

MOHOS Y LEVADURAS PRESENTES EN LIMONCELLO ELABORADO ARTESANALMENTE

Mónica Félix¹, Irene Ameztoy², Élide Ramírez¹ y María Yeannes^{1,2*}

¹Preservación y Calidad de Alimentos. Departamento de Química. FCEyN y Facultad de Ingeniería, UNMDP.

Universidad Nacional de Mar del Plata, Funes 3350. 7600 Mar del Plata. Argentina.

²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

E-mail: myeannes@mdp.edu.ar

RESUMEN

El limoncello se obtiene de la maceración de la cáscara de limón en etanol, agua y azúcar. En Argentina se elabora industrialmente y dada la simpleza del proceso se encuentra en aumento su elaboración artesanal. El objetivo del presente trabajo fue determinar la calidad microbiológica de muestras de limoncello artesanal. Se analizaron 11 muestras, en agar hongos y levaduras (HyL) y HyL con agregado de limoncello. Se obtuvo crecimiento de *Alternaria spp.*, *Cladosporium spp.*, *Crysonilia spp.*, *Moniliella spp.*, *Penicillium spp.*, *Fusarium spp.* y *Acremonium spp.* en ocho muestras. Esto determina una disminución de su vida útil y un peligro potencial para la salud del consumidor pues algunos de los géneros encontrados son capaces de producir toxinas y alergias. La adición de sorbato de potasio a 0,1 % (m/m) inhibió el crecimiento de estos microorganismos.

Palabras clave: limoncello, proceso artesanal, contaminación, mohos.

ABSTRACT

Mohos and yeasts presents in limoncello handcraft elaborated

The limoncello is obtained from rind of lemon macerated in ethanol, water and sugar. In Argentina it is elaborated in traditional factories and since simplicity of process its handcraft elaboration is increasing. The aim of the present work was to determine the microbiological quality of samples of limoncello from handcraft elaboration. Eleven samples, in agar for fungi and yeasts (F&Y), and F&Y with limoncello were analyzed. Growth of *Alternaria spp.*, *Cladosporium spp.*, *Crysonilia spp.*, *Moniliella spp.*, *Penicillium spp.*, *Fusarium spp.* and *Acremonium spp.* in 8 samples were obtained. This fact determined a decrease of the shelf life and a potential danger for consumer health since genus found may be capable to generate toxins and allergies. The addition of 0.1% (w/w) potassium sorbate inhibited growth of these microorganisms.

Key words: limoncello, handcraft process, contamination, moulds.

INTRODUCCIÓN

El licor de limón, comúnmente conocido como limoncello, es un producto de gran demanda en el mercado internacional y se elabora tanto industrial como artesanalmente. Es de origen italiano, el más famoso de la tradición agrícola artesanal de ese país. Los mejores frutos cítricos utilizados para su fabricación son cultivados en la zona del Golfo de Nápoles y de la Costa Amalfitana: Nápoles,

*María Isabel Yeannes: Ingeniera Química. Profesora Adjunta Regular de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina. Investigador CONICET. Directora Grupo de Investigación: Preservación y Calidad de Alimentos especializado en Ciencia, Tecnología e Ingeniería Pesquera y otros alimentos. Directora de Becarios y Tesis de Grado y Postgrado. Directora y Codirectora de Convenios con empresas y Proyectos Nacionales e Internacionales. Presidente Filial Mar del Plata de AATA.

Capri, Ischia, Positano, Maiori y Amalfi. Se obtiene de la maceración del flavedo de la cáscara de limón en etanol, agua y azúcar (1) y dada la simpleza del proceso se encuentra en aumento su elaboración en emprendimientos de licores artesanales a nivel de empresa y a nivel familiar. Por lo que existe gran diversidad en las características y calidades de los mismos y es difícil el control de la elaboración y el producto final (2).

