

**Estudio de viabilidad de probióticos
Lactobacillus casei y *Lactobacillus paracasei*
y su efecto en las propiedades físico-químicas
de un salami seco**

Yanina de Jesús Pérez Cayo

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2007

ZAMORANO
CARRERA AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Estudio de viabilidad de probióticos
Lactobacillus casei y *Lactobacillus paracasei* y
su efecto en las propiedades físico-químicas de
un salami seco**

Trabajo especial presentado como requisito parcial para optar
el título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el Grado
Académico de Licenciatura.

Presentado por:

Yanina de Jesús Pérez Cayo

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

La autora concede a Zamorano permiso
para reproducir y distribuir copias de este
trabajo para fines educativos. Para otras personas
físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Yanina de Jesús Pérez Cayo

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

**Estudio de viabilidad de probióticos
Lactobacillus casei y *Lactobacillus paracasei* y
su efecto en las propiedades físico-químicas de
un salami seco**

Presentado por:

Yanina de Jesús Pérez Cayo

Aprobado:

Adela Acosta Marchetti, Dra. C.T.A.
Asesor Principal

Luis Fernando Osorio Ph.D.
Director
Carrera Agroindustria Alimentaria

Wilfredo Domínguez, M.Sc.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

Dedico mi trabajo a Dios todopoderoso porque me escucha, bendice y me colma de serenidad, valor y sabiduría, y también dedico mi trabajo a mi familia porque han estado conmigo en todo momento durante estos años de estudio, a ellos que son mi fortaleza y mi estímulo para seguir adelante en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por iluminarme día a día en la toma de decisiones, por darme fortaleza en los momentos difíciles en el transcurso de la carrera y por ayudarme a cristalizar este objetivo.

A mi familia, por creer en mí, por darme su apoyo incondicional y por los sacrificios que hicieron para que culmine esta meta, a ellos que son mi razón de ser.

A mi tíos Alfredo Cayo Cabrera y Rita Lévano Gallegos por su confianza y apoyo para emprender este desafío.

Al Ing. César Félix por haber confiado en mis capacidades para emprender este reto.

A la Dra. Adela por su paciencia, exigencia, orientación y apoyo constante en la realización de este proyecto.

Al Ing. Wilfredo Domínguez por su tiempo, orientación, guía y apoyo.

A los trabajadores de la Planta de Cárnicos, por su amable colaboración, en especial a Elio, Luis y William.

Al Dr. Juan Carlos Rosas, al Ing. Juan Xavier Elizalde y personal del laboratorio de Biotecnología y Fitomejoramiento por las facilidades y apoyo brindado en el trabajo realizado en sus instalaciones.

A los Ingenieros Rolando Pineda y Marcial Valeriano por su comprensión y apoyo para realizar este trabajo.

A todas las personas que de una u otra manera colaboraron para la realización de este objetivo.

AGRADECIMIENTOS A PATROCINADORES

A mis becarios COSUDE y Fondo dotal suizo, por brindarme la oportunidad de cumplir esta meta, por confiar en mis capacidades y por permitirme vivir una experiencia inolvidable.

RESUMEN

Pérez, Y. 2007. Estudio de viabilidad de probióticos *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei* y su efecto en las propiedades físico-químicas de un salami seco. Proyecto de Graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria, Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. 25 p.

Los alimentos probióticos son considerados alimentos funcionales ya que presentan características benéficas, además de nutritivas, al momento de consumirlos. Debido a altas concentraciones de sales y nitritos de los productos cárnicos, los probióticos no han sido ampliamente utilizados en esta industria. El principal objetivo del estudio fue evaluar la viabilidad de *Lactobacillus casei* (LC) y *Lactobacillus paracasei* (LP) en un salami y el efecto en las características físico-químicas del mismo. Con este fin se inocularon diferentes tratamientos (sólo con cultivo iniciador, sólo LC, sólo LP, cultivo iniciador más LC, cultivo iniciador más LP y la mezcla de LP y LC). Se analizó la actividad microbiológica, pH, a_w , porcentaje de ácido láctico y relación humedad/proteína del producto final. Se utilizó un Diseño de Bloques Completos al Azar (BCA) y se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con separación de medias Tukey y significancia de 0.05. La mayoría de los tratamientos con probióticos presentaron cargas logarítmicas igual o mayores a 10^6 UFC/g. Sin embargo, la mezcla de probióticos LC y LP presentó la mayor carga logarítmica final de 6.34 log UFC/g, además de mayor porcentaje de ácido láctico, menor actividad de agua y menor pH después de fermentación. Todos los tratamientos presentaron la misma relación humedad/proteína, dentro de los niveles característicos de un producto seco. Se concluye que los probióticos LC y LP son viables en la producción de un producto cárnico fermentado tipo salami y presentan un producto que cumple con las características de un salami seco y puede denominarse producto probiótico.

