Log UFC g⁻¹) mostrando velocidades de muerte de 0.00097 y 0.00091 Log UFC h⁻¹, respectivamente. En cambio, durante el remojo ambos patógenos desarrollaron hasta alcanzar poblaciones de aproximadamente 7 Log UFC g⁻¹; *S. enterica* desarrolló más rápido (0.247 Log UFC h⁻¹) que *L. monocytogenes* (0.193 Log UFC h⁻¹). La preparación de bebidas calientes con avena sin remojo redujo 4.15 y 3.67 Log UFC g⁻¹ de *L. monocytogenes* y *S. enterica*, respectivamente; mientras que, en las bebidas preparadas con avena remojada, independientemente del microorganismo las reducciones fueron mayores (promedio 6.78 Log UFC g⁻¹). La preparación de bebidas frías no redujo la población de los patógenos. Durante el almacenamiento en refrigeración de las bebidas *L. monocytogenes* y *S. enterica* permanecieron estables, con la excepción de las bebidas frías de avena sin remojo inoculadas con *L. monocytogenes* donde creció 3.54 Log UFC g⁻¹. Durante la preparación de bebidas de avena se puede propiciar el desarrollo microorganismos patógenos en caso de usar materia prima contaminada. El tratamiento térmico aplicado durante la preparación de bebidas a nivel casero y su almacenamiento en refrigeración logra el control de las poblaciones de los microorganismos patógenos.

Palabras clave: Bebida vegetal, avena, remojo, preparación casera

ABSTRACT

Beverages made from seeds, nuts, legumes, and grains, such as oats, have become popular in recent years. During the preparation of artisanal beverages, deficiencies in good sanitary practices can occur, generating risks to the health of the consumer. In this work, the behavior of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in different stages of the preparation of oat beverages at home was evaluated. In raw oats, the content of aerobic mesophilic bacteria (BMA), total coliforms, fecal coliforms, fungi and yeasts was quantified, and the presence of *L. monocytogenes* and *S. enterica* was determined. Raw oats were inoculated with a mixture of five strains of *L. monocytogenes* (7.06 ± 0.18 Log CFU mL⁻¹) and *S. enterica* (7.14 ± 0.05 Log CFU mL⁻¹) and stored at 25 °C for 165 days. The inoculated oats were soaked for 12 h at 25 °C, and the population of *L. monocytogenes* and *S. enterica* was quantified every 4 h. Subsequently, using oats inoculated with and without soaking, drinks (hot and cold) were prepared using a machine for home use. Finally, the prepared beverages were stored for 7 days at 5 °C. Pathogen populations were quantified after making the oatmeal drink and during storage. In raw oats, the BMA content was 1.48 ± 0.18 Log CFU g⁻¹, the remaining microbial indicators were below the detection limit (<10 CFU g⁻¹) and only *Salmonella* was detected (10%). During storage of the inoculated oats, both pathogens slowly decreased and after 165 days of storage *L. monocytogenes* (1.83 Log CFU g⁻¹) and *S. enterica* (1.27 Log CFU g⁻¹) were still present, showing death rates of 0.00097 and 0.00091 Log CFU h⁻¹, respectively. On the other hand, during soaking both pathogens developed until reaching populations of approximately 7 Log CFU g⁻¹; *S. enterica* developed faster (0.247 Log CFU h⁻¹) than *L. monocytogenes* (0.193 Log CFU h⁻¹). The preparation of hot drinks using oats without soaking reduced 4.15 and 3.67 Log CFU g⁻¹ of *L. monocytogenes* and *S. enterica*, respectively; while, in drinks prepared with soaked oats, regardless of the microorganism, the reductions were higher (average 6.78 Log CFU g⁻¹). The preparation of cold drinks did not reduce the population of the pathogens. During the refrigerated storage of the beverages, *L. monocytogenes* and *S. enterica* remained stable, with the exception of cold oat beverages without soaking inoculated with *L. monocytogenes*, where population increased 3.54 Log CFU g⁻¹. During the preparation of oatmeal drinks, the development of pathogenic microorganisms can be promoted if contaminated raw material is used. The heat treatment applied during the preparation of beverages at home level and their storage in refrigeration achieves the control of the populations of pathogenic microorganisms.

Key Words: Vegetable drink, oatmeal, soaking, home preparation

INDICE

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTO	4
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INDICE	3
INDICE DE FIGURAS	6
INDICE DE TABLAS	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. ANTECEDENTES	10
2.1. Bebidas sustitutas de leche.....	10
2.2. Bebidas de avena sustitutas de leche.....	10
2.2.1. Avena.....	10
2.2.2. Bebida de avena.....	12
2.2.3. Producción industrial.....	12
2.2.4. Producción de autoconsumo.....	13
2.3. Riesgos asociados al consumo de bebidas sustitutas de leche.....	13
2.3.1. Brotes asociados al consumo de cereales.....	13
2.4. Principales patógenos relevantes a bebidas sustitutas de leche.....	14
2.4.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	14
2.4.2. <i>Salmonella enterica</i>	16
2.5. Planteamiento del problema.....	18
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo general.....	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
4. MATERIALES	21

4.1.	Soluciones y reactivos.....	21
4.2.	Medios de cultivo.....	21
4.3.	Equipos.....	22
5.	METODOLOGÍA.....	23
5.1.	Avena.....	23
5.2.	Caracterización microbiológica de la avena.....	23
5.2.1.	Preparación de las muestras.....	23
5.2.2.	Bacterias mesofílicas aerobias.....	24
5.2.3.	Coliformes totales, coliformes fecales y <i>Escherichia coli</i>	24
5.2.4.	Cuantificación de hongos y levaduras.....	24
5.2.5.	Detección de <i>Salmonella</i> spp.....	24
5.2.6.	Detección de <i>L. monocytogenes</i>	25
5.3.	Comportamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella enterica</i> en avena	26
5.3.1.	Cepas.....	26
5.3.2.	Preparación del inóculo.....	27
5.3.3.	Inoculación y almacenamiento de las muestras.....	27
5.3.4.	Cuantificación de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i>	27
5.4.	Evaluación de la capacidad de desarrollo <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i> durante la etapa de remojo de avena.....	28
5.4.1.	Inoculación.....	28
5.4.2.	Hidratación de avena.....	28
5.4.3.	Cuantificación de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i>	28
5.5.	Evaluación del comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i> durante la preparación de bebidas de avena en un equipo comercial de uso casero.....	28
5.5.1.	Elaboración de bebidas de avena.....	28
5.5.2.	Almacenamiento de las bebidas.....	30
5.6.	Análisis estadístico.....	30
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32

6.1. Microorganismos indicadores y patógenos en avena.....	32
6.2 Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i> en avena.....	34
6.2.1 Estudios preliminares.....	34
6.2.2 Supervivencia de los patógenos en avena almacenada a 25 °C.....	36
6.3 Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i> durante la etapa de remojo de avena.....	39
6.4 Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i> durante la preparación de bebidas de avena usando un equipo casero comercial.....	41
6.5 Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i> durante el almacenamiento en refrigeración de bebidas de avena.....	43
7. CONCLUSIONES.....	45
8. BIBLIOGRAFÍA.....	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de elaboración de bebida de avena para autoconsumo.....	13
Figura 2. Equipo SoyaBella ® utilizado para la preparación de bebidas de avena.	29
Figura 3. Diagrama de flujo de la elaboración de bebidas de avena con el equipo SoyaBella ®.....	30
Figura 4. Sobrevivencia de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i> en avena almacenada a 25 °C por 165 días. Los valores representan la media ± desviación estándar de 9 datos.	38
Figura 5. Desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i> durante el remojo de avena a 25 °C.....	40
Figura 6. Reducción de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i> durante la elaboración de bebidas de avena.....	43

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de avena tostada y bebida de avena (FDC, 2019).....	11
Tabla 2. Contenido de microorganismos indicadores en avena.....	33
Tabla 3. Contenido de microorganismos patógenos en avena.....	33
Tabla 4. Cambios en la Aa de avena durante el secado en campana de flujo laminar a 25 °C.....	35
Tabla 5. Inactivación de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i> durante el secado de avena.	36
Tabla 6. Inactivación de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i> durante el almacenamiento de avena a 25 °C.....	38
Tabla 7. Velocidad de desarrollo e incremento en la población de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i> durante el remojo de avena a 25 °C.....	39
Tabla 8. Temperaturas alcanzadas por el equipo Soyabella ® durante el ciclo de calentamiento.....	41
Tabla 9. Contenido de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i> en diferentes etapas de la preparación de bebidas de avena.....	42
Tabla 10. Población de patógenos de bebidas de avena refrigerada.....	44

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años han ocurrido cambios en los hábitos alimenticios de la población entre los que se incluye la disminución o eliminación del consumo de productos lácteos. Las denominadas bebidas vegetales, bebidas sustitutas de leche o mal denominadas leches vegetales se han vuelto una buena alternativa de consumo principalmente para poblaciones vegetarianas, veganas (García-Saavedra, 2017), intolerantes a la lactosa (Szilagyi & Ishayek, 2018), y en algunos casos para celíacos (Remes-Troche *et al.*, 2018). Estas bebidas pueden estar preparadas con semillas, frutos secos, cereales y leguminosas (Elsabie & Aboel, 2016), siendo las bebidas de arroz, soya, almendra, coco y avena las más comercializadas en México (PROFECO, 2019).

La avena es un cereal rico en fibra, además de ser de los cereales que más proteínas aporta en una dieta balanceada (FDC, 2019; FDC, 2020). Así mismo, se ha demostrado que la avena controla el apetito (Welland, 2020), reduce el colesterol (Karmally *et al.*, 2005), el riesgo de diabetes y cardiopatías (Meydani, 2009). Este mismo producto es utilizado para la manufactura de aceites, harinas, productos de repostería como, galletas, panqueques y panes. Es también utilizado como ingrediente principal para elaborar bebidas sustitutas de leche (FDC^A, 2019).

Debido a la mercadotecnia las bebidas sustitutas de leche, se han logrado comercializar como más saludables y ecológicas (PROFECO, 2020); no obstante, las presentaciones comerciales no proporcionan los mismos nutrientes que aporta la leche, son más costosas y suelen ser altamente procesadas (PROFECO, 2019; Wolf & Mackinson, 2020).

Si bien algunos comensales optan por consumir estas bebidas como una alternativa al consumo de leche de vaca, además de poder satisfacer los nutrientes y variar la dieta, algunos otros elaboran sus propias bebidas para hacerlos “más naturales”, y como una forma de disminuir la producción de basura al no utilizar los envases desechables que utilizan las bebidas comerciales; lo que ha promovido el auge de su producción artesanal en hogares, comercios, restaurantes u organizaciones civiles (Miñana, Villares & Serra, 2015; de Campagnaro, 2017).

En México y en el resto del mundo, el método más común para elaborar las bebidas de avena sustitutas de leche consiste en sumergir la avena en agua durante un tiempo, que puede variar entre 2 y 18 h o, hasta que los ingredientes adquieran una consistencia blanda. Posteriormente se muelen o licuan, para luego colar en malla fina o tela; finalmente se adicionan endulzantes o aceites vegetales de acuerdo al gusto del consumidor (de Campagnaro, 2017).

Durante la producción casera o de baja escala se puede incurrir en prácticas que propicien riesgos al consumidor. Se sabe que algunos patógenos como *Salmonella* son capaces de sobrevivir por largos periodos en alimentos con baja actividad de agua (Aa) como lo es la avena, e inclusive se ha documentado que este microorganismo puede desarrollar tolerancia al calentamiento (Podolack *et al.*, 2010; Rachon, Peñaloza & Gibbs, 2016; Chen *et al.*, 2019). Por otro lado, existen patógenos que, al encontrarse de forma natural en el ambiente, como es el caso de *Listeria monocytogenes*, podrían contaminar las bebidas en cualquier etapa de la elaboración, y si las condiciones son adecuadas inclusive llegar a desarrollar incrementando la probabilidad de causar severos daños o incluso la muerte al consumidor (Carstens, Salazar & Darkoh, 2019).

Hasta ahora no existen reportes que involucren el consumo de bebidas sustitutas de leche como causantes de enfermedad. Sin embargo, la materia prima que se emplea en la elaboración de estos productos ha sido vehículo en brotes de *Salmonella* spp. (CDC, 1998; CDC, 2004; Isaacs *et al.*, 2005; Luna *et al.*, 2018; CDC^A, 2018; CDC^B, 2018). Por otro lado, en la actualidad se comercializan equipos no industriales para la elaboración y pasteurización de bebidas sustitutas de leche, siendo esta una buena medida para garantizar la inocuidad de las bebidas (Peng *et al.*, 2015).

En este trabajo se evaluó el comportamiento de *S. enterica* y *L. monocytogenes* en diferentes etapas de la elaboración de bebidas de avena simulando un proceso casero o a baja escala.