La carga bacteriana de la materia prima se relaciona con la forma de cosecha. Lo indicado es la extracción de los frutos del árbol, pero en elaboraciones artesanales y familiares se ha observado la recolección del suelo. La efectividad del lavado es importante para lograr la disminución de la carga bacteriana. La extracción de la cáscara (monda) debe realizarse sin incorporar el albedo que contiene pectina y celulosa que le otorgan al licor sabor amargo y turbidez (3). La infusión de la cáscara se realiza con alcohol etílico entre 95 y 96 °GL, de 2 a 7 días (4). En esta etapa se extraen los aceites esenciales, flavonoides y otros constituyentes (5). Se prepara el almíbar con agua y azúcar y luego de enfriado se mezclan ambas soluciones obteniéndose un producto final con una graduación entre 30 y 42 °GL y 27 a 37 °BRIX de azúcar (1,2). Se filtra para permitir el paso de las sustancias esenciales que caracterizarán el aroma y sabor del producto final y se envasa en botellas color ámbar. El almacenamiento se debe efectuar a temperaturas bajo cero y en ausencia de luz para evitar la degradación de terpenos (1,6).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la calidad microbiológica de muestras de limoncello, elaboradas artesanalmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con 11 muestras de limoncello elaboradas en la provincia de Buenos Aires (Argentina). Una muestra correspondiente a elaboración industrial (A) utilizada como control, cinco de elaboración de empresa artesanal con comercialización formal (B, C, D, E y F) y cinco de elaboración artesanal-hogareña (G, H, I, J y K) envasadas en botellas de vidrio blanco transparente excepto la I (botella verde) y E (botella esmerilada).

Se extrajeron alícuotas de la superficie y el interior de las muestras. Se efectuaron diluciones (10-1, 10-2 y 10-3) para realizar recuento. Se sembró 0,1 mL en superficie en placas con agar HyL (hongos y levaduras, Lab. Britania, Buenos Aires) por triplicado. Se incubó a 25 °C, por 10 días (7).

El medio HyL se enriqueció con limoncello, utilizado en reemplazo de 66,6 % del diluyente (agua destilada) (8). Se sembró en superficie 0,1 mL de las muestras provenientes de tres diluciones (10-1, 10-2 y 10-3) y se incubó a 25 °C por diez días (7).

Posteriormente se incorporó sorbato de potasio al medio HyL-Limoncello a fin de determinar su efecto sobre la flora encontrada. Se analizó la concentración de inhibición necesaria mediante placas con agar HyL-Limoncello a las que se adicionó distintas concentraciones de sorbato de potasio (0; 0,03; 0,05; 0,1 y 0,2 %). Se preparó un inóculo a partir de los crecimientos obtenidos y 10 mL de solución salina y se sembró en superficie en las placas con agar HyL-limoncello-sorbato de potasio por triplicado, incubando diez días a 25 °C (7).

La identificación se realizó mediante la observación macroscópica y microscópica. La microscópica consistió en la observación de las características morfológicas de las colonias obtenidas a partir de la siembra realizada en los diferentes medios. La microscópica, en la observación de las características del micelio, estructuras reproductivas y ornamentales, en los extendidos realizados a partir de las colonias arriba citadas utilizando un microscopio XSB 411 *Lancet Instruments* (40X).

El grado alcohólico se determinó mediante un alcoholómetro *Gay-Lussac* (9).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La graduación alcohólica (v/v) fue de 25 % (m/m) para el limoncello industrial, de 29 a 32 % (m/m) para los artesanales y de 27 a 35 % (m/m) para los de elaboración artesanal-hogareña, respondiendo a lo requerido por el CAA (10) para licores.

Las Tablas 1 y 2 muestran una marcada diferencia en la calidad microbiológica del limoncello industrial con respecto a aquellos elaborados en forma artesanal. De acuerdo a la literatura (11), el límite permitido en los recuentos para estos licores es de 10⁴ siendo superado sólo por la muestra G, sin embargo la sola presencia de microorganismos en una muestra determina una disminución de la calidad además de un peligro potencial para la salud del consumidor.