Palabras clave: medio selectivo, producto funcional, salami

CONTENIDO

	Portadilla.....	i
	Autoría.....	ii
	Página de firmas.....	iii
	Dedicatoria.....	iv
	Agradecimientos.....	v
	Agradecimientos a patrocinadores.....	vi
	Resumen.....	vii
	Contenido.....	viii
	Índice de cuadros.....	x
	Índice de figuras.....	xi
1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	OBJETIVOS.....	2
1.1.1	Objetivo general.....	2
1.1.2	Objetivos específicos.....	2
2.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1	PRODUCTO FUNCIONAL.....	3
2.2	ALIMENTO PROBIÓTICO.....	3
2.2.1	<i>Lactobacillus casei</i>	4
2.2.2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	4
2.3	DEFINICIÓN DEL PRODUCTO.....	4
2.4	COMPORTAMIENTO DE PROBIÓTICOS EN CÁRNICOS.....	5
2.4.1	Nitrito.....	5
2.4.2	Sal común.....	6
2.4.3	Azúcares.....	6
2.5	MICROBIOLOGÍA DE PRODUCTOS FERMENTADOS.....	6
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1	UBICACIÓN.....	7
3.2	MATERIALES.....	7
3.2.1	Materia prima.....	7
3.2.2	Equipo y suministros.....	7
3.2.3	Equipo para análisis físicos y químicos.....	8
3.2.4	Materiales para análisis microbiológicos.....	8
3.3	METODOLOGÍA PARA LA ELABORACIÓN DE SALAMI.....	8
3.3.1	Determinación de gramos de cultivo a inocular.....	8
3.3.2	Definición de la formulación.....	9
3.3.3	Procedimiento para la elaboración de salami con probióticos.....	9
3.3.3.1	Inoculación.....	11

3.3.3.2	Embutido amarrado.....	11
3.3.3.3	Fermentado.....	12
3.3.3.4	Secado.....	12
3.4	ANÁLISIS FÍSICOS Y QUÍMICOS DEL PRODUCTO.....	12
3.5	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS.....	12
3.5.1	Recuento de coliformes totales.....	12
3.5.2	Recuento de FD-DVS L. casei-01-nu-trish [®] y/o L.casei 431 [®] CRL-431 [™] ..	12
3.5.2.1	Solución BCP.....	13
3.5.2.2	Inoculación.....	13
3.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	14
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
4.1	CONTEO DE PROBIÓTICOS.....	15
4.2	CONTEO DE COLIFORMES TOTALES.....	15
4.3	ANÁLISIS DE ACTIVIDAD DE AGUA (a _w).....	16
4.4	ANÁLISIS DE pH.....	17
4.5	ANÁLISIS DE ÁCIDO LÁCTICO.....	17
4.6	ANÁLISIS DE PROTEÍNA.....	18
4.7	ANÁLISIS DE HUMEDAD.....	19
4.8	ANÁLISIS DE RELACIÓN HUMEDAD/PROTEÍNA.....	19
5.	CONCLUSIONES.....	21
6.	RECOMENDACIONES.....	22
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	23

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Microorganismos usados en productos probióticos.....	4
2.	Parámetros químicos y físicos para salami.	5
3.	Parámetros microbiológicos para salami.	6
4.	Formulación de salami	9
5.	Tratamientos aplicados	11
6.	Composición del medio selectivo para <i>Lactobacillus casei</i>	13
7.	Diseño experimental	14
8.	Conteo de probióticos <i>Lactobacillus casei</i> y <i>Lactobacillus paracasei</i>	17
9.	Conteo de coliformes totales al día 28.....	16
10.	Evaluación de actividad de agua después de secado y madurado.	16
11.	Evaluación del pH del Salami al día 0 y día 28.....	17
12.	Evaluación de ácido láctico después del secado y maduración.	18
13.	Evaluación de proteína después del secado y maduración.	18
14.	Evaluación de humedad después de secado y madurado.....	19
15.	Relación humedad/proteína de los diferentes tratamientos de salami.	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Diagrama de flujo de elaboración de salami con probióticos.....	10

1. INTRODUCCIÓN

Las tendencias de consumo de productos alimenticios están cambiando considerablemente. La salud y el bienestar se ha convertido en un aspecto de gran importancia, de modo que cada vez más los consumidores demandan alimentos para estar mejor. Dentro del mercado de la salud, los alimentos funcionales están experimentando un crecimiento muy importante.

Los probióticos son microorganismos que aumentan la funcionalidad de los alimentos ayudando al organismo a protegerse de los patógenos. Los alimentos probióticos además de aportar al cuerpo humano con los requerimientos nutricionales de carbohidratos, proteínas y vitaminas, tienen características benéficas al momento de consumirlos (Loria 2005). En la flora intestinal humana existen más de 400 especies de microorganismos que conviven en armonía sintetizando vitaminas, sustancias beneficiosas, contribuyendo a la absorción de nutrientes, favoreciendo el metabolismo calórico de la fibra, mejorando la digestibilidad, neutralizando sustancias potencialmente patogénicas. El intestino ofrece sustratos y las condiciones para su desarrollo permitiendo así que la flora lleve a cabo una mejor función intestinal. Existen muchos cultivos que se adicionan como probióticos, dentro de los cuales podemos mencionar *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri* y *bifidobacterias* (Gómez 2003).

De acuerdo a Soler (2004), en la actualidad el mercado se ha dirigido a elaborar productos lácteos fermentados probióticos como son: el yogurt tradicional, mantequilla, quesos y leches fermentadas. Sin embargo, existe una gran cantidad de productos que no son lácteos pero son fermentados, dentro de estos podemos mencionar el salami y el chorizo entre otros.