2. ANTECEDENTES

2.1. Bebidas sustitutas de leche.

Los cambios en la conducta del consumo de productos por razones sociales, culturales, o problemas fisiológicos han permitido que las bebidas sustitutas de leche sean una alternativa de consumo para vegetarianos y/o veganos (García-Saavedra, 2017), incluso son una buena alternativa para los individuos intolerantes a la lactosa presente en la leche (PROFECO, 2019).

Las bebidas sustitutas de leche o mal denominadas leches vegetales, son bebidas preparadas con uno o más ingredientes de origen vegetal (PROFECO, 2019). Según lo publicado por Sethi, Tyagi & Anurang (2016), las bebidas vegetales pueden estar elaboradas con cereales (avena, arroz, maíz o trigo espelta), leguminosas (soya, cacahuete, lupin/lupino o judía), frutos secos (almendra, coco, pistache), semillas (nuez o avellana, semillas de girasol, sésamo, cáñamo o coyolito), o pseudo-cereales (amaranto, quínoa o linaza), por lo que el contenido de grasas, proteínas y carbohidratos de estas bebidas varía según el ingrediente utilizado (Elsabie & Aboel, 2016).

La Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO) reportó que en México se comercializan 22 presentaciones de bebidas vegetales: seis de almendras, seis de coco, cinco de soya, una de almendra-coco, dos de arroz y dos de avena (PROFECO, 2020). Sanchez-Fermín (2019), publicó que en el año 2018 empresas internacionales como Coca-Cola, Nestlé, Danone y Grupo Cuadritos elaboraron 117.2 millones de litros de bebidas sustitutas de leche, incrementando las ganancias un 33.5% del 2013 al 2018. El nivel de ventas incrementó de aproximadamente 2,900 millones en 2013 a 3,900 millones de dólares en 2018.

2.2. Bebidas de avena sustitutas de leche

2.2.1. Avena

La avena es un fruto cariósido, largo puntiagudo y con gumillas adheridas, obtenido principalmente de *Avena sativa* (Plants database, 2021). El principal componente de este fruto es el almidón (70%), además es un producto rico en fibra (10%) y proteínas (10%), y es una fuente de minerales como sodio, fósforo, potasio y calcio, vitamina A y B6 (Tabla 1) (Food Data Central [FDC], 2019; FDC, 2020). Se ha demostrado que además de controlar el apetito (Welland, 2020), puede reducir el colesterol (Karmally *et al.*, 2005), el riesgo de enfermedades cardíacas y diabetes (Maydani, 2009). Debido a que este cereal no contiene gluten de forma natural, es una buena alternativa para comensales celíacos; sin embargo, este cereal suele ser procesado de forma conjunta en plantas procesadoras de trigo, centeno o cebada, por lo que se recomienda el consumo de avenas con la leyenda “libre de gluten” (Gluten Free Living, 2021).

Tabla 1. Composición de avena tostada y bebida de avena (FDC, 2019).

Nutriente	Avena tostada	Bebida de avena
	Valor por 100 g de muestra	Valor por 100 mL de muestra
Agua	3.68 g	----
Energía	395 Kcal	42 Kcal
Proteínas	10.71 g	1.67 g
Lípidos totales	5.36 g	0.62 g
Carbohidratos	10.7 g	7.5 g
Fibra dietaria	10.7 g	0.8 g
Azúcares totales	3.57 g	2.08 g

México es el 29° productor de avena a nivel mundial con alrededor 90 mil toneladas al año, siendo Chihuahua el estado que produce el 57.4% de la avena a nivel nacional, generando ingresos de más de 279 millones de pesos al año. Se estima que el consumo de avena *per capita* es de 2.4 kg/año [Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), 2020].

Cabe destacar que la avena es comúnmente consumida como cereal, sin embargo, esta también puede ser utilizada para la producción de harinas, productos de repostería como, galletas, panqueques, panes, entre otros, y como ingrediente para la elaboración de bebidas sustitutas de leche (FDC, 2019).

2.2.2. Bebida de avena

Debido a que las bebidas sustitutas de leche se han comercializado como “más saludables y ecológicas” estas han empezado a ganar más terreno en el mercado (PROFECO, 2020); no obstante, las presentaciones comerciales no proporcionan los mismos nutrientes que aporta la leche, además de ser más costosas (Tabla 1). De hecho, el litro de bebida de avena que se comercializa en México cuesta en promedio 48 pesos y son preparadas con hasta 50 g de avena (PROFECO, 2019).

Como se mencionó anteriormente, la producción casera o a baja escala de las bebidas a base de avena está tomando auge en hogares, comercios, restaurantes u organizaciones civiles (Piña Palmera, 2020). Las familias optan por consumir estas bebidas como una alternativa al consumo de leche de vaca, además de poder satisfacer los nutrientes y variar la dieta. Por otro lado, algunos comensales elaboran sus propias bebidas como una forma de disminuir la producción de basura al no utilizar los envases desechables en los que se ofrecen las bebidas comerciales (Miñana, Villares & Serra, 2015; de Campagnaro, 2017). Por otro lado, estos productos suelen ser altamente procesados (Wolf & Mackinson, 2020), lo que ha llevado al consumidor a optar por elaborar sus propias bebidas para autoconsumo, con la intención de hacerlos “más naturales”.

2.2.3. Producción industrial

Si bien es cierto que el principal ingrediente para la elaboración de estas bebidas es la avena, los avances tecnológicos permiten que las industrias utilicen harinas a base de avena, lo que les permite tener un mejor control en la incorporación de aditivos, como azúcares, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales (Elsabie & Aboel, 2016). Deswal, Deora & Mishra (2014) proponen que para elaborar las bebidas de avena se adicione α -amilasa, se deje remojar una parte de avena con 2.7 agua hasta obtener una papilla, y

posteriormente someterla a una hidrólisis enzimática con 77.78 mg de α -amilasa por cada kilogramo de avena, esto con la intención de evitar la gelatinización causada por los almidones de la avena, ya que se ha observado que el calentamiento durante la ultrapasteurización puede afectar negativamente a la gelatinización natural de la avena obteniendo una bebida espesa (Sethi *et al.*, 2016). Por otro lado, la presencia de gluten debido a la adición de harinas de trigo para darle elasticidad y masticabilidad a las harinas de avena pueden implicar un riesgo a consumidores celíacos (Phongthai, 2017).

2.2.4. Producción de autoconsumo

Para elaborar las bebidas de avena se siguen procedimientos muy semejantes a la elaboración de otras bebidas sustitutas de leche (Figura 1). Primeramente, se deja remojar la avena, este proceso puede tener variaciones en el que tiempo de remojo; se enjuagan y se prosigue al proceso de molienda, en el que se busca obtener un concentrado de avena, posteriormente se mezcla con agua y se adicionan endulzantes o saborizantes según el gusto del consumidor. El homogenizado se puede pasteurizar y/o filtrar (Secchi & Vitello, 2016). Por otro lado, hoy en día existen equipos comerciales para uso personal que permiten calentar, moler y filtrar la avena (o cualquier otro ingrediente) para la elaboración de una bebida sustituta de leche (Suárez-Guzmán, 2013; de Campagnaro, 2017).



Figura 1. Proceso de elaboración de bebida de avena para autoconsumo.

2.3. Riesgos asociados al consumo de bebidas sustitutas de leche

Debido a la composición química de las bebidas y la elevada actividad de agua es posible que los microorganismos patógenos al humano puedan tener posibilidad de desarrollo en la bebida de avena. Los patógenos que pueden ser vehiculizados por las bebidas sustitutas de leches pueden ser muy variados, tanto de origen ambiental, como provenientes del intestino de humanos y animales.

2.3.1. Brotes asociados al consumo de cereales

A la fecha no se tienen reportes de brotes asociados al consumo de bebidas sustitutas de leche; sin embargo, las materias primas empleadas en su elaboración (semillas, frutos secos, cereales y leguminosas) han sido causantes de diversos brotes, a pesar de que la mayoría de estos son alimentos de baja Aa (actividad de agua).

En 2014 la Unión Europea se reportaron 91 casos de listeriosis y dos de estos fueron causados por la ingesta de alimentos de baja Aa. En el 2015 se reportaron 99 casos de listeriosis, de los cuales 3 fueron ocasionados por productos con baja Aa (Rachon, Peñaloza & Gibbs, 2016).

Por otro lado, desde 1994 se ha alertado la presencia de *Salmonella* spp. en cereal en los países bajos (RASFF, 1994). No obstante, el primer brote asociado al consumo de avena tostada, fue reportado en el periodo de abril a junio de 1998 en EE.UU., este brote tuvo como resultado 209 infectados con *S. enterica* serovar Agona y 47 pacientes hospitalizados, desde entonces el Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ha reportado hasta el 2018, 411 casos de *Salmonella* asociados al consumo de avena, siendo en el 2013 el año que más casos se reportaron (76 casos). En el 2018 ocurrió un brote de *Salmonella* causado por consumo de una marca reconocida de cereal de trigo inflado; dicho producto generó la infección de 135 personas, de las cuales 35 fueron hospitalizadas, y el agente causal fue *S. enterica* serovar MBandaka (CDC^A, 2018).

2.4. Principales patógenos relevantes a bebidas sustitutas de leche

2.4.1. *Listeria monocytogenes*

Patógeno intracelular facultativo, difundido en el ambiente, es un bacilo Gram positivo, no esporulado, microaerófilo, anaerobio facultativo. Su desarrollo óptimo ocurre entre 30 y 37 °C, a pH de 7 a 7.5, con Aa de >0.88 en concentraciones de NaCl <10%. *L. monocytogenes* es una bacteria psicrótrofa y por lo tanto puede desarrollar a temperaturas de hasta 0°C. En algunos reportes se menciona que *L. monocytogenes* puede desarrollar en un rango amplio de temperatura (0 a 45 °C) y de pH (4.39 a 9.50). Adicionalmente este microorganismo tiene la capacidad de formar biopelículas que le

permiten resistir cambios en el ambiente [Carstens, Salazar & Darkoh, 2019; U.S. Department of Agriculture (USDA), 2012].

2.4.1.1. Taxonomía

Listeria pertenece a la familia *Listeriaceae*, de la clase *Bacilli*, en filo *Firmicutes*, del dominio *Bacteria*. En el género *Listeria* tradicionalmente se consideran 6 especies (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*) sin embargo el avance tecnológico ha permitido identificar a 17 especies diferentes (National Center for Biotechnology Information [NCBI], 2020), de las cuales solo *L. monocytogenes* se considera patógena para el hombre, y a su vez esta puede clasificarse en 13 serotipos en base al antígeno O. El serotipo 4b es el más relevante como causa de listeriosis en humanos (Lamas *et al.*, 2018).

2.4.1.2. Importancia clínica

L. monocytogenes es transmitida por alimentos y su importancia radica en los cuadros clínicos severos que puede ocasionar (septicemia, gastroenteritis, meningitis y encefalitis), principalmente en pacientes de alto riesgo como neonatos, mujeres embarazadas, adultos mayores, e inmunocomprometidos (Vera *et al.*, 2013). La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2018) estima una tasa de mortalidad del 20 al 30 % de los infectados.

L. monocytogenes utiliza adhesinas presentes en membrana (amidasa autocatalítica [Ami], FbpA), para adherirse a las células del epitelio intestinal, y liberar ininterleusinas (InIA y InIB) para provocar cambios en el citoesqueleto de la célula hospedera, que le permitirán entrar al citoplasma, donde se desarrollará y podrá infectar otras células como los macrófagos, lo que le permitirá invadir invadir el hígado, el bazo y/o atravesar la barrera hematoencefálica, causando meningitis y septicemias severas en el sujeto (Vera *et al.*, 2013).

2.4.1.3. Supervivencia en alimentos de baja actividad de agua

L. monocytogenes a diferencia de otros microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos, no son muy recurrentes los estudios que demuestran los mecanismos empleados por este patógeno para resistir a la desecación.

No obstante, una de las primeras respuestas al estrés osmótico de parte de *L. monocytogenes*, es la disminución de la permeabilidad de K⁺ intracelular. Hingston *et al.* (2015) surgieron que la inactivación de genes de membrana que afecten la histidina quinasa o la YycFG, puede incrementar la tolerancia a la desecación, el calentamiento y el estrés por sales, los autores surgieron que esto se debe a la reducción de la osmolaridad al haber una menor interacción con sales extracelulares como el NaCl.

A largo plazo, el K⁺ es reemplazado por componentes orgánicos como: la carnitina, betain glicina, prolina y trehalosa, (Kragh & Truelstrup, 2020) esta última es de las principales moléculas que le permiten sobrevivir a la desecación, y será metabolizada a fosfotetralosa cuando se active el gen *treA* (lmo1254) y la prolina sintetizada por la ProBA en condiciones de estrés osmótico. Así la trehalosa metabolizada mantendrá estable la membrana celular y evitarán la desnaturalización de proteínas (Burguess *et al.*, 2016).