Tabla 1. Recuento de mohos y levaduras presentes en las distintas muestras de limoncello

Muestras		Recuento		Procedencia
		Levaduras (ufc/mL)	Mohos (ufc/mL)	
A	Superficie	No se detecta	No se detecta	Industrial
	Medio	No se detecta	No se detecta	
B	Superficie	3,0 x 10 ²	5,0 x 10 ²	Artesanal
	Medio	1,0 x 10 ²	1,0 x 10 ²	
C	Superficie	No se detecta	1,0 x 10 ²	Artesanal
	Medio	3,0 x 10 ²	3,0 x 10 ²	
D	Superficie	No se detecta	No se detecta	Artesanal
	Medio	No se detecta	No se detecta	
E	Superficie	No se detecta	No se detecta	Artesanal
	Medio	No se detecta	No se detecta	
F	Superficie	No se detecta	4,0 x 10 ²	Artesanal
	Medio	No se detecta	No se detecta	
G	Superficie (*)	No se detecta	1,1x10 ⁴	Artesanal- Hogareña
	Fondo (**)	4,0 x 10 ²	4,0 x 10 ²	
H	Superficie	No se detecta	3,0 X 10 ²	Artesanal- Hogareña
	Medio	No se detecta	No se detecta	
I	Superficie	No se detecta	2,0 X 10 ²	Artesanal- Hogareña
	Medio	No se detecta	No se detecta	
J	Superficie	No se detecta	1,0 x 10 ²	Artesanal- Hogareña
	Medio	No se detecta	1,0 x 10 ²	
K	Superficie	3,0 x 10 ²	6,0 x 10 ²	Artesanal- Hogareña
	Fondo (**)	3,5 x 10 ²	7,0 x 10 ²	

Referencias: (*) menisco; (**) precipitado

Tabla 2. Género de mohos encontrados

Muestras	Mohos
B	<i>Alternaria spp.</i>
C	<i>Alternaria spp.</i> ; <i>Cladosporium spp.</i>
F	<i>Penicillium spp.</i> ; <i>Acremonium spp.</i>
G	<i>Alternaria spp.</i> ; <i>Cladosporium spp.</i> ; <i>Crysonilia spp.</i> ; <i>Moniliella spp.</i>
H	<i>Penicillium spp.</i>
I	<i>Cladosporium spp.</i> ; <i>Fusarium spp.</i>
J	<i>Cladosporium spp.</i>
K	<i>Alternaria spp.</i>

Los mohos identificados son de amplia distribución y pueden estar presentes en el suelo, semillas, frutas (12-14). *Cladosporium spp.* contiene gran cantidad de especies saprobias y otras que parasitan vegetales (15), sus esporos son los que con mayor frecuencia se encuentran suspendidos en el aire siguiendo en orden de importancia *Alternaria spp.* (16). *Alternaria spp.* puede ser aislada como contaminante de alimentos y contiene especies cosmopolitas que se encuentran en un amplio rango de materiales y productos (17,18). Como saprobias pueden deteriorar alimentos y producir compuestos biológicamente activos tal como micotoxinas (16, 19), siendo uno de los hongos más extensamente distribuidos y uno de los principales alérgenos. La fracción alérgica más importante es heterogénea y puede inducir reacciones de hipersensibilidad en concentraciones muy bajas en personas sensibilizadas (20-22).

En el caso específico de *Moniliella spp.* es de hábitat acidófilo como encurtidos y también sustancias dulces como jugos de frutas y jarabes (23,24). *Acremonium spp.* presenta distribución cosmopolita se encuentra en suelos, como parásito o saprófito de vegetales, puede producir toxinas del grupo de los tricotecenos (16).