De acuerdo a Shah (2001), para desarrollar un producto probiótico, se necesitan considerar ciertas características: *Viabilidad de los microorganismos probióticos*: Para denominar que un microorganismo causa beneficios en la salud, debe estar disponibles en alta concentración alrededor de 10^6 UFC/g en el producto. Sin embargo se han encontrado factores que afectan la viabilidad del probiótico como son: la acidez de los producto, el cambio de acidez provocado durante el almacenamiento conocido como post-acidificación, el nivel de oxígeno de los productos, la permeabilidad del empaque, la sensibilidad a sustancias antimicrobianas y la falta de nutrimentos en el producto. *Propiedad de adherencia*: Los efectos de los probióticos son producidos sólo si son capaces de colonizar y

multiplicarse en el intestino, por lo que es muy importante para la selección de un microorganismo probiótico (Thomas 2005).

Según Wagner (1993), en los últimos años la industria cárnica viene experimentando unos cambios similares a los experimentados por la industria láctea, con el desarrollo de métodos y procesos cada vez más automatizados y modernos. La finalidad es poner a disposición del consumidor un producto de calidad definida en cuanto a sus características sensoriales y, sobre todo, exento de riesgos higiénico-sanitarios. Por ello, la utilización de bacterias lácticas como cultivos iniciadores y probióticos se está convirtiendo en una práctica cada vez más habitual en la elaboración de embutidos crudos curados y en otros derivados cárnicos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

- Evaluar la viabilidad de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei* y su efecto en las propiedades físico-químicas en un salami seco.

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar la viabilidad de los microorganismos probiótico después del secado y maduración del producto.
- Caracterizar los salamis por medio de análisis físicos-químicos del producto final.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUCTO FUNCIONAL

El término “alimentos funcionales” describe alimentos y bebidas con beneficios especiales para la salud más allá de la nutrición básica. Estos pueden fortalecer la salud y protegernos de enfermedades. Ciertamente todos los alimentos de una u otra forma son funcionales, por ello es difícil de determinar los beneficios que estos brindan a la salud (Larson 2002).

Debido a la popularidad de los alimentos funcionales, los científicos han identificado un pequeño número de sustancias específicas o combinaciones de sustancias que pueden reducir el riesgo de enfermedades, además de que la industria alimenticia está ansiosa por comercializar productos que ofrezcan beneficios especiales (CSPI 1998).

2.2 ALIMENTO PROBIÓTICO

De acuerdo a Nilsen y Dickson (1990), probiótico es una palabra derivada del griego que significa “para la vida”. Según estos autores la preparación de un producto que contenga gran cantidad de microorganismos específicos los cuales alteran la microflora (por implementación y colonización) en un lugar del huésped y por ello ejerce un efecto beneficioso en él. En el caso de alimentos probióticos los efectos en la salud son basados en la alteración de la flora intestinal y por ello deben sobrevivir a los ácidos gástricos del estómago (Scherezenmeir y Verse 2001).

Según Wagner (1993), todos los aislados que se identificaron fueron pertenecientes al género *Pediococcus*, lo que no es sorprendente, toda vez que estos microorganismos llegan a la mezcla cárnica durante la elaboración artesanal de los embutidos crudos curados. De acuerdo a Hammes y Bantleón (1990), aislaron una cepa de *Pediococcus acidilactici* de embutidos crudos curados, a la que denominaron *P. acidilactici*. Esta cepa produce una sustancia exocelular de gran actividad inhibidora frente a diversos microorganismos indicadores. Sin embargo existen numerosas bacterias que se han denominado probióticos por su habilidad de colonización y reproducción a nivel del intestino.

En el Cuadro 1 se enumeran las bacterias probióticas más usadas en el mundo:

Cuadro 1. Microorganismos usados en productos probióticos.

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterias</i>
<i>L.acidophilus</i>	<i>B.animalis</i>
<i>L.casei</i>	<i>B.breve</i>
<i>L.jonsonii</i>	<i>B.infantis</i>
<i>L.reuteri</i>	<i>B.longum</i>
<i>L.rhamnosus</i>	<i>B.adolescentis</i>
<i>L.paracasei</i>	<i>B.lactis</i>
<i>L.crispatus</i>	<i>B.bifidum</i>

Fuente: Short 1999.

Es importante mencionar que los probióticos son ingredientes de alimentos, no productos farmacéuticos, por lo que sus efectos son de naturaleza profiláctica, no terapéutica significando que no son curativas sino preventivas (Rowland 2002).

2.2.1 *Lactobacillus casei*

Lactobacillus casei es un bacilo corto, las colonias presentan bordes enteros, de los disacáridos prefiere la lactosa y en ausencia de azúcar puede utilizar los lactatos como fuente de carbono (Thomas 2005).

L.casei 431[®]/ CRL-431[™] es un cultivo probiótico para la aplicación de productos fermentados (Hansen 2007). Entre los beneficios que produce podemos mencionar: Protege a los bronquios contra infecciones porque favorece la inmunoresistencia. Acción anticarcinogénica no intestinal como fibrosarcom, revierte inmunosupresión causada por corticoides, protege contra infecciones de *candida albicans*, que produce infecciones urogenitales (Villalobos 2006).

2.2.2 *Lactobacillus paracasei*

Cultivo lácteo mesófilo que contiene una cepa definida de *Lactobacillus paracasei* Subs..*paracasei*. La cepa clasificada como *Lactobacillus casei*. *Lcasei*-01 es suministrada en forma de producto liofilizado (Hansen 2007). Es reconocido que los *Lactobacillus paracasei* protegen contra cuadros diarreicos causados por *Salmonella*, efecto no prolongado que requiere reestimulaciones. Factor de protección contra *E.coli*, entre otros (Gómez 2003).