2.4.2. *Salmonella enterica*

Salmonella es un bacilo Gram negativo, con flagelos peritricos, no esporulado, anaerobio facultativo, productor de H₂S, con desarrollo óptimo a temperaturas de 35 a 37 °C, pH de 7 y Aa de 0.92 a 0.98 Algunos serotipos pueden desarrollar a temperaturas que van de 5 a 47 °C y a pH de 3.8 a 9.4 (Carstens, Salazar & Darkoh, 2019; USDA, 2012).

2.4.2.1. Taxonomía

Salmonella pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, del orden *Enterobacteriales*, clase *Gammaproteobacteria*, filo *Proteobacteria* del dominio *Bacteria*. *Salmonella* posee dos especies *S. bongori* y *S. enterica*. *Salmonella* a su vez es clasificada en 6 subespecies, cada una asignada con un número romano: *enterica* (I), *salamae* (II),

arizonae (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV), *bongori* (V), e *indica* (VI). La subespecie *enterica* está compuesta de 2531 serotipos, siendo *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* los serovares más comúnmente encontrados en los alimentos (Lamas *et al.*, 2018; NCBI, 2020).

2.4.2.2. Importancia clínica

Salmonella es uno de los patógenos más comunes de enfermedades transmitidas por los alimentos, principalmente los huevos, la carne de ave y otros productos de origen animal (Carzon, 2009), además de estar relacionado en brotes causados por alimentos de baja Aa. Este microorganismo es capaz de causar fiebre, diarrea, náuseas, vómito, y en algunas ocasiones septicemias o la muerte. La OMS informa que el 30% de las muertes por enfermedades transmitidas por alimentos, en niños menores a 5 años son causados por *Salmonella* (Lawe-Davies, 2021)

La infección de *Salmonella* comienza con la ingesta de este en el alimento contaminado, hasta adherirse apicalmente a las células epiteliales del íleon y células M, que por la estructura de estas células, puede atravesar fácilmente entre ellas, o liberar sustancias efectoras (SopE) generando microarreglos ondulares (*ruffling*) en el citoesqueleto de células epiteliales para que estas puedan fagocitar a la bacteria. Una vez fagocitada, *Salmonella* realizará cambios en el ambiente intracelular de la célula hospedera permitiéndole el desarrollo de la bacteria, lo que a su vez le permitirá activar citosinas inflamatorias (GL8, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α , GCP-2, GRO- α), que además de ser causante de lisis e inflamación pueden activar una serie de mecanismos que podrán realizar cambios en los gradientes de concentración de Ca^{+2} , ocasionando la diarrea (Mesarati, 2017; Ochoa & Rodríguez, 2005).

2.4.2.3. Sobrevivencia en alimentos de baja actividad de agua

Cuando hay poca cantidad de agua disponible en los alimentos, los microorganismos patógenos no se pueden desarrollar. Diversos estudios llevados a cabo con *Salmonella* han demostrado que el patógeno puede sobrevivir por largos periodos en alimentos de baja Aa. Podolak *et al.* (2010) demostraron que en almendras *Salmonella* puede mantener hasta un logaritmo de células estables cuando esta es almacenada a 22°C en

un ambiente de Aa 0.2 durante un periodo de 248 días (>8 meses) a 1351 días (3.5 años).

Los cambios de Aa en los alimentos pueden generar estrés en los microorganismos debido a la elevada presión osmótica. *S. enterica* posee diversos mecanismos que le permite adaptarse rápidamente a las variaciones osmóticas del medio. Durante la deshidratación del alimento, *S. enterica* busca reducir la pérdida de agua intracelular, para ello comienza con la acumulación de K⁺ en el espacio intracelular, posteriormente reemplaza el K⁺ por componentes orgánicos como prolina, glicina betaina y tetralosa; la tetralosa permite mantener estable la membrana celular y evita la desnaturalización de proteínas (Spector & Kenyon, 2012).

Diversos estudios con *Salmonella* han demostrado que la bacteria puede adquirir resistencia cruzada a las altas temperaturas, incrementando su resistencia térmica. Esta resistencia cruzada puede deberse a que los mecanismos empleados para resistir la baja Aa son muy semejantes a los utilizados para los choques de temperatura, luz UV y algunas sales (Gruzdev, Pinto & Sela, 2011; Finn *et al.*, 2013). Kottipalli (2019) sugirió que al estresar a *Salmonella* reduciendo el agua disponible, la bacteria puede resistir el calentamiento. Archer *et al.* (1998), comprobó que *Salmonella* en harina de trigo, es capaz de disminuir 1 Log UFC g⁻¹ de 40 a 47 minutos, al ser horneada entre 167 y 170.6 °C, siendo este un claro ejemplo de como al estresar por baja Aa a *Salmonella* esta puede adquirir una mayor resistencia al calentamiento.

Por otro lado, si la presión osmótica disminuye, o bien la célula se hidrata repentinamente, los canales mecanosensibles de *S. enterica* ubicados en la membrana interna de los Gram negativos (MscL, MscM y YggB), detectan cambios en la tensión superficial de la membrana y liberan los solutos compatibles para mantener el equilibrio osmótico de la membrana (Spector & Kenyon, 2012).

2.5. Planteamiento del problema

En los últimos años han ocurrido cambios alimenticios en la población entre los que se incluye la disminución o eliminación del consumo de productos lácteos. Algunos consumidores han optado por la elaboración de sus propias bebidas sustitutas de leche

de origen vegetal con el propósito de satisfacer la demanda de nutrientes en una dieta balanceada, y reducir el impacto ecológico que conlleva el consumo de bebidas comerciales. Se desconocen los riesgos microbianos que pueden presentarse durante la preparación de bebidas sustitutas de leche, aunque se sabe que algunos microorganismos patógenos pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo en ingredientes como la avena, utilizados para la elaboración de estas bebidas. Por otro lado, es posible que durante la etapa del remojo de los ingredientes contaminados con patógenos se propicie el incremento de su población, elevando el riesgo al consumidor.

Por tal motivo, en este trabajo se evaluó el comportamiento *L. monocytogenes* y *S. enterica* en las diferentes etapas de la preparación a nivel casero de bebidas sustitutas de leche.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el comportamiento de *L. monocytogenes* y *S. enterica* en diferentes etapas de la elaboración de bebidas de avena a nivel casero.

3.2 Objetivos específicos

- a) Determinar el comportamiento de *L. monocytogenes* y *S. enterica* y en avena durante el almacenamiento a 25 °C.
- b) Evaluar la capacidad de desarrollo de *L. monocytogenes* y *S. enterica* durante la etapa de remojo de avena a 25 °C.
- c) Evaluar la sobrevivencia de *L. monocytogenes* y *S. enterica* durante la preparación de la bebida de avena al aplicar un tratamiento térmico y no térmico, empleando un equipo comercial.
- d) Determinar el comportamiento de *L. monocytogenes* y *S. enterica* durante el almacenamiento en refrigeración de bebidas de avena.

4. MATERIALES

4.1. Soluciones y reactivos

Ácido tartárico 10 %, Sigma-Aldrich

Agua electrolizada neutra (agua pura), Sigma-Aldrich

SYBR Safe al 0.1 %, Thermo Fisher

Azul de metileno, MEYER

Extracto de levadura, DIBICO

Glicerol al 15 %, MEYER

Hipoclorito de sodio, Sigma-Aldrich

Manitol, DIBICO

Ramnosa, DIBICO

Reactivo de Kovac, MEYER

Rifampicina, Sanofi Aventis

GoTaq® DNA Polymerase, PROMEGA

Xilosa, DIBICO

4.2. Medios de cultivo

Agar cuenta estándar (ACE), DIBICO

Agar hierro triple azúcar (TSI), DIBICO

Agar lisina hierro (LIA), DIBICO

Agar Oxford modificado (MOX), DIBICO

Agar papa dextrosa (APD), DIBICO

Agar soya tripticaceína (AST), DIBICO

Agar sulfito bismuto (ASB), DIBICO
Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), DIBICO
Agarosa, BIOLINE
Caldo lactosa bilis verde brillante (CLBVB), DIBICO
Caldo lactosado (CL), DIBICO
Caldo lauril sulfato con MUG (CLS-MUG), DIBICO
Caldo *Rappaport-Vassiliadis* (RP), DIBICO
Caldo soya tripticaceína (CST), DIBICO
Caldo tetrionato (TT), DIBICO
Caldo urea, DIBICO
Peptona de caseína (AP), DIBICO

4.3. Equipos

Agitador mecánico, Vortex Fisher Scientific
Autoclave eléctrica de mesa, All american
Balanza analítica, Asworth 100
Baño María con termostato, RIOSSA
Campana de flujo laminar, Alder
Centrifuga de mesa, Sol-Bat 1300
Cuenta colonias, Quebec
Equipo de electroforesis, BIO-RAD
Fotodocumentador de luz UV, Kodak DC290
Homogeneizador mecánico, Stomacher, Seward, London, England

Incubadoras (35, 25 y 22°C), Thermo Scientific

Máquina automática de leche de soja y molinillo de café, SoyaBella, Tribest.

Medidor de actividad de agua, AquaLab, CX-2

Micropipetas de 5-1000 µL, Labsystems

Ollas de presión Presto, Steele

Potenciómetro, Orion 410^a

Refrigerador, IEM

Stomacher, Lab-Blender

Termobloque, Eppendorf

Termociclador, Techne TC-512

5. METODOLOGÍA

5.1. Avena

Se adquirieron dos lotes de avena (19 kg cada uno) de un solo proveedor ubicado en el mercado Josefa Ortiz de Domínguez “La Cruz” de la ciudad de Santiago de Querétaro, Qro.

5.2. Caracterización microbiológica de la avena

Se realizó la caracterización microbiológica de la avena en el Laboratorio para la Evaluación y Control de Riesgos Microbianos en Alimentos (LECRIMA).

5.2.1. Preparación de las muestras

Se pesaron 5 porciones de 25 g de avena por cada lote y se les adicionó 225 mL de diluyente de peptona. Se mezclaron en un homogeneizador mecánico por un minuto y se prepararon las diluciones decimales correspondientes en tubos con diluyente de peptona. Estas suspensiones se emplearon para la cuantificación de los microorganismos indicadores.

5.2.2. Bacterias mesofílicas aerobias

La cuantificación de las bacterias mesófilas aerobias (BMA) se realizó mediante la técnica de vaciado en placa, utilizando agar cuenta estándar de acuerdo con la metodología descrita en el Bacteriological Analytical Manual (Maturin & Peeler, 2001).

5.2.3. Coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli*.

La cuantificación de coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF) y *E. coli* se llevó a cabo mediante la técnica de número más probable (NMP) descrita en el Bacteriological Analytical Manual (Feng *et al.*, 2002).

Las muestras de avena se analizaron empleando una batería de 3 tubos con caldo lactosado, que fueron incubados a 35 ± 2 °C hasta 48 h. Se consideró un tubo positivo a CT si se observó formación de gas y turbidez durante el periodo de incubación. De los tubos presuntivos se tomaron dos alícuotas de 100 μ L, de los cuales se inocularon en 3 mL de CLBVB y 3 mL de CLS-MUG, se incubaron hasta 48 h, a 35 ± 2 °C y 44.5 °C, respectivamente. Se consideró presuntivo a CF si ocurrió formación de gas y turbidez en los tubos con CLBVB. Se consideró positivo a *E. coli* si había presencia de gas y fluorescencia con luz UV a 365 nm en CLS-MUG.

Para la confirmación de *E. coli*, los tubos positivos se inocularon en placas con agar EC, y se incubaron a 35 ± 2 °C por 24 ± 2 h. Se consideraron colonias típicas aquellas con un centro negro y un brillo mecánico.

5.2.4. Cuantificación de hongos y levaduras

La cuantificación de hongos y levaduras se llevó a cabo mediante la técnica de vaciado en placa utilizando agar papa dextrosa acidificado con ácido tartárico a pH de 3.5. Las cajas Petri placas se incubaron de 3 a 5 días a 25 ± 2 °C (Tournas *et al.*, 2002).

5.2.5. Detección de *Salmonella* spp.

La detección de *Salmonella* spp. se realizó mediante el método del BAM capítulo 5 (Andrews, Jacobson, & Hammack, 2011). Brevemente, se pesaron 25 g de avena y se le adicionaron 225 mL de CL, se homogenizó e incubó por 24 ± 2 h a 35 ± 2 °C.