Crysonilia spp., es reconocida por sus cadenas ramificadas de esporas, de crecimiento sumamente rápido con reproducción prolífica. Inicialmente sin color, evoluciona a un color rosado o anaranjado (15). En este caso se obtuvo coloración anaranjada. En la naturaleza sus esporas se hallan en el suelo y en la superficie de frutas y generan problemas alérgicos (21,22).

Los géneros *Penicillium spp.*; *Fusarium spp.* y *Alternaria spp.*, están dentro de los principales productores de micotoxinas, siendo *Penicillium spp.* productor de patulina y ocratoxina. *Fusarium spp.* de zearalenona y *Alternaria spp.* de fumonisinas (16,19), entre otras.

La presencia de estos hongos es indicador de una contaminación que puede ser proveniente de la materia prima y en menor grado de su incorporación durante el proceso, indicando en ambos casos que no se han cumplido las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM).

De los licores analizados sólo uno de los artesanales indica en el envase el fin de su vida útil y dos la fecha de elaboración. El desarrollo de los microorganismos comunicados podría acortar esta vida útil pues son capaces de producir el deterioro (observado como: menisco, precipitado, turbidez) de los productos que colonizan, pudiendo significar un peligro potencial para la salud de los consumidores ya que algunos de los encontrados son capaces de producir toxinas y alergias (25).

Dada la acción antimicótica del sorbato de potasio fue adicionado al medio HyL-Limoncello realizándose un análisis de concentración de inhibición a fin de determinar su efecto sobre la flora encontrada. No se obtuvo crecimiento a partir de 0,1 g/100 g de muestra, límite aceptado por las reglamentaciones (10).

Posteriormente se elaboró limoncello artesanal (G), agregando 0,1 % (m/m) de sorbato de potasio en la etapa de mezclado y luego de un mes de almacena-

miento se realizó el análisis no observándose crecimiento. La utilización de esa concentración de sorbato de potasio como sustancia inhibitoria permitiría extender su vida útil y prevenir el peligro para los consumidores.

El crecimiento de estos microorganismos provenientes fundamentalmente de la contaminación natural de la materia prima o por proceso puede prevenirse mediante la aplicación de BPM y sistema HACCP que implicaría el control de todo el proceso y también mediante la adición de sorbato de potasio. Casales (26) al analizar las características sensoriales y comerciales de estas mismas muestras determinaron que las de elaboración artesanal y hogareña poseen mayor aceptación sensorial y preferencia por el consumidor que la industrial. El precio de venta de los licores artesanales es tres veces mayor que el industrial, lo que refuerza la importancia de evitar la contaminación y crecimiento de hongos que acorten su vida útil.

CONCLUSIONES

El desarrollo de los microorganismos hallados (*Cladosporium spp.*; *Penicillium spp.*; *Fusarium spp.*; *Alternaria spp.*; *Moniliella spp.*; *Crysonilia spp.* y *Acremonium spp.*) disminuye la calidad y podría acortar la vida útil del limoncello pues son capaces de producir su deterioro e implican un peligro potencial para la salud del consumidor por su capacidad de producir toxinas y alergias.