2.3 DEFINICIÓN DEL PRODUCTO

El salami es uno de los productos cárnicos fermentados con larga vida de anaquel y estable microbiológicamente en condiciones normales (Soto 2004). Según Lesur (1999), el salami se puede definir como un producto procesado, crudo, embutido, elaborado con ingredientes

y aditivos de uso permitido, ahumado o no y sometido a proceso de maduración; puede ser fabricado con carne de res, carne de cerdo o una mezcla de ambas.

Para que un producto pueda ser considerado salami debe cumplir con ciertos parámetros de pH, pérdida de humedad y actividad de agua característicos para este tipo producto. Dichos rangos se detallan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Parámetros químicos y físicos para salami.

Parámetro	Embutidos fermentados madurados
Pérdida de humedad	25-50%
Actividad de agua (a_w)	0.83-0.92
pH	4.6-5.3

Fuente: ICMSF (2000)

2.4 COMPORTAMIENTO DE PROBIÓTICOS EN CÁRNICOS

Según Wagner (1993), las bacterias lácticas se desarrollan en condiciones que impiden el crecimiento de microorganismos aerobios gram-negativos como las *pseudomonas*. No requieren oxígeno para crecer, son tolerantes al CO₂, nitritos, humo y concentraciones de sal relativamente altas, además toleran valores de pH bajos. Por ello, las condiciones existentes en las carnes desecado-saladas, en las envasadas a vacío y en los productos cárnicos curados, favorecen el crecimiento de estos microorganismos. Los *Lactobacillus* son frecuentes en los embutidos curados o madurados. Las especies más frecuentemente aisladas son *E. plantarum*, *E. brevis*, *L. Jarciminis*, *E. alimentarius* y los *Lactobacillus* “atípicos” (Reuter 1995). En la moderna tecnología de los alimentos fermentados, las bacterias lácticas se utilizan como cultivos iniciadores. Esta utilización se reconoció inicialmente en los Estados Unidos cuando Jensen y Paddock en 1940 obtuvieron patentes para el uso de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* y en estos alimentos.

2.4.1 Nitrito

Según Multon (2000), el nitrito tiene efectos bacteriostáticos, especialmente ante microorganismos como *Enterobacteriaceae*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus aureus*, asimismo, tiene poca acción sobre los gérmenes lácticos, por lo que pueden multiplicarse y acidificar el medio en su presencia. Dicha acción inhibidora depende básicamente del valor de pH del medio, ya que cuanto más bajo sea el pH del medio, mayor será el efecto inhibidor del nitrito y viceversa. Otros estudios realizados con productos cárnicos formulados con nitratos o nitritos y con bacterias lácticas de origen natural o de cultivos iniciadores, han demostrado bajos niveles de nitrosaminas en dichos alimentos (Palumbo y Smith 1994).

2.4.2 Sal común

Según Lesur (1993), la sal además de ejercer un efecto potenciador del sabor, juega un papel microbicida a bajas concentraciones (1-3%), ya que reduce la actividad de agua lo suficiente como para impedir el crecimiento de muchas bacterias importantes en procesos de putrefacción.

2.4.3 Azúcares

Los azúcares aparte de dar sabor, sirven como material energético para las bacterias. Deben su acción conservadora a su capacidad de retener agua que no puede ser utilizada por los microorganismos, así como su efecto osmótico. Se emplea principalmente la sacarosa, pero puede sustituirse por maltodextrina, si se lleva a cabo un curado más corto. Asimismo, ésta influye en la promoción y estabilización del color, mejora la textura de la carne y reduce el impacto de la sal en el producto (Cabezas 2003).

2.5 MICROBIOLOGÍA DE PRODUCTOS FERMENTADOS

Para que un producto sea apto para el consumo debe de estar entre ciertos límites de poblaciones microbianas, los cuales son establecidos por instituciones gubernamentales, como en los Estados Unidos e instituciones de comercio, en el caso de Europa. Los parámetros microbiológicos que se toman como referencia para la producción de salami en Honduras, son los establecidos por SENASA (2000).

Cuadro 3. Parámetros microbiológicos para salami.

Microorganismo	UFC/g
Coliformes totales	1×10^4
Echerichia coli	1×10^3

Fuente: SENASA (2000)

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN

La elaboración del salami se realizó en la Planta de Procesamiento de Productos Cárnicos, de la EAP, Zamorano. Los análisis físicos y químicos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Análisis de Alimentos Zamorano (LAAZ), los análisis microbiológicos se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología y Fitomejoramiento, todos estos ubicados en la Escuela Agrícola Panamericana (EAP), Zamorano, Valle del Yeguaré, Departamento de Francisco Morazán, Honduras.

3.2 MATERIALES

3.2.1 Materia prima

- Carne de res 10% grasa
- Carne de cerdo 20% grasa
- Grasa dorsal de cerdo
- Sal
- Dextrosa
- Nitrito de sodio
- Especias (pimienta blanca en polvo, pimienta negra en grano, ajo, culantro, pimienta dulce, mejorana, tomillo, albahaca).
- Vino rojo
- Meat Starter Culture Bactoferm™ LHP
- Cultivos probióticos: FD-DVS L. casei-01-nu-trish®; L.casei 431®/ CRL-431™
- Fundas de colágeno

3.2.2 Equipo y suministros

- Molino
- Balanza electrónica (marca Ohaus, modelo LS2000)
- Embutidora
- Incubador (modelo 116D, serie 100, Fisher Scientific)
- Cuarto frío
- Higrómetro

- Homogenizador de muestras
- Autoclave (modelo 109-85-E, Market Force Industries Inc)
- Cámara de flujo laminar Puriffier class II (catálogo # 36209-04, Fisher Scientific).