Terminado el tiempo de incubación se tomaron dos alícuotas de 1 mL y se colocaron en caldos para su enriquecimiento: una alícuota se colocó en caldo TT, se incubó a 43.5 °C por 24 ± 2 h; otra alícuota de 1 mL se pasó a caldo RPV y se incubó a 35 ± 2 °C por 24 ± 2 h.

Se procedió al aislamiento en agar XLD, SB y AVB. Las colonias sospechosas (colonias rosadas o negras con o sin centro negro en agar XLD, colonias marrones, grises o negras con brillo metálico en agar SB y colonias transparentes de color blanco o naranja y halo rojo en AVB) se confirmaron mediante pruebas bioquímicas (TSI, LIA y caldo urea) y PCR.

Se realizó la confirmación por PCR. Brevemente, a partir de cultivos frescos de las cepas presuntivas de *Salmonella* en CST, se realizaron dos lavados con solución salina isotónica estéril (SSI) y se extrajo el ADN por calentamiento en un termobloque a 95 °C por 15 min. La mezcla de reactivos del PCR consistió en 10 µL de Master Mix 2x GoTaq, 1 µL InvAf primer (CGCGCGTTGATGAGCTTTACC), 1 µL InvAr primer (CTCGTAATTCGCCGCCATTG), 1 µL de ADN y 7 µL de agua grado molecular para dar un volumen final de reacción de 20 µL. El programa de amplificación para *Salmonella* consistió en una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, alineamiento a 60°C durante 90 s, extensión a 72 °C durante 90 s y extensión final de 72 °C por 5 min. El producto de la amplificación se sometió a electroforesis en un gel de agarosa a 2 % a 75V / 15 min. Transcurrido el tiempo de electroforesis se observó el gel de agarosa en cámara de luz UV para analizar el tamaño del amplicón generado (402 pb), utilizando SYBR Safe al 0.1 % como marcador.

5.2.6. Detección de *L. monocytogenes*

La detección de *L. monocytogenes* se realizó mediante el método del BAM capítulo 11 (Hitchins *et al.*, 2004). Brevemente, se enriquecieron 25 g de muestra en 225 mL de caldo BLEB se homogenizó por 1 min y se incubó a 30 °C por 4 h (pre-enriquecimiento). Se prosiguió a adicionar al caldo BLEB 10 mg L⁻¹ de Acriflavina HCL, 40 mg L⁻¹ ácido nalidíxico y 50 mg L⁻¹ de Ciclohexamína. El caldo BLEB se incubó a 30 ± 2 °C por 24 h.

Después del tiempo de enriquecimiento, se tomó una asada del caldo y se aisló por estría cruzada en placas de agar Oxford modificado (MOX) y PALCAM se incubaron a 30 °C por 48 h. Las colonias típicas se aislaron en placas con AST, y se incubaron a 35 ± 2 °C por 24 ± 2 h. Se consideraron colonias típicas en agar Oxford aquellas colonias pequeñas (1 mm), grisáceas u oscuras rodeadas por un halo oscuro con posible brillo verdoso, con halos negros y centros hundidos.

Las colonias presuntivas se confirmaron mediante pruebas bioquímicas (ramosa, xilosa, manitol y SIM) y por PCR. Para llevar a cabo la PCR, la extracción de ADN se realizó a partir de cultivos frescos de las cepas presuntivas en CST. Se realizaron dos lavados con solución SSI y se calentó en un termobloque a 95°C por 15 min. La mezcla de reactivos del PCR consistió en 10 µL de Master Mix 2x GoTaq, 1 µL LM1 primer (CCTAAGACGCCAATCGAA), 1 µL LM2 primer (AAGCGCTTGCAACTGCTC), 1 µL LM3 primer (CTAACACTTAGCACTCATCG), 1 µL LNA 1 (CGGATCGTAAAGTACTGTTG) primer, 1 µL LNA 2 (CCTAACACTTAGCACTCATC) primer, 2 µL de ADN y 3 µL de agua grado molecular para dar un volumen final de reacción de 20 µL. El programa de amplificación para *L. monocytogenes* consistió en una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, alineamiento a 60 °C durante 90 s, extensión a 72 °C durante 90 s y extensión final de 72 °C por 5 min. El producto de esta PCR se sometió a electroforesis en un gel de agarosa a 2 % a 75 V / 15 min. Transcurrido el tiempo de electroforesis se observó en el gel de agarosa en fotodocumentador dos amplicones, uno para identificar *Listeria* spp (402 pb) y otro para *L. monocytogenes* (702 pb), utilizando SYBR Safe al 0.1% como marcador.

5.3. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* en avena

5.3.1. Cepas

Se utilizaron 5 cepas de *L. monocytogenes* (*L. monocytogenes* Scott A, *L. monocytogenes* LCDC, *L. monocytogenes* LV7, *L. monocytogenes* 19115 y *L. monocytogenes* 389) obtenidas del cepario del LECRIMA de la Universidad Autónoma de Querétaro, y 5 cepas de *S. enterica* provenientes de almendra (ATS34 y ARS3),

coco deshidratado (CTA12) y avena (aTS4 y aTX4). Todas las cepas fueron resistentes a rifampicina.

5.3.2. Preparación del inóculo

El inóculo se preparó a partir de las cepas de referencia almacenadas a -70°C en CST adicionado con 15% de glicerol, estas fueron activadas en 1 mL de CST y se incubó 24 h a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se realizó una segunda incubación inoculando 50 μL de CST inoculado a tubos con 10 mL de CST y se incubaron a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 h. Finalmente se realizaron dos lavados con diluyente de peptona, y las células lavadas se resuspendieron nuevamente en DP; se prepararon las diluciones decimales correspondientes para obtener 8 Log UFC/mL. A partir de esta dilución se mezclaron 9 mL de cada cepa de cada patógeno en botellas estériles con aspersores. La población en cada una de las mezclas se cuantificó mediante la técnica de extensión en superficie en placas de AST adicionado de rifampicina (100 ppm) (ASTR). Las placas se incubaron a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h.

5.3.3. Inoculación y almacenamiento de las muestras

Muestras de 500 g de avena, se colocaron dentro de una bolsa estéril y de manera independiente se realizó la inoculación de las suspensiones celulares de las mezclas de *L. monocytogenes* y *S. enterica*. A la avena contenida dentro de la bolsa se le aplicaron 8 aspersiones de la mezcla de patógenos (7.5 mL), y se prosiguió a mezclar desde el exterior de manera manual por 2 min, y posteriormente la avena se colocó sobre charolas de aluminio estériles. La avena se distribuyó uniformemente en una capa de 1.5 cm de espesor. Las muestras se dejaron secar en una campana de flujo laminar hasta que la avena recuperó la Aa inicial (120 min). La avena inoculada se colocó en bolsas estériles y se almacenó en una incubadora a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

5.3.4. Cuantificación de *L. monocytogenes* y *S. enterica*

Las poblaciones de los patógenos se cuantificaron antes y después de la inoculación, después del secado y a los 1, 21, 41, 70, 90, 110, 130, 150 y 165 días de almacenamiento. Para ello se tomaron 10 g de cada uno de los productos, se le

adicionaron 90 mL de DP y se homogenizaron mecánicamente por 1 min a velocidad media. Se prepararon las diluciones decimales correspondientes en DP y la cuantificación se realizó en ASTR mediante la técnica de extensión en superficie. Se incubaron a 36 ± 1 °C por 24 h.

5.4. Evaluación de la capacidad de desarrollo *L. monocytogenes* y *S. enterica* durante la etapa de remojo de avena.

5.4.1. Inoculación

Se aplicó la metodología descrita en el apartado 5.3.3 para la inoculación *L. monocytogenes* y *S. enterica* en muestras avena.

5.4.2. Hidratación de avena

De cada muestra de avena se tomaron porciones de 10 g, y se colocaron de manera individual en vasos desechables con 90 mL de agua purificada estéril, se agitaron y se dejaron remojar a 25 ± 2 °C durante 0, 4, 8, 10 y 12 h; en cada tiempo se decantó el agua y se pesaron nuevamente los ingredientes.

5.4.3. Cuantificación de *L. monocytogenes* y *S. enterica*

Se cuantificaron las poblaciones de los patógenos en cada tiempo de remojo. Para ello las muestras de avena remojada se diluyeron en proporciones 1:10 con DP, considerando el peso de la avena al final de cada tratamiento y se homogenizó mecánicamente por 1 min a velocidad media. Se prepararon las diluciones decimales correspondientes y la cuantificación se realizó en ASTR mediante la técnica de extensión en superficie. Se incubaron a 36 ± 1 °C por 24 h.

5.5. Evaluación del comportamiento de *L. monocytogenes* y *S. enterica* durante la preparación de bebidas de avena en un equipo comercial de uso casero.

5.5.1. Elaboración de bebidas de avena

Para preparar las bebidas vegetales se utilizó avena inoculada con *L. monocytogenes* y *S. enterica* como se indicó en el apartado 5.3.3. Se prepararon dos lotes de la avena

inoculada. Uno de los lotes se sometió a remojo y el otro se colocó directamente en el equipo casero SoyaBella (Figura 4).

Porciones de avena inoculada (40 g) se remojaron en 360 mL de agua purificada durante 12 h dentro de una incubadora a 25 ± 1 °C, se decantó el excedente de agua y se pesó nuevamente.

Se prepararon bebidas calientes y frías, al ser opciones disponibles en el equipo y que puede emplear el usuario (Figura 5). La avena hidratada o sin hidratar se colocó en la reja o malla del equipo SoyaBella®. Se llenó la cámara de acero inoxidable del equipo con 0.8 L de agua purificada, se prosiguió a acoplar la reja al motor del equipo (cabeza) y se colocó la cabeza en la cámara de acero. Una vez ensamblado el equipo se preparó la bebida de avena.

Para la elaboración de bebidas calientes se utilizó el ciclo “milk” el cual calienta a 90 °C por ~15 min, deja enfriar 10 min y muele la avena en 4 periodos de 20 s (bebida caliente). Para la elaboración de bebidas sin calentar se utilizó el ciclo “mill” cinco veces, el cual muele y filtra la avena en periodos de 20 s (bebida fría).

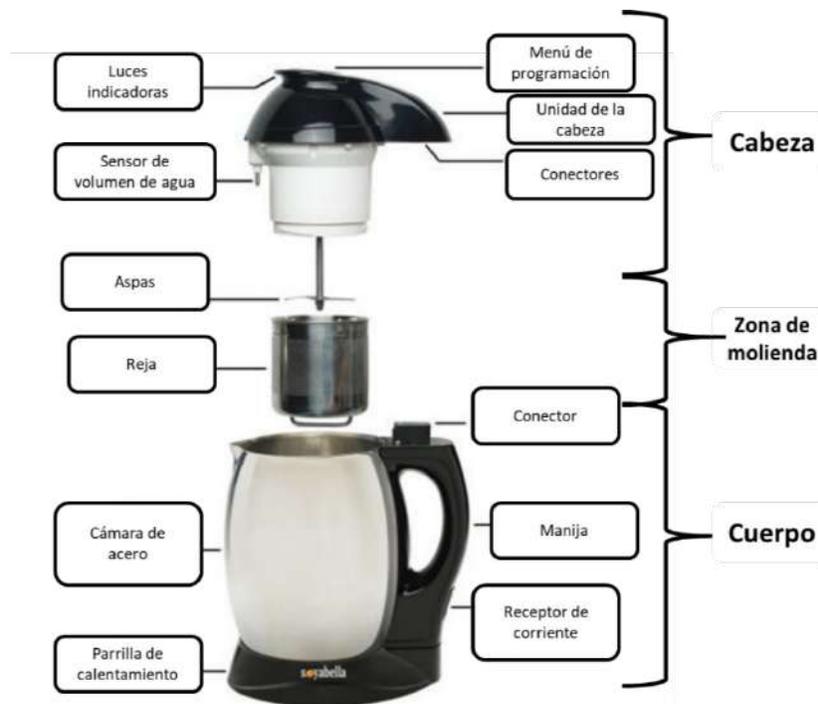


Figura 2. Equipo SoyaBella® utilizado para la preparación de bebidas de avena.