REFERENCIAS

- 1-Cupri, M.; Costa,R.; Dugo,P. y Mondello, L. Food Chem. (Artículo en prensa. Consultado 28 de junio de 2007 en www.sciencedirect.com).
- 2-Yeannes, M; Sánchez, G; Amezttoy, I. y Casales, M. Ingeniería Alimentaria 70:122-126, 2007.
- 3-Soler, J. Reconocimiento de variedades de cítricos en campo. Valencia, Ed. Generalitat Valenciana. Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación 1999, pp 143-157.
- 4-Versari, A.; Natali, N.; Russo, M. y Antonelli A. J. Agric. Food Chem. 51(17): 4978-4983, 2003.
- 5-Del Río, J.; Fuster, M.; Gómez, P.; Porras, I.; García-Lidón, A. y Ortuño, A. Food Chem. 84 (3): 457-461, 2004.
- 6-Moreno, M.; Rodríguez, G.; Aponte, H. y Camacho, D. Rev. Fac. Agron. (LVZ), 21:285-296, 2004.
- 7-Weiser, H.; Mouuntney, G. y Gould, W. Practical Food Microbiology and Technology. Second Edition. The AVI Publishing Co., Inc. Westport, Connecticut. 1971, 97 p.
- 8-Ramírez, E.; Félix, M; Amezttoy I. y Yeannes, M. Biocell Mendoza 25 (2): 223, 2001.
- 9-AOAC. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. 15th Ed. Washington, D.C. 1990.
- 10-Código Alimentario Argentino (CAA) Cap. XIV- Bebidas Espirituosas, Alcoholes, Bebidas alcohólicas destiladas y licores, 2001, pp. 1108-1136.
- 11-Moragas, M. y De Pablo Busto, M. Recopilación de normas microbiológicas de los alimentos y asimilados y otros parámetros físico-químicos de interés sanitario. Actualizado a enero 2008. Subarea de Sanidad Alimentaria y Consumo y Departamento de Sanidad Gobierno Vasco, Bilbao, 43 p.
- 12-Frank, M; Austen, M.; Claman, K; Unanue, H. y Samters, E. Immunological diseases. 5th ed. Boston, Mass: Little, Brown & Co., 1995, 655p.
- 13-Ka, A. B. Allergy and allergic diseases. Cambridge, Mass: Blackwell 1997, 852p.
- 14-Patterson, R.; Grammer, L y Greenberger, P Allergic diseases: diagnosis and management. 5th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven, 1997, 556 p.
- 15-Samson, R.; Hoekstra, E.; Frisvad, J. y Filteborg O. Introduction to food-borne Fungi. Vol I. Fourth Edition. CBS. Baarn, Netherlands. 1995, pp. 150-159.

- 16-Carrillo, L. Los hongos de los alimentos y forrajes. Eunsa. Salta. Vol 1, 2003, pp 95-116.
- 17-Pitt, J.; y Leistner L. Toxigenic *Penicillium* species en: *Mycotoxines and Animal Foods*. Smith J.E. Hendersons R. S., Editors. CRC Press, Boca Ratón, Florida, 1991, pp 86-99.
- 18-Steyn, P.; Thiel, P. y Trinder, D. Detection and quantification of mycotoxins by chemical analysis. En: *Mycotoxines and Animal Foods*. Smith J.E. Hendersons R. S., ed. CRC Press, Boca Ratón, Florida, 1991, pp 187-213.
- 19-Middleton, E.; Reed, C.; Ellis, E.; Adkinson, N.; Yunginger, J. W. y Busse, W. W. *Allergy: principles and practice*. 5th ed. St. Louis, Mo: Mosby, 1998, pp 171-188.
- 20-Frisvad, J. C. *Applied and Environmental Microbiology* 45:68-579, 1981.
- 21-Kaplan, A. *Allergy*. 2 ed. Philadelphia, Pa: Saunders, 1997, pp 876-896.
- 22-Winck, J.; Delgado, L.; Murta, R.; López, M.; Marques, J. *Allergy*, 59 (7):739-745, 2004.
- 23-Samson, R.; Hoekstra, E.; Frisvad, J. y Filteborg O. *Introduction to food-borne Fungi*. Vol II. Fourth ed. CBS. Baarn, Netherlands. 1995, pp. 158-162.
- 24-Larsen, T. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3630-3635, 2001.
- 25-Soriano del Castillo, J. *Micotoxinas en Alimentos*. Ed. Díaz de Santos, Madrid, 2007, pp 320-386.
- 26-Casales, M.; Sánchez, G. y Yeannes, M., *Análisis sensorial descriptivo de lemoncello*. Proc. XI Congreso CYTAL. Segundo Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. Tomo Análisis sensorial. 2007. Buenos Aires, 2007.