3.2.3 Equipo para análisis físicos y químicos

- Aparato electrónico “Aqualab”.
- Potenciómetro digital Orion Research.
- Horno de convección de 105 °C.

3.2.4 Materiales para análisis microbiológicos

- Bastón
- Tubos de ensayo con 9 mL de agua de dilución (agua peptonada)
- Botellas con 90 mL de agua destilada.
- Bolsas estériles.
- Alcohol puro 95%.
- Balanza digital
- Espátula para pesar
- Platos petri
- Reactivos (cuadro 6)
- Parafilm

3.3 METODOLOGÍA PARA LA ELABORACIÓN DE SALAMI

De acuerdo a la información proporcionada por la compañía CHR HANSEN, se decidió realizar el producto mediante un proceso de inoculación directa, proporcionándole un ambiente anaerobio, se controló las temperaturas y humedades relativas durante la fermentación (30°C, 90% HR) y maduración (10°C, 70% HR).

El tiempo se determinó de acuerdo a los parámetros físicos, químicos y microbiológicos referidos en el cuadro 2. En la etapa de maduración el factor determinante fue la pérdida de peso (30% o más).

3.3.1 Determinación de gramos de Cultivo a inocular

De acuerdo a la siguiente fórmula se determinó la cantidad de cultivo a inocular, considerándose la información proporcionada de los probióticos (Hansen 2007).

$$\begin{aligned} (\text{Concentración inicial})(X \text{ gramos de cultivo}) &= (\text{Concentración final})(\text{gramos de salami}) \\ (1 \times 10^9)(X \text{ g}) &= (1 \times 10^6)(1200 \text{ g}) \\ X &= 1.2 \text{ g de cultivo} \end{aligned}$$

3.3.2 Definición de la formulación

Se utilizó la formulación de Salami de la planta de cárnicos (cuadro 4) para los diferentes tratamientos. La diferencia entre tratamientos consistió en las inoculaciones con sólo los probióticos, mezcla de estos entre sí o con el cultivo iniciador, tal y como se puede observar en el cuadro 5.

Cuadro 4. Formulación de salami.

Salami	
Ingredientes	Gramos
Carne de cerdo 20% grasa	450.00
Carne de res 10% grasa	450.00
Grasa dorsal	225.00
Sal	22.00
Azúcar	4.50
Nitrito de sodio	3.50
Pimienta blanca en polvo	2.50
Pimienta negra en grano	1.50
Ajos	1.50
Culantro y pimienta molidos	1.50
Mejorana, tomillo, albahaca	0.75
Cultivo	1.20
Vino rojo (mL)	15 mL
TOTAL	1200 g

3.3.3 Procedimiento para la elaboración de salami con probióticos

Los pasos realizados para la elaboración de salami con probióticos, se hicieron de acuerdo al flujo de procesos. La descripción de cada etapa se detalla a continuación:

Moler la carne y luego la grasa previamente congelada, molerlas con el disco de 0.32 cm. (1/8 in).

Adicionar las especies siendo las últimas la sal y pimienta negra en grano.

Agregar el vino rojo e inocular 1.2 g del cultivo iniciador o probióticos.

Embutir uniformemente.

Fermentar a 30 °C y 90% de HR por 24 horas.

Trasladar a un cuarto frío a 10°C y 70%HR.

Madurar hasta que el producto pierda del 30% o más del peso inicial.

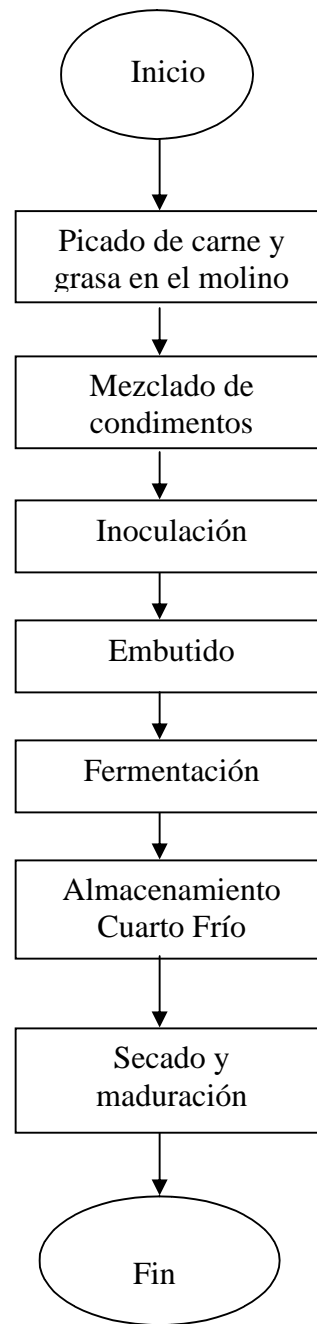


Figura 1. Diagrama de flujo de elaboración de salami con probióticos.