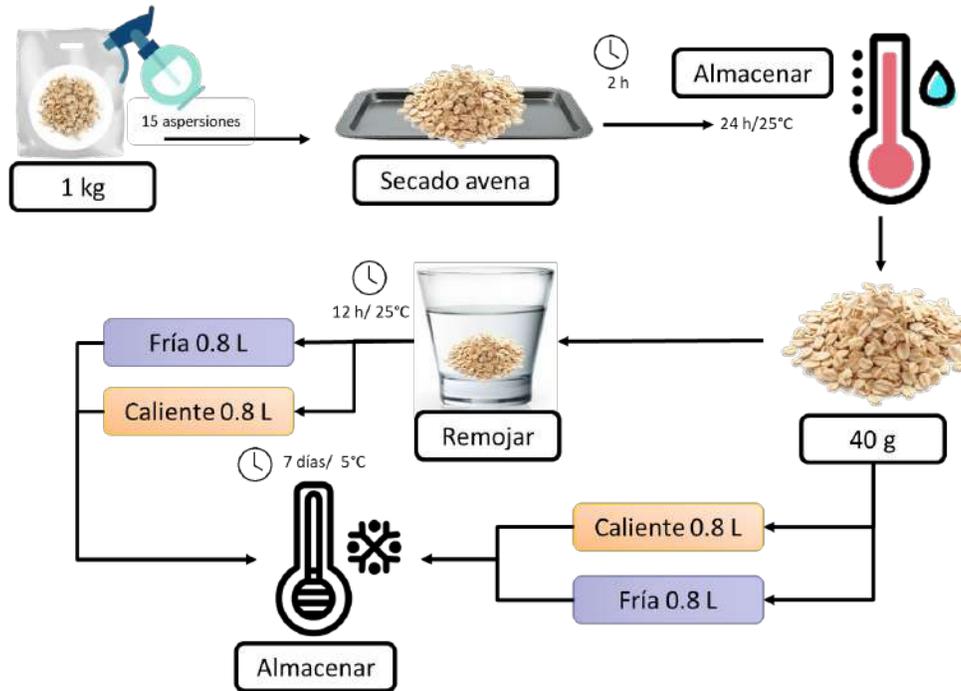


Figura 3. Diagrama de flujo de la elaboración de bebidas de avena con el equipo SoyaBella®

5.5.2. Almacenamiento de las bebidas

Muestras de 300 mL de ambos tipos de bebidas se almacenaron a 5 ± 1 °C. De cada bebida se tomaron alícuotas (10 mL) a los 0 y 7 días de almacenamiento. Se prepararon las diluciones decimales correspondientes y se cuantificó la población de *L. monocytogenes* y *S. enterica* en ASTR mediante la técnica de extensión en superficie; las placas se incubaron a 36 ± 1 °C por 24 h.

5.6. Análisis estadístico

Se realizaron tres repeticiones de cada experimento y en cada ocasión se analizaron tres muestras.

Los valores de UFC se transformaron a Log UFC g^{-1} . Se utilizó el programa DMFit Macros para Excel (www.combase.cc) para modelar las curvas de desarrollo y muerte y obtener las respectivas velocidades. Para evaluar el efecto de los factores de estudio se realizaron análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias mediante la prueba

de *Tukey*. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa R-4.0.0 (Ripley, 2001), y los gráficos se elaboraron con el programa Microsoft Office Excel 2016 ®.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Microorganismos indicadores y patógenos en avena

La avena utilizada en la preparación de las bebidas se analizó para conocer la calidad microbiológica de los dos lotes que se emplearon durante el desarrollo del proyecto. En relación a los microorganismos indicadores, las BMA y hongos/levaduras se encontraron en bajas concentraciones, mientras que los coliformes totales y fecales y *E. coli* estuvieron por debajo del límite de detección de la técnica (Tabla 2).

La NOM-247-SSA1-2008 encargada de regular las características de cereales y productos derivados de cereales, indica que en harinas de avena se deben tener valores por debajo de 4.7 Log UFC g⁻¹ de BMA, 3 Log UFC g⁻¹ de hongos y levaduras y 1.7 Log UFC g⁻¹ de CT, por lo que la avena utilizada mantuvo valores por debajo de lo establecido. Bullerman & Bianchini (2009), reportaron que los cereales como el maíz, avena, arroz, sorgo y mijo, así como la soya (que no es un cereal), pueden contener bacterias mesofílicas, psicotróficas, termófilas, ácido lácticas, coliformes, hongos y levaduras, así como la presencia de algunos patógenos como *B. cereus*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*, y del mismo modo, es posible encontrar valores bajos de microorganismos indicadores. Por otro lado, la baja concentración de lípidos (5.36 g por cada 100 g de muestra), disminuye la resistencia de diferentes microorganismos ya que se ha observado que los lípidos son capaces de proteger a algunos microorganismos (Kenney & Beuchat, 2004).

Por otro lado, reporta que la presencia elevada de BMA, hongos y levaduras en alimentos de baja actividad de agua que han sido sometidos a un procedimiento de tostado o secado (como es el caso de la avena) está relacionada al medio ambiente, esto indicaría que la avena del lote 1 obtenida en septiembre del año 2020, tuvo mayor exposición que el lote 2 avena obtenido en marzo del 2021 (tabla 2).

En relación a los microorganismos patógenos, no se detectó la presencia de *L. monocytogenes* mientras que en una muestra se logró aislar a *S. enterica* (Tabla 3). La NOM-247-SSA1-2008, indica que en harinas de avena *Salmonella* spp. debe estar

ausente en 25 g. Cabe señalar que en este proyecto se utilizaron cepas resistentes a rifampicina, por lo que la presencia de *Salmonella* nativa en avena no influiría en este estudio.

Tabla 2. Contenido de microorganismos indicadores en avena.

Lote de avena	BMA	Hongos y levaduras	CT	CF	<i>E. coli</i>
	Log UFC g ⁻¹		NMP g ⁻¹		
Lote 1	1.48 ± 0.2 ¹	0.9 ± 0.5	<3	<3	<3
Lote 2	0.5 ± 0.7	0.4 ± 0.9	<3	<3	<3

¹Los valores representan el promedio de 5 muestras.

BMA: Bacterias mesófilas aerobias

CT: coliformes totales

CF: coliformes fecales

Cabe señalar que en México no hay una normativa que regule el contenido de *L. monocytogenes* en avena. El Codex Alimentario señala que no se tolera la presencia de microorganismos que puedan representar algún riesgo a la salud del consumidor, esto incluiría la presencia de *L. monocytogenes* en avena, que será remojada para la elaboración de bebidas lo que le facilitaría tener las condiciones que pudieran favorecer su desarrollo.

Tabla 3. Contenido de microorganismos patógenos en avena.

Lote de avena	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. enterica</i>
	+/n (%) ^a	
Lote 1	0/5 (0)	1/5 (20)
Lote 2	0/5 (0)	0/5 (0)

^a Número de muestra positivas/Número de muestras analizadas (porcentaje de positividad).

No existen reportes de la prevalencia de *Salmonella* o *L. monocytogenes* en avena. Sin embargo, existen estudios en productos similares de bajo contenido de agua. Brockmann *et al.* (2004) reportaron una prevalencia de *Salmonella* en semillas de ajonjolí de 9.4 %; los autores señalaron que la contaminación con patógenos puede ocurrir durante la etapa de cosecha, almacenamiento o transporte. Por otro lado, Myoda *et al.* (2019) reportaron que *Salmonella* estuvo presente en harinas de trigo (1.48 %), mientras que otros microorganismos como *L. monocytogenes* o *E. coli* no se detectaron. Juárez-Aranda *et al.* (2021) detectaron la presencia de *E. coli* en amaranto (31 %), ajonjolí (15 %) y chia (12 %) en concentraciones que oscilaron entre 0.48 y 1.63 Log NMP g⁻¹. Esta información sugiere que en alimentos de baja Aa, la presencia de *E. coli* no puede ser utilizado como un microorganismo índice de *S. enterica*.

6.2 Comportamiento de *L. monocytogenes* y *S. enterica* en avena

6.2.1 Estudios preliminares

Como parte inicial de los estudios realizados en avena, se estandarizó el proceso de inoculación del alimento para asegurar la distribución homogénea de *L. monocytogenes* y *S. enterica*.

Como se mencionó de manera detallada en la metodología, la avena (1 kg) se colocó dentro de una bolsa de plástico para proceder a la inoculación de manera independiente con ambos patógenos. La Aa inicial de la avena fue 0.46 ± 0.01 , y al agregar el inóculo (15 mL) y homogeneizarlo, la Aa incrementó a 0.57 ± 0.03 ; después de 90 min de secado, se recuperó el nivel inicial de Aa en la avena (Tabla 4).

Se realizó un análisis de varianza ANOVA y la prueba Tukey para comparar los valores de Aa de la avena al tiempo 0 con los valores obtenidos a través del tiempo. Los valores de Aa obtenidos de 90 a 120 min de secado fueron iguales al valor inicial ($p > 0.05$). Juven (1984; recuperado de Beuchat *et al.*, 2011) reportó que después de inocular por aspersión y secar leche en polvo, chocolate en polvo, carne seca y harina de huesos a 25 °C durante 1 a 2 h, se logra llegar a la Aa inicial de estos productos. Teniendo como base estos resultados, se estableció el secado durante 120 min como el tiempo de secado de la avena para experimentos posteriores.

Tabla 4. Cambios en la Aa de avena durante el secado en campana de flujo laminar a 25 °C.

Tiempo de secado (min)	Aa ¹
0	0.46 ± 0.01
15	0.53 ± 0.05
30	0.57 ± 0.03
45	0.57 ± 0.15
60	0.49 ± 0.01
75	0.47 ± 0.04
90	0.46 ± 0.04
105	0.46 ± 0.04
120	0.45 ± 0.03
135	0.41 ± 0.02
150	0.41 ± 0.04

¹Los valores representan el promedio de 9 muestras ± la desviación estándar.

Como siguiente paso se avaluó el efecto del secado en la viabilidad de ambos patógenos. Para ello, se inoculó avena con *L. monocytogenes* y *Salmonella*, se secó y se realizó la cuantificación de ambos patógenos. Los resultados obtenidos indicaron que la población de *L. monocytogenes* disminuyó 0.18 ± 0.1 Log UFC g⁻¹ y la de *S. enterica* 0.58 ± 0.42 Log UFC g⁻¹ después del secado (Tabla 5). Esto es semejante a lo obtenido por Anderson *et al.* (2017), donde se reportó una reducción de 0.67 ± 0.14 Log UFC g⁻¹ en la población de *S. Ágona* inoculada en harina de avena durante la extrusión a 65 °C durante 30 min

Así mismo, el secado de la avena durante 2 h no afectó significativamente la viabilidad de *L. monocytogenes* ($p > 0.5$); por el contrario, la disminución en la población de *S. enterica* si fue afectada por el secado ($p < 0.5$). La mayor capacidad de sobrevivencia de *L. monocytogenes* al secado, puede deberse a que las bacterias gram positivas

tienen mayor resistencia a los cambios extrínsecos, además de que *L. monocytogenes* al ser un patógeno ambiental está más adaptado a sobrevivir en ambientes estresantes.

Tabla 5. Inactivación de *L. monocytogenes* y *S. enterica* durante el secado de avena.

Microorganismo	Población (Log UFC g ⁻¹)	
	Antes del secado	Después del secado
<i>L. monocytogenes</i>	5.41 ± 0.10 A ^a	5.19 ± 0.28 A
<i>S. enterica</i>	5.23 ± 0.09 A	4.61 ± 0.41 B

^a Los valores representan el promedio de 15 datos ± desviación estándar. Entre tipo de microorganismo los valores seguidos de letras mayúsculas diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

No se detectaron diferencias estadísticas de las concentraciones de microorganismos inoculados en la avena ($p > 0.05$), esto permitió asegurar que la concentración de los microorganismos después del secado fue homogénea en todas las muestras utilizadas a lo largo de este proyecto.

6.2.2 Sobrevivencia de los patógenos en avena almacenada a 25 °C

La materia prima que se emplea para la elaboración de bebidas vegetales puede estar contaminada con microorganismos patógenos. Para conocer la capacidad de sobrevivencia de *L. monocytogenes* y *S. enterica* en avena durante el almacenamiento a temperatura ambiente, se inocularon dos lotes de avena de manera independiente cada uno con un solo patógeno, y periódicamente se cuantificaron las poblaciones sobrevivientes. Después de 165 días de almacenamiento de la avena a 25 °C se observó una disminución de 3.26 ± 0.71 Log UFC g⁻¹ de *L. monocytogenes* y de 2.92 ± 0.61 Log UFC g⁻¹ de *S. enterica* (Figura 6). Se sabe que los microorganismos se ven afectados por la baja Aa de los alimentos; sin embargo, algunos como *Salmonella* spp., son capaces de sobrevivir por largos periodos de tiempo (Podolak *et al.*, 2010).

Podolak *et al.* (2010), reportaron la disminución de 1 Log UFC g⁻¹ de *Salmonella* durante el almacenamiento de mantequilla de mani (Aa = 0.27 ± 0.05) a 22 °C durante 3.5 años; también reportaron que *Salmonella* fue capaz de sobrevivir hasta 10 meses en leche en

polvo con chocolate. Uesugui *et al.* (2006), reportaron reducciones de 0.18 Log UFC por mes de *Salmonella* en almendras Kermel almacenadas a 22 °C.