3.3.3.1 Inoculación

Como cultivo iniciador se utilizó Bactoferm™ LHP que es un cultivo liofilizado adaptado para la elaboración de todas las salchichas fermentadas donde se desea una acidificación relativamente pronunciada. El cultivo iniciador está compuesto por *Pediococcus sp.*

Según Wagner (1993), las cepas de *Pediococcus sp.* originan sustancias antimicrobianas exocelular, cuya producción depende del medio de cultivo, se detecta al poco tiempo de iniciarse el crecimiento microbiano y alcanza sus niveles óptimos a las 16 horas de incubación a 32 °C. La sustancia antimicrobiana fue activa frente a bacterias patógenas gram-positivas de gran interés en la industria alimentaria.

Una vez lista la masa de carne se procedió a inocular de acuerdo a los siguientes tratamientos:

Cuadro 5. Tratamientos aplicados.

Tratamiento	Cultivos
Trat.1	Cultivo iniciador Bactoferm™ LHP
Trat.2	FD-DVS L. casei-01-nu-trish®
Trat.3	L.casei 431®/ CRL-431™
Trat.4	Bactoferm™ LHP+ FD-DVS L. casei-01-nu-trish®
Trat.5	Bactoferm™ LHP+ L.casei 431®/ CRL-431™
Trat.6	FD-DVS L. casei-01-nu-trish®+ L.casei 431®/ CRL-431™

A la mezcla se agregó el cultivo iniciador, para el salami control, o el probiótico en los otros tratamientos, y en el caso de la mezcla se agregó primero el cultivo iniciador y después el probiótico. Se combinó uniformemente con la masa de carne. Se agregó 1.2 g de cultivo de acuerdo a los diferentes tratamientos. Los diferentes cultivos fueron proporcionados por CHR HANSEN, los cultivos Bactoferm™ LHP y FD-DVS L. casei-01-nu-trish® se encontraban liofilizados mantenidos a -20°C, L.casei 431®/ CRL-431™ en forma granular congelada a -40 °C.

3.3.3.2 Embutido y amarrado

El embutido se realizó con una embudidora manual. Durante el embutido se lavó y desinfectó la embudidora esto para prevenir la contaminación entre tratamientos. En el proceso de extracción, se cuidó de no dejar espacios con aire que pudiesen haber ocasionado problemas durante la maduración del producto, posteriormente, se amarró fuertemente con el hilo, para obtener un producto firme y consistente.

3.3.3.3 Fermentado

Esta fase se realizó en una incubadora a una temperatura de 30°C y 90% de humedad relativa por 24 horas.

3.3.3.4 Secado

El proceso de maduración se realizó en un cuarto frío a 10°C y una humedad relativa de 70%, se monitoreó el peso de las muestras hasta que perdieron 30% o más del peso inicial lo cual duró 28 días. Una capa de hongo blanca deseado se formó en la parte externa del salami, esto es deseable porque contribuye a la condimentación y sabor.

3.4 ANALISIS FÍSICOS Y QUÍMICOS DEL PRODUCTO

Como análisis físico se determinó la actividad de agua (a_w) a los diferentes tratamientos al finalizar el secado (día 28), utilizando el aparato electrónico “Aqualab”. Los análisis químicos de medición de pH, % ácido láctico, % proteínas y % humedad fueron practicados en el LAAZ. Los valores de pH fueron medidos el día 0 y 28 con el potenciómetro digital Orion Research. Para este análisis, fueron homogenizados 10 gramos de la muestra en 90 mL de agua destilada por dos minutos y la lectura fue realizada después de 5 minutos de estabilización (Samelis *et al.*,1998). Se determinó el % de proteínas por el método de la AOAC 960.52- Micro-Kjeldahl; el % de humedad se midió a través de un Análisis Químico Proximal en un horno de convección a 105 °C por 24 horas y el % ácido láctico se realizó con el procedimiento de la AOAC 920.124.

3.5 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

3.5.1 Recuento de coliformes totales.

Se realizó el conteo de coliformes totales utilizando el medio Violet Red Bile Agar (VRBA). Se tomaron 10 g de muestra de cada repetición al día 28 de secado del salami. Cada muestra se colocó en una bolsa estéril y se homogenizó en 90 ml. de agua peptonada. Posteriormente, se procedió a elaborar las diluciones en tubos de ensayo con 9 ml de agua peptonada, para realizar las diluciones consecutivas. Para realizar las inoculaciones en los platos petri con diluciones de 10^{-1} a 10^{-2} todas las pruebas se hicieron por doble repetición para mayor confiabilidad, se tomó 1 ml de la dilución deseada. Se procedió a la incubación a 37°C por 24 horas.

3.5.2 Recuento de FD-DVS L. casei-01-nu-trish[®] y/o L.casei 431[®]/ CRL- 431TM

Los análisis microbiológicos realizados a cada tratamiento fueron el recuento de FD-DVS L. casei-01-nu-trish[®] y/o L.casei 431[®]/ CRL- 431TM, por medio del método para enumeración de probióticos en productos fermentados en un medio selectivo esta información fue proporcionada por el boletín técnico de la compañía CHR HANSEN. El análisis de viabilidad de los probióticos se realizó el día 40 de elaboración del producto. De

acuerdo a Hansen (2007), en el medio específico aparecerán los *Lactobacillus* como colonias pequeñas de color amarillo las que se diferenciarán en el microscopio de los *Pediococcus* del cultivo iniciador que son lisas redondas y de color blanco grisáceo. Para el estudio se contabilizó sólo el conteo de los *Lactobacillus* en el medio. El cuadro 6 muestra los diferentes reactivos que se utilizaron en el medio selectivo para el conteo de los probióticos.

Cuadro 6. Composición del medio selectivo para *Lactobacillus casei*.

Nombre	Cantidad (g)/litro
Medio Básico	
Tristona	10.0
Extracto de levadura	5.0
Tween 85	1.0
K ₂ HPO ₄	2.6
Na.acetato.3H ₂ O	5.0
NaOH	2.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2
MnSO ₄ .H ₂ O	0.1
Sorbitol	20.0
Agar	13.0
Bromocresol púrpura (BCP)	2.0
Alcohol 95%	220.0
Agua destilada	780.0

3.5.2.1 Solución BCP

Se agregó 0.02 g. de bromocresol púrpura, 2.2 mL de alcohol al 95% y 7.8 mL de agua destilada (haciendo la relación a 10 mL. de lo que indica la formulación de 1000 mL).

El medio básico después del autoclave se colocó en baño maría a 50 °C y se dejó enfriar. En botellas de vidrio se agregó 100 mL de medio básico más 0.1 mL de solución BCP, se agregó 25 mL a cada plato petri y se dejó en refrigeración por 24 horas. El bromocresol púrpura da una coloración púrpura al medio lo que facilita luego el conteo de las colonias amarillas (*Lactobacillus*) que aparecen en el medio luego de la incubación.

3.5.2.2 Inoculación

Después de 24 horas y previa desinfección de la cámara laminar con alcohol al 95% se procedió a inocular los platos petri en diferentes diluciones como se detalla a continuación:

- 1) Se pesó en una bolsa estéril 10 g de muestra y se agregó 90 mL de agua peptonada (dilución 10⁻¹) y se introdujo en el stomacher.
- 2) Se realizaron diluciones consecutivas agregando 1 mL de la bolsa en 9 mL de agua peptonada en un tubo de ensayo hasta llegar a la dilución 10⁻⁵.

- 3) Se sembró mediante el método spread plate 0.1 mL de las 3 últimas diluciones de cada muestra y se puso en platos petri duplicados (total 6 platos).
- 4) Se incubó a 37°C por 3 días revisándolo todos los días.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un diseño experimental de Bloques Completos al Azar (BCA) con seis tratamientos y tres repeticiones para un total de 18 unidades experimentales. Los resultados de los análisis físico-químicos y microbiológicos se analizaron en el programa estadístico Statistical Analysis System SAS® V.9.1 por medio de un análisis de varianza (ANDEVA) con la prueba de separación de medias Tukey con significancia de $P < 0.05$.

Cuadro 7. Diseño experimental.

Trat.	Microorganismo	Bloques		
T1	Cultivo iniciador Bactoferm™ LHP	T1 B1	T1B2	T1 B3
T2	FD-DVS L. casei-01-nu-trish®	T2 B1	T2 B2	T2 B3
T3	L.casei 431®/ CRL-431™	T3 B1	T3B2	T3 B3
T4	Bactoferm™ LHP+ FD-DVS L. casei-01	T4 B1	T4 B2	T4 B3
T5	Bactoferm™ LHP+ L.casei 431®/ CRL-431™	T5 B1	T5 B2	T5 B3
T6	FD-DVS L. casei-01-nu-trish®+ L.casei 431®	T6 B1	T6 B2	T6 B3

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CONTEO DE PROBIÓTICOS

De acuerdo a los resultados obtenidos en el cuadro 8, luego de hacer el análisis de viabilidad en un medio selectivo para los probióticos *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei* en salami al día 40 de elaboración, se obtuvo que hubo diferencia significativa entre los tratamientos, siendo el tratamiento con la mezcla de ambos probióticos quien tuvo el mayor conteo siendo la carga final logarítmica de 6.34 log UFC/g, el tratamiento con la mezcla del cultivo iniciador y *Lactobacillus casei* también presentó una carga final logarítmica alta de 6.17 log UFC/g. No hubo diferencia significativa entre los demás tratamientos. Según Shah (2001), para que un alimento sea considerado como probiótico debe tener 10^6 UFC/g en el producto, por tanto todos los tratamientos cumplen con esta norma y pueden ser llamados productos probióticos. En el caso específico del *Lactobacillus casei* adicionado al cultivo iniciador aumentó significativamente ($P < 0.05$) el conteo logarítmico lo que no ocurrió de igual forma con el *Lactobacillus paracasei*. Según Soto (2004), en su experimento realizado el salami obtenido tuvo al menos 10^7 UFC/g, por lo que se pudo decir que fue viable el crecimiento del *L. acidophilus* en el salami, así mismo se pudo observar que la mezcla de microorganismos probióticos mezclados con un cultivo iniciador resultó en un mayor crecimiento.

Cuadro 8. Conteo de probióticos *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei*.

Tratamiento	log ₁₀ UFC/g de cultivo día 40
	Promedio ± DE*
Iniciador	0.00 ± 0.00 ^d
L-01	5.96 ± 0.03 ^c
CRL-431	6.03 ± 0.01 ^c
Inic.+L-01	6.05 ± 0.09 ^c
Inic.+CRL-431	6.17 ± 0.02 ^b
L-01+CRL-431	6.34 ± 0.04 ^a

a-d medias con letras distintas son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

*DE: desviación estándar.