Los resultados de este estudio demostraron que *L. monocytogenes* puede llegar a sobrevivir hasta 165 días en avena. Pocos son los estudios publicados acerca de la sobrevivencia de *L. monocytogenes* en alimentos de baja Aa.

No obstante, se ha reportado que el estrés osmótico causado a *L. monocytogenes* por la baja Aa de agua de los alimentos, induce la expresión de algunas proteínas como CspABD, lap, *Imo0501* y *Imo 1078*, mismas que son activadas cuando *L. monocytogenes* sufre estrés por frío; sin embargo, este mecanismo no está bien estudiado, por lo que se ha aceptado que el primer mecanismo de *L. monocytogenes* cuando es estresada por cambios osmóticos, es permitir la entrada de K⁺ activado por el sistema Kdp, la cual está regulada con la betaín-glicina (transportada por BetL y Gbo) y la carnitina (transportada con el OpuC) obtenidas del ambiente. A largo plazo, el K⁺ es reemplazado por componentes orgánicos como: la trehalosa que será metabolizada a fosfotetralosa cuando se active el gen *treA* (*Imo1254*) y la prolina sintetizada por la ProBA en condiciones de estrés osmótico. sí la trehalosa metabolizada mantendrá estable la membrana celular y evitarán la desnaturalización de proteínas (Burguess *et al.*, 2016).

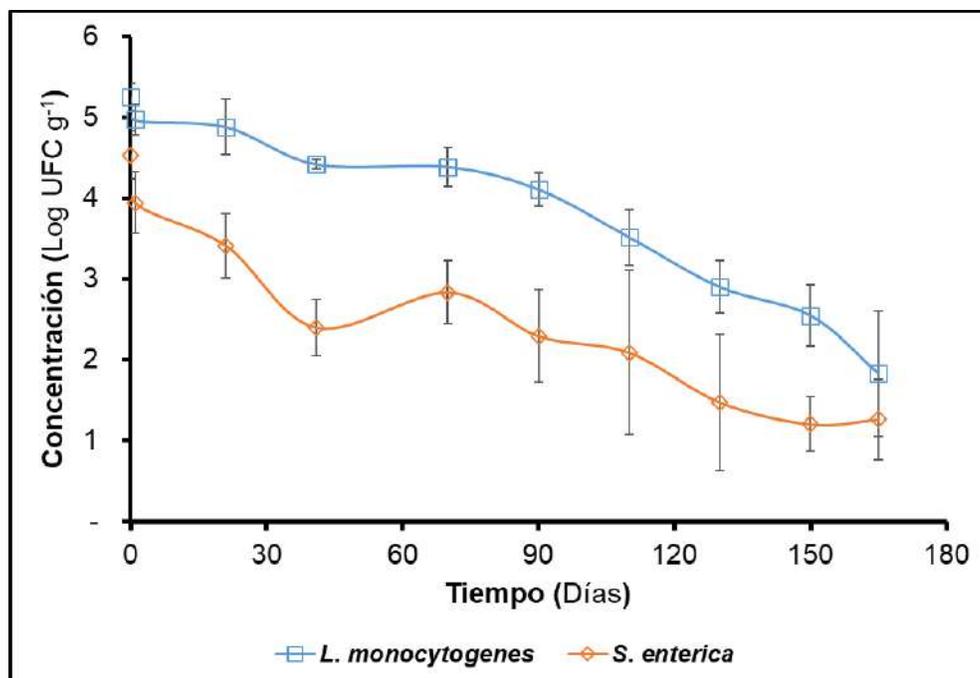


Figura 4. Sobrevivencia de *L. monocytogenes* y *S. enterica* en avena almacenada a 25 °C por 165 días. Los valores representan la media \pm desviación estándar de 9 datos.

L. monocytogenes fue el patógeno que menor disminución de población presentó durante el almacenamiento de la avena a 25 °C. La velocidad de inactivación de *L. monocytogenes* y *S. enterica* fue de 0.00097 y 0.00091 Log UFC h⁻¹, respectivamente (Tabla 6), y no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambas ($p > 0.5$).

Juárez-Arana *et al.* (2021), reportaron que la velocidad de inactivación de *Salmonella* en semillas de chíá, ajonjolí y amaranto almacenadas a 25 °C fue de 0.017, 0.018 y 0.012 Log UFC h⁻¹, respectivamente; estas velocidades son mayores que las observadas en la avena.

Tabla 6. Inactivación de *L. monocytogenes* y *S. enterica* durante el almacenamiento de avena a 25 °C.

Microorganismo	Velocidad de inactivación (Log UFC h ⁻¹)	Reducción a los 165 días (Log UFC)
<i>L. monocytogenes</i>	0.00097 \pm 0.00045 A ^a	3.27 \pm 0.72
<i>S. enterica</i>	0.00091 \pm 0.00013 A	2.93 \pm 0.61

^a Los valores representan la media \pm desviación estándar de 9 datos. Los valores seguidos de letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

6.3 Comportamiento de *L. monocytogenes* y *S. enterica* durante la etapa de remojo de avena

Durante el proceso de elaboración de bebidas vegetales, incluidas las de avena, el remojo en agua es una práctica común realizada para ablandar el tejido de la semilla y facilitar la molienda. Para evaluar el nivel de riesgo asociado a esta práctica, avena inoculada con ambos microorganismos patógenos se remojó durante 12 h y periódicamente se cuantificó la población microbiana. Los inóculos iniciales de *L. monocytogenes* y *S. enterica* fueron de 4.90 y 4.27 Log UFC g⁻¹. Cabe señalar que la probabilidad de encontrar de forma natural esta concentración de los microorganismos en la avena es baja, sin embargo, esta concentración facilitó el estudio del comportamiento de los patógenos durante la etapa del remojo. Los resultados mostraron que después de 12 h de almacenamiento *L. monocytogenes* incrementó 2.48 Log UFC g⁻¹ y *S. enterica* 2.18 Log UFC g⁻¹ (Figura 7). Por otro lado, las velocidades de desarrollo de *L. monocytogenes* y *S. enterica* fueron de 0.247 ± 0.063 y 0.193 ± 0.036 Log UFC h⁻¹, respectivamente (Tabla 7). Es decir, *L. monocytogenes* desarrolló con mayor velocidad ($p < 0.05$).

Tabla 7. Velocidad de desarrollo e incremento en la población de *L. monocytogenes* y *S. enterica* durante el remojo de avena a 25 °C.

Microorganismo	Velocidad de desarrollo (Log UFC h ⁻¹)	Incremento neto en 12 h (Log UFC)
<i>L. monocytogenes</i>	0.247 ± 0.063	2.48 ± 0.35
<i>S. enterica</i>	0.193 ± 0.036	2.18 ± 0.36

^a Los valores representan el promedio de 9 datos.

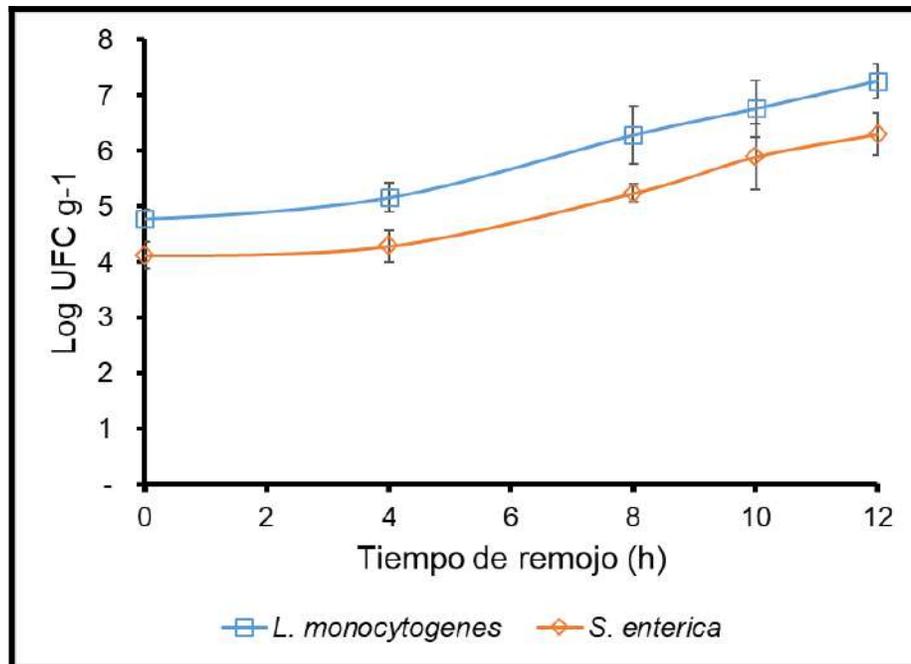


Figura 5. Desarrollo de *L. monocytogenes* y *S. enterica* durante el remojo de avena a 25 °C.

La base de datos ComBase (www.combase.cc) tiene registrado que la velocidad de desarrollo de *L. monocytogenes* en caldo nutritivo a 25 °C es de 0.349 Log UFC h⁻¹, mientras que la de *S. enterica* es de 0.488 Log UFC h⁻¹, lo que equivale a un desarrollo de 1.40 y 2.57 veces más rápido que el observado en avena remojada con agua, respectivamente. En leche descremada Rosenow *et al.* (1987), reportaron una velocidad de crecimiento de *L. monocytogenes* de 0.158 Log UFC h⁻¹ durante la incubación a 21 °C y Donnelly *et al.* (1989), de 0.251 Log UFC h⁻¹ a 22 °C. Park *et al.* (1972), reportaron desarrollo de *S. Typhimurium* a razón de 0.266 Log UFC h⁻¹ en leche descremada. Estos resultados nos permiten suponer que la avena remojada con agua resulta un medio que permite un mejor desarrollo de *L. monocytogenes* que la leche descremada que es considerada un alimento rico en nutrientes; esto puede asociarse a la menor cantidad de ácidos grasos que contiene la avena en comparación con la leche (FDC, 2019; SIAP, 2018), ya que se ha observado que los ácidos grasos presentes en la leche pueden tener un efecto inhibitor en las bacterias (Albarracin *et al.*, 2006).

Abushehali *et al.* (2003) realizaron un experimento en el que evaluaron el comportamiento de *Salmonella* durante el remojo de cereal de avena reconstituida con

leche, jugo de manzana y agua. Los resultados indicaron que al incubar las muestras a 25 °C por 8 h la población del patógeno se incrementó en 1.0, 1.2 y 0.1 Log UFC g⁻¹ con agua, leche y jugo de manzana, respectivamente. Estos datos son semejantes a los obtenidos en este estudio a las 8 h de remojo en donde la población de *Salmonella* se incrementó en 1.12 ± 0.28 UFC g⁻¹.

La práctica de remojar la avena durante la noche (~8 a 16 h) a temperatura ambiente (~25 °C) permite el desarrollo de *L. monocytogenes* y *S. enterica* representando un claro incremento en el riesgo a la salud de los consumidores.

6.4 Comportamiento de *L. monocytogenes* y *S. enterica* durante la preparación de bebidas de avena usando un equipo casero comercial.

En esta serie de experimentos se evaluó el efecto de la preparación de bebidas vegetales calientes y frías usando un equipo casero comercial en el contenido de *L. monocytogenes* y *S. enterica*. Los tratamientos utilizados fueron aplicados en avena seca y remojada en agua purificada por 12 h, siendo este el peor escenario de acuerdo con los datos de la serie de experimentos de remojo previamente presentados. Durante la preparación de las bebidas calientes se monitoreó la temperatura de las bebidas. El equipo alcanzó temperaturas de 97.8 ± 2.9 °C durante el calentamiento por 10.3 ± 1.5 min (Tabla 8). Estos valores superan a la temperatura recomendada en una pasteurización rápida (72 °C/15 s) de acuerdo a lo especificado por la NOM-243-SSA1-2010.

Tabla 8. Temperaturas alcanzadas por el equipo Soyabella ® durante el ciclo de calentamiento.

Etapa	Temperatura (°C)	Duración de la etapa (min)
Inicio del ciclo	27.9 ± 1.8	0
Molienda	79.1 ± 14.0	2.9 ± 0.8
Calentamiento	97.3 ± 4.0	19.8 ± 2.7

Los valores muestran las medias de 15 ciclos de elaboración de bebidas calientes.

La concentración inicial de células en la avena seca en promedio fue 5.22 y 4.64 Log UFCg⁻¹ para *L. monocytogenes* y *Salmonella*, respectivamente. En la avena remojada independientemente del patógeno las poblaciones fueron superiores a los 7 Log UFCg⁻¹ (Tabla 9). Durante la preparación de las bebidas empleando el modo de calentamiento usando avena sin remojo, se lograron eliminar 4.15 y 3.67 Log UFC g⁻¹ de *L. monocytogenes* y *S. enterica*, respectivamente. En contraste, cuando se usó la avena remojada la reducción fue mayor; *L. monocytogenes* se redujo en 6.61 Log g⁻¹ y *S. enterica* en 6.95 Log UFC g⁻¹. Se debe recordar que las diferentes disminuciones de los microorganismos se deben principalmente a la población antes del tratamiento térmico, la cual fue mayor en avena remojada.

Chabra *et al.* (2002), reportaron disminuciones de 5 Log UFC g⁻¹ de *L. monocytogenes* en fórmulas lácteas al ser calentadas a 64 ± 1 °C durante 15 min. Por otro lado, Bradshaw *et al.* (1987), mencionaron que *S. enterica* disminuyó 3.5 Log UFC g⁻¹ durante el calentamiento de leche bronca a 72 °C, esta disminución sucede tan pronto se alcanza la temperatura. En jugo de manzana contaminado con *S. enterica* se logró disminuir 7 Log UFC g⁻¹ al calentar a 90 °C utilizando microondas (Méndez-Oliveira, 2020).

El equipo utilizado para la preparación de las bebidas de avena logró reducciones mayores a 5 Log UFC g⁻¹, por lo tanto, cumple con la disminución mínima de microorganismos patógenos en alimentos recomendada por la FDA.

Tabla 9. Contenido de *L. monocytogenes* y *S. enterica* en diferentes etapas de la preparación de bebidas de avena.

Etapa	Tipo de avena	Tratamiento	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. enterica</i>
			(Log UFC mL ⁻¹ o g ⁻¹)	
Antes del tratamiento	Seca	No aplica	5.22 ± 0.0.63 C	4.64 ± 0.64 C
	Remojada	No aplica	7.97 ± 0.65 A	7.59 ± 0.24 A
Después del tratamiento	Seca	No térmico	3.54 ± 0.59 D	1.99 ± 0.47 D
		Térmico	1.07 ± 0.19 E	< 1.00 E
	Remojada	No térmico	7.10 ± 0.33 B	6.72 ± 0.84 B
		Térmico	1.02 ± 0.11E	< 1.00 E

Los datos representan la media de 9 muestras. Los valores seguidos de letras diferentes indican diferencia estadística entre los tratamientos aplicados en cada patógeno (columna) ($p < 0.05$).

Finalmente, durante la elaboración de las bebidas sin un tratamiento térmico (bebida fría) empleando avena seca, las reducciones de *L. monocytogenes* (1.68 Log UFC g^{-1}) y *S. enterica* (1.65 Log UFC g^{-1}) fueron menores a lo observado durante la preparación de la bebida caliente (Figura 8). Cuando se utilizó la avena remojada la reducción observada fue mucho menor (0.87 Log UFC g^{-1}) para ambos patógenos.

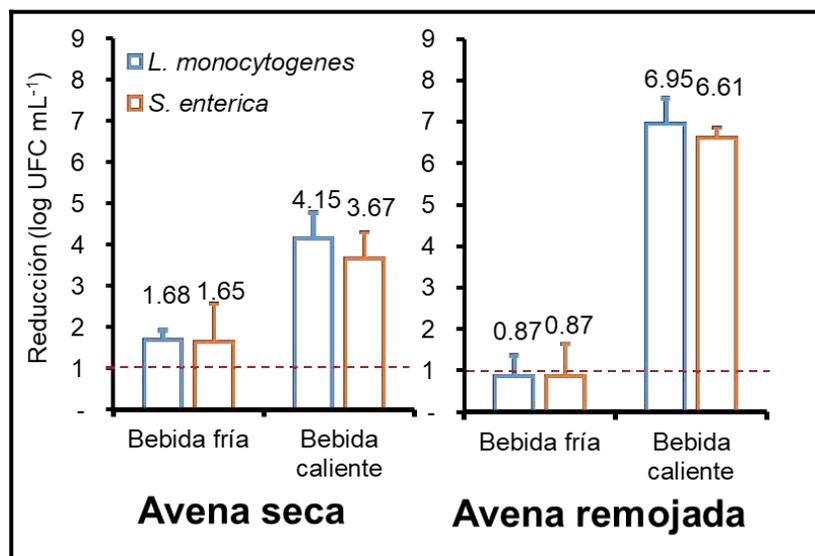


Figura 6. Reducción de *L. monocytogenes* y *S. enterica* durante la elaboración de bebidas de avena.

Se puede concluir que la aplicación de un tratamiento térmico en el equipo Soyabella® para la elaboración de bebidas sustitutas de leche, permite la eliminación recomendada (5 Log UFC mL^{-1}) de patógenos para asegurar su inocuidad.

6.5 Comportamiento de *L. monocytogenes* y *S. enterica* durante el almacenamiento en refrigeración de bebidas de avena.

Las bebidas de avena se almacenaron a 5 °C por 7 días para evaluar el comportamiento de los patógenos durante la vida útil promedio de la bebida elaborada de forma casera.

Durante los 7 días de almacenamiento de las bebidas preparadas con avena seca inoculadas con ambos patógenos se observó un incremento en la concentración de células con respecto a las concentraciones iniciales del día 0 (Tabla 10). El desarrollo de *L. monocytogenes* fue mayor evidenciando el potencial psicrótrofo del microorganismo (Carstens *et al.*, 2019).

De acuerdo a los resultados obtenidos al comparar las concentraciones de *Salmonella* a los 0 y 7 días de almacenamiento, se puede indicar que este patógeno desarrollo durante el periodo de refrigeración, a pesar de que el desarrollo de *Salmonella* se detiene a temperaturas por debajo de los 8 °C (Zaher & Fujikawa, 2011), sin embargo, no hubo diferencia estadística ($p = 0.06$) de entre los valores del día 0 y el día 7 de refrigeración de las bebidas contaminadas, indicando que *Salmonella* no desarrollo durante su almacenamiento a 4 °C. Caso contrario es el de *L. monocytogenes* en donde si hubo diferencia estadística ($p = 0.04$), y se puede observar la evidente diferencia de concentraciones de *L. monocytogenes* entre el día 0 y el día 7 de almacenamiento. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Lima *et al.* (2021), quienes mencionan que *L. monocytogenes* desarrolló más rápido que *S. Typhimurium*, en leche de bisonte con y sin pasteurización almacenada a 8 °C.

Tabla 10. Población de patógenos de bebidas de avena refrigerada

Tipo de bebida	Tipo de avena	<i>L. monocytogenes</i>		<i>S. enterica</i>	
		0 días	7 días	0 días	7 días
Log UFC g ⁻¹					
Bebida fría	Seca	3.54 ± 0.59 C	6.87 ± 1.66 B	1.99 ± 0.47 B	3.23 ± 1.20 B
	Remojada	1.07 ± 0.19 D	<1 D	< 1 C	< 1 C
Bebida caliente	Seca	7.10 ± 0.33 A	7.41 ± 0.50 A	6.72 ± 0.84 A	8.28 ± 0.53 A
	Remojada	1.02 ± 0.11 E	<1 E	< 1D	< 1 D

Los valores muestran las medias de 6 muestras de cada tratamiento. Los valores seguidos de letras diferentes indican diferencia estadística entre los tratamientos aplicados en cada patógeno (columna) ($p < 0.05$).

7. CONCLUSIONES

L. monocytogenes y *S. enterica* tienen la capacidad de mantenerse viables en avena almacenada a temperatura ambiente durante 165 días (~5.5 meses).

La práctica de remojar la avena por más de 8 h a temperatura ambiente (~ 25 °C) para elaborar bebidas vegetales, permite el desarrollo de *L. monocytogenes* y *S. enterica* elevando el riesgo al consumidor.

La aplicación de un método que permita calentar las bebidas de avena sustitutas de leche a más de 90 °C durante al menos 10 minutos, disminuye la concentración inicial de patógenos sin importar si la avena fue remojada o no. Por lo tanto, estos equipos de uso casero son una buena alternativa para asegurar la inocuidad de las bebidas vegetales.

La utilización de equipos que solo licuen o muelan avena (con y sin remojo) que pudiera estar contaminada con *L. monocytogenes* o *S. enterica*, no disminuye la concentración inicial de estos patógenos, manteniendo el riesgo de infecciones causadas por estos microorganismos.

La práctica de almacenar en refrigeración (4 °C) por 7 días, bebidas de avena que pudieran estar contaminadas con *L. monocytogenes* permite el incremento de las poblaciones incrementando el riesgo al consumidor.

Los resultados obtenidos en este proyecto demuestran el posible riesgo de enfermarse que tiene el consumo de bebidas sustitutas de leche, que pudieran estar contaminadas por algún patógeno, siendo una buena solución preventiva aplicar algún tratamiento que asegure la inhibición de patógenos en estas bebidas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abushelaibi, A. A., Sofos, J. N., Samelis, J., & Kendall, P. A. (2003). Survival and growth of *Salmonella* in reconstituted infant cereal hydrated with water, milk or apple juice and stored at 4 °C, 15 °C and 25 °C. *Food Microbiology*, (20), 17-25. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00136-3](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00136-3).
- Albarracin, F. Y., Sarmiento, P., Carrascal, A. K., & Mercado, M. (2006). Estimación de la proporción de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. en quesos frescos (queso de hoja, cuajada) y queso doble crema producidos y comercializados en el Municipio de Pamplona, Norte de Santander. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 4(2), 30-41.
- Anderson, N. M. et al. (2017). *Salmonella* inactivation during extrusion of an oat flour model food. *Journal of Food Science*, 82(3), 738-743. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13629>.
- Andrews, W. H., Jacobson, A., & Hammack, T. (2011). Capítulo 5. *Salmonella*. *Bacteriological Analytical Manual*. FDA 2018.
- Archer, J., et al. (1998). Heat resistance of *Salmonella* Weltevreden in low-moisture environments. *Journal Food Protection*. 61(8), 969–973.
- Beuchat, L., et al. (2011). Persistence and survival of pathogens in dry foods and dry food processing environments. *ILSI Europe Report Series*. 2011(1), 1-48.
- Bourdeoux, S., et al. (2018). Inactivation of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 inoculated on coriander by freeze-drying and supercritical CO₂ drying. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 47, 180-186. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.02.007>.
- Bradshaw A., et al. (1987). Thermal resistance of disease-associated *Salmonella typhimurium* in milk. *Journal of Food Protection* 50, 95 – 96. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-50.2.95>.

- Brockmann, S. O., Piechotowski, I., & Kimmig, P. (2004). *Salmonella* in sesame seed products. *Journal of Food Protection*, 67(1), 178-180. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.1.178>.
- Bullerman, L. B., & Bianchini, A. (2009). Food safety issues and the microbiology of cereals and cereal products. *Microbiologically Safe Foods*. 15(1), 315-335. <https://doi.org/10.1002/9780470439074.ch15>.
- Burgess, C. M., et al. (2016). The response of foodborne pathogens to osmotic and desiccation stresses in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 221, 37-53. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.014>.
- Carstens, C., Salazar, J. K., & Darkoh, C. (2019). Multistate Outbreaks of Foodborne Illness in the United States Associated with Fresh Produce from 2010-2017. *Frontiers in Microbiology*, 10 (2667), 1-15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02667>.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. (1998). Multistate Outbreak of *Salmonella* Serotype Agona Infections Linked to Toasted Oats Cereal -- United States, April-May, 1998. MMWR. Recuperado de Marzo, 25, 2020, <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00053368.htm>.
- CDC^A. Centers for Disease Control and Prevention. (2018). Brote multiestatal de infecciones por *Salmonella* Typhimurium asociado al coco deshidratado. Recuperado de Marzo, 24, 2020, <https://www.cdc.gov/Salmonella/typhimurium-03-18/index-esp.html>.
- CDC^B. Centers for Disease Control and Prevention. (2018). Multistate Outbreak of *Salmonella* Mbandaka Infections Linked to Kellogg's Honey Smacks Cereal (Final Update)
- Chen, C. H., et al. (2019). Efficacy of plant-derived antimicrobials for controlling *Salmonella* Schwarzengrund on dry pet food. *International Journal of Food Microbiology*, 296, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.007>.

- Chhabra & et al. (2002). A predictive model that evaluates the effect of growth conditions on the thermal resistance of *Listeria Monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 78, 235-243. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00114-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00114-9).
- de Campagnaro, E. D. (2017). Bebidas vegetales y leches de otros mamíferos. *Archivos Venezolanos De Puericultura y Pediatría*, 80(3), 96-101.
- Deswal, A., Deora, N. S., & Mishra, H. N. (2014). *Optimization of enzymatic production process of oat milk using response surface methodology*. *Food and Bioprocess Technology*, 7(2), 610-618. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1144-2>
- DMFit (21 de marzo de 2021). *DMFit for Excel*. [Archivo .xlam]. COMBASE. https://browser.combase.cc/DMFit_Excel.aspx
- Donnelly et al. (1986). Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition. *Journal of Food Protection* 49(12), 994-998. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-49.12.994>.
- Elsabie, W. B., & Aboel Einen, K. A. (2016). Comparative evaluation of some physicochemical properties for different types of vegan milk with cow milk. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 7(11), 457-461.
- FDC (30 de octubre de 2020). *Cereal, toasted oat*. USDA. Recuperado el 15 de marzo de 2021 de <https://celiac.org/gluten-free-living/gluten-free-foods/>
- FDC^A (01 de abril de 2019). *Oats (Includes foods for USDA's Food Distribution Program)*. USDA. Recuperado el 15 de marzo de 2021 de <https://celiac.org/gluten-free-living/gluten-free-foods/>
- Feng, P., et al. (2002). BAM: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. *Bacteriological Analytical Manual*, 13. FDA 2018.
- Finn, S., et al. (2013) Mechanisms of survival, responses and sources of *Salmonella* in low-moisture environments. *Front Microbial*. 14, 4, 331. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00331>.

- Food Data Central [FDC] (2019). Search Food Data Central. *U.S. Departamento of Agriculture*. Recuperado el 21 de marzo de 2021. <https://fdc.nal.usda.gov/>
- García-Saavedra, N. M. (2017). *Bebidas vegetales [Tesis de grado, Universidad Complutense]*. Descargado de Marzo 24, 2020, <https://eprints.ucm.es/56464/>.
- Gluten-Free-Living (2021). Gluten Free Foods. *Celiac Disease FUNDATION* ®. Recuperado el 15 de marzo de 2021 de <https://celiac.org/gluten-free-living/gluten-free-foods/>
- Gruzdev, N., Pinto, R. & Sela, S. (2011) Effect of desiccation on tolerance of *Salmonella enterica* to multiple stresses. *ApEnM American Society for Microbiology* 77(5), 1667-1673. <https://doi.org/10.1128/AEM.02156-10>.
- Hitchins, A. D., Jinneman, K., & Chen, Y. (2004). BAM chapter 10: detection of *Listeria monocytogenes* in foods and environmental samples, and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. *US Food and Drug Administration*, Washington, DC. *US Food and Drug Administration, Washington, DC: https://www. FDA.gov/food/laboratory-methods-food/bam*.
- Isaacs, S., *et al.* (2005). An international outbreak of salmonellosis associated with raw almonds contaminated with a rare phage type of *Salmonella Enteritidis*. *Journal of Food Protection*, 68(1), 191-198. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.1.191>.
- Juárez Arana, C. D., Martínez Peniche, R. A., Martínez, M. G., & Iturriaga, M. H. (2021). Microbiological Profile, Incidence, and Behavior of *Salmonella* on Seeds Traded in Mexican Markets. *Journal of Food Protection*, 84(1), 99-105. <https://doi.org/10.4315/JFP-19-595>.
- Juven, B.J., Cox, N.A., Bailey, J.S., Thomson, J.E., Charles, O.W. and Shutze, J.V. (1984). Survival of *Salmonella* in dry food and feed. *Journal of Food Protection*, 47, 445-448. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-47.8.653>.
- Karmally, W., *et al.* (2005). Cholesterol-lowering benefits of oat-containing cereal in Hispanic Americans. *Journal of the American Dietetic Association*, 105(6), 967-970.

- Kenney, S.J. & Beuchat, L.R. (2004). Survival, growth, and thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in products containing peanut and chocolate. *Journal of Food Protection*, 67, 2205-2211. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2005.03.006>.
- Kottapalli, B., et al. (2019). Thermal Inactivation of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in Peanut Butter–Filled Pretzels and Whole Wheat Pita Chips. *Journal of Food Protection*, 82(2), 238-246. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-231>.
- Lam, G. Y., et al. (2012). Interactions of *Listeria monocytogenes* with the autophagy system of host cells. In *Advances in Immunology*. 113, 7-18. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394590-7.00008-7>.
- Lamas, A., et al. (2018). A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiological Research*. 206, 60-73. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.010>.
- Lawe-Davies, C. F (2021). Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria. *WHO Comunicados de prensa*
- Lee, J. Y., Kim, S. S., & Kang, D. H. (2015). Effect of pH for inactivation of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in orange juice by ohmic heating. *Food Science and Technology*, 62(1), 83-88. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.01.020>.
- Lima, J. S., et al. (2021). Growth kinetics of *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in buffalo milk under different processing and storage conditions. *Ciência Rural*, 51(11), 1678-1687. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200967>.
- Luna, S., et al. (2018). Climate change and Lyme disease: Outbreak of *Salmonella* Chailey infections linked to precut coconut pieces—United States and Canada, 2017. *Canada Communicable Disease Report*, 44(10), 264-266. <https://doi.org/10.14745/ccdr.v44i10a05>.

- Maserati, A. (2017). *Salmonella's desiccation survival and thermal tolerance: genetic, physiological, and metabolic factors* [Tesis de Doctorado, University of Minnesota].
https://conservancy.umn.edu/bitstream/handle/11299/190528/Maserati_umn_0130E_18401.pdf?sequence=1.
- Maturin, L., & Peeler, J. T. (2001). Capítulo 3, Aerobic plate count. *Bacteriological Analytical Manual*. FDA 2018.
- Méndez-Oliveira, G., & et al. (2020). Microwave pasteurization of apple juice: Modeling the inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* Typhimurium at 80–90°C. *Food Microbiology*, 87, 103382. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103382>.
- Meydani, M. (2009). Potential health benefits of avenanthramides of oats. *Nutrition Reviews*, 67(12), 731-735. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00256.x>.
- Miñana, I. V., Villares, J. M. M., & Serra, J. D. (2015). Errores dietéticos en el lactante: las bebidas vegetales (parte 1). *Acta Pediátrica Española*, 73(8), 195-202.
- Myoda, S. P., et al. (2019). Occurrence and levels of *Salmonella*, enterohemorrhagic *Escherichia coli*, and *Listeria* in raw wheat. *Journal of Food Protection*, 82(6), 1022-1027. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-345>.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2020). *Taxonomy Browser*. Recuperado de Marzo, 25, 2020 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>.
- Ochoa, I. M. F., & y Rodríguez, A. V. (2005). Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* spp. *Revista Latinoamericana De Microbiología*, 47(1-2), 25-42.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). *Listeriosis*. Descargado de Diciembre, 12 del 2021, <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>
- Park, & et al., (1972). Survival of *Salmonella typhimurium* in refrigerated cultured milks. *Journal of Milk and Food Technology* 35, 489 – 495. <https://doi.org/10.4315/0022-2747-35.8.489>.

- Peng, J., *et al.* (2015). Thermal pasteurization of ready-to-eat foods and vegetables: Critical factors for process design and effects on quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(14), 2970–2995. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1082126>
- Phongthai, S., D'Amico, S., Schoenlechner, R., Homthawornchoo, W., & Rawdkuen, S. (2017). Effects of protein enrichment on the properties of rice flour based gluten-free pasta. *LWT*. 80, 378-385. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.044>
- Piña Palmera (2020). © Piña Palmera A.C. Descargado de mayo, 17, 2020, <http://www.pinapalmera.org/>.
- Plants database (2021.) Avena L. Oat. *United States Departamento of Agriculture*. Recuperado el 14 de marzo de 2021 de <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=AVENA>
- Podolak, R., *et al.* (2010). Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods. *Journal Of Food Protection*, 73(10), 1919-1936. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.10.1919>.
- Procuraduría federal del consumidor (PROFECO). (Mayo, 2019) Laboratorio PROFECO Informa N°507, BEBIDAS VEGETALES. Revista Del Consumidor. Página 53-61.
- PROFECO. informa. (2020). Bebidas vegetales [Archivo PDF]. *PROFECO Informa*. Descargado de Marzo 24, 2020, https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/458273/Estudio_Calidad_Bebidas_vegetales.pdf.
- Rachon, G., Peñaloza, W., & Gibbs, P. A. (2016). Inactivation of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecium* NRRL B-2354 in a selection of low moisture foods. *International Journal of Food Microbiology*, 231, 16-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.022>.

RASFF. (marzo 2021). RASFF Portal. *European Commission*. Recuperado el 15 de marzo de 2021 de <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchForm&cleanSearch=1>

RASFF. Rapid Alert System for Food and Feed. (03 de abril de 1994). *Notification details - 1994.06*. RASFF Portal, European Commission. Recuperado el 15 de marzo de 2021 de https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=notificationDetail&NOTIF_REFERENCE=1994.06

Remes-Troche, et al. (2018). Clinical guidelines on the diagnosis and treatment of celiac disease in Mexico. *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)*, 83(4), 434-450.

Ripley, B. D. (2001). The R project in statistical computing (4.0.0). [Programa estadístico para Windows] MSOR Connections. *The Newsletter Of The LTSN Maths, Stats & OR Network*, 1(1), 23-25. Recuperado de Junio, 22, 2020, <https://www.r-project.org/>

Rosenow & et al. (1987). Growth of *Listeria monocytogenes* in skim, whole and chocolate milk and whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21 and 35°C. *Journal of Food Protection* 50: 452 – 459. <https://doi.org/10.1016/j.rgm.2018.05.005>.

Sanchez-Fermín, S. (5 de Abril 2019del 2019). El boom de la leche que no es leche. *EXPANSIÓN*. Descargado de Marzo, 24, 2020, <https://expansion.mx/empresas/2019/04/05/el-boom-de-la-leche-que-no-es-leche>.

Secchi, A. M., & Vitello, M. L. (2016). *Proyecto de ingeniería para la instalación de una planta elaboradora de leche de almendras* [Tesis de Doctoral, Universidad Argentina de la Empresa]. <https://docer.com.ar/doc/n0sexn>.

Servicios de Información Agroalimentaria y Pesquera, SIAP. (2020). *Atlas Agroalimentario 2020*. Recuperado de Noviembre, 28, 2021, https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2020/Atlas-Agroalimentario-2020

- Sethi, S., et al. (2016). Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. *Journal of Food Science and Technology.*, 53(9), 3408-3423. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2328-3>.
- Spector, M. P., & Kenyon, W. J. (2012). Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International*, 45(2), 455-481. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.056>.
- Suárez-Guzmán, L. M. (2013). Estudio preliminar de la fermentación de licuado de avena (*Avena sativa* L) con microorganismos probióticos como alternativa a las leches de origen animal. [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/27919/Tesina%20estudio%20preliminar%20fermentaci%*c3%b3n*%20avena.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/27919/Tesina%20estudio%20preliminar%20fermentaci%c3%b3n%20avena.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Szilagyi, A., & Ishayek, N. (2018). Lactose intolerance, dairy avoidance, and treatment options. *Nutrients*, 10(12), 1994-2024. <https://doi.org/10.3390/nu10121994>.
- Tacket, C. O., et al. (1985). An outbreak of *Yersinia enterocolitica* infections caused by contaminated tofu (soybean curd). *American Journal of Epidemiology*, 121(5), 705-711. <https://doi.org/10.1093/aje/121.5.705>.
- Tournas, V., et al. (2001). Capitulo 18: yeasts, molds and mycotoxins. *Bacteriological Analytical Manual*. FDA 2018.
- Uesugi, A.R., Danyluk, M.D. & Harris, L.J. (2006). Survival of *Salmonella* Enteritidis phage type 30 on inoculated almonds stored at -20, 4, 23, and 35°C. *Journal of Food Protection*, 69:1851-1857.
- United State Departament of Agriculture (USDA). (2012). *Introduction to the Microbiology of Food Processing*. Descargado de Marzo, 29, 202, https://www.fsis.usda.gov/shared/PDF/SPN_Guidebook_Microbiology.pdf.
- Vera, A., et al. (2013). Main virulence factors of *Listeria monocytogenes* and its regulation. *Revista Chilena De Infectologia: Organo Oficial De La Sociedad Chilena De Infectologia*, 30(4), 407-416. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000400010>.

Welland, D. (15 de agosto del 2020). 17 Glorious Grains You Need to Know. *Food & Nutrition*. <https://foodandnutrition.org/september-october-2015/17-glorious-grains-need-know/>

Wolf, A., & Mackinson, D. (2020). Vida saludable en América Latina: Alimentación a base de productos vegetal y proteínas alternativas. *Euromonitor International*. Descargado de Marzo, 24, 2020, <https://blog.euromonitor.com/vida-saludable-en-america-latina-alimentacion-a-base-de-productos-vegetal-y-proteinas-alternativas/>.

Zaher, S. M., & Fujikawa, H. (2011). Effect of native microflora on the growth kinetics of *Salmonella* Enteritidis strain 04-137 in raw ground chicken. *Journal of Food Protection*, 74(5), 735-742. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-334>.