4.2 CONTEO DE COLIFORMES TOTALES

Después de realizar el conteo de coliformes totales a los diferentes tratamientos al día 28 de realizado el producto (cuadro 9), no hubo diferencia significativa todos los tratamientos presentando conteos elevados ($P > 0.05$). De acuerdo a los parámetros establecidos en el

reglamento de Inspección de Productos Cárnicos (2000), los tratamientos estaban en el rango permitido para este tipo de productos (10000 UFC/g o 4 log UFC/g de salami). Este alto conteo de coliformes se debió a la constante manipulación para pesar el producto semanalmente por tanto se decidió no realizar el análisis sensorial.

Cuadro 9. Conteo de coliformes totales al día 28.

Tratamiento	log₁₀ UFC/g de coliformes día 28
	Promedio ± DE*
Iniciador	3.11 ± 0.04 ^a
L-01	3.12 ± 0.02 ^a
CRL-431	3.16 ± 0.02 ^a
Inic.+L-01	3.11 ± 0.03 ^a
Inic.+CRL-431	3.15 ± 0.02 ^a
L-01+CRL-431	3.10 ± 0.04 ^a

a medias con la misma letra no difieren entre sí significativamente (P>0.05).

*DE: desviación estándar.

4.3 ANÁLISIS DE ACTIVIDAD DE AGUA (a_w)

Entre los factores que interfieren en el desarrollo de los microorganismos está la actividad de agua la cual está relacionada con la estabilidad de los alimentos y consecuentemente con la determinación de la vida útil (Cichoski y Terra 2004). El tratamiento con la mezcla de los cultivos probióticos presentó la a_w más baja estadísticamente (P<0.05), seguido de los tratamientos con la mezcla del cultivo iniciador y de los probióticos. Los tratamientos presentaron a_w entre 0.83 y 0.92, siendo 0.93 el valor máximo aceptable según el Reglamento Técnico de Identidad y Calidad de Salami (Brasil 2000). Se encontró diferencia significativa entre los tratamientos como se muestra en el cuadro 10.

Cuadro 10. Evaluación de actividad de agua después de secado y madurado.

Tratamiento	a_w día 28
	Promedio ± DE*
Iniciador	0.93 ± 0.11 ^a
L-01	0.92 ± 0.01 ^b
CRL-431	0.92 ± 0.03 ^b
Inic.+L-01	0.86 ± 0.08 ^d
Inic.+CRL-431	0.88 ± 0.20 ^c
L-01+CRL-431	0.83 ± 0.04 ^e

a-e medias con letras distintas son significativamente diferentes (P<0.05).

*DE: desviación estándar.

4.4 ANÁLISIS DE PH

La reducción del pH en salamis es ocasionada por la acción de bacterias lácticas sobre los azúcares con consecuente producción de ácido láctico. Un pH de 4.9 es un valor apropiado para estos productos fermentados según Feiner (2006). El pH tomado a las 24 horas de la fermentación fue el mismo significativamente ($P < 0.05$) en todos los tratamientos menos el que tenía la mezcla de ambos probióticos ya que éste presentó un valor estadísticamente menor ($P < 0.05$) de acuerdo al cuadro 11, esto probablemente por la mayor cantidad de probióticos presentes en el producto (cuadro 8). Según Demeyer *et al.* (1993), la caída de pH durante la fermentación está determinada fundamentalmente por el ácido láctico formado a partir de los carbohidratos presentes, principalmente de la glucosa añadida. Hubo diferencia significativa entre los pHs de los tratamientos, estos resultados de pHs altos se pueden deber a una fermentación láctica no intensa (Lorenzo y Michinel 2000). De acuerdo a Feiner (2006), un producto fermentado con un pH menor a 4.5 está en un nivel aceptado por el consumidor. Según Leisner (2000), al inicio de la fermentación los *Lactobacillus* se presentan vigorosos y activos metabólicamente pero al final del proceso de maduración muchos de ellos van a disminuir la producción de ácido láctico lo que produce un aumento en el pH.

Cuadro 11. Evaluación del pH del Salami al día 0 y día 28.

Tratamiento	Ph		
	Día 0	Día 28	Diferencia
Iniciador	4.9±0.1 ^a	5.4±0.1 ^b	0.6 ^a
L-01	4.9±0.2 ^a	5.5±0.6 ^a	0.6 ^a
CRL-431	4.8±0.3 ^a	5.5±0.4 ^a	0.7 ^a
Inic.+L-01	4.8±0.1 ^a	5.3±0.2 ^c	0.5 ^a
Inic.+CRL-431	4.9±0.1 ^a	5.3±0.1 ^c	0.5 ^a
L-01+CRL-431	4.5±0.1 ^b	5.2±0.1 ^d	0.7 ^a

a-d medias con letras distintas son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Luego de 28 días de secado y maduración del producto a las condiciones de humedad y temperatura antes descritas, hubo diferencia significativa entre los tratamientos, siendo el tratamiento con la mezcla de ambos probióticos quien obtuvo el pH final más bajo estadísticamente significativo ($P < 0.05$). Según Leisner (2000), la maduración de un salami termina cuando el producto ha alcanzado un pH de 5.1 – 5.5, este pH se logró en todos los tratamientos (cuadro 11). Durante el secado, el valor del pH comienza a subir lentamente como consecuencia de los procesos que se producen, desarrollándose toda una serie de compuestos que conjuntamente con la producción de ácido láctico, van a determinar su valor final (Palumbo y Smith 1994).

4.5 ANÁLISIS DE ÁCIDO LÁCTICO

Las bacterias que se emplearon como cultivo iniciador y probiótico son productoras de ácido láctico por ello fue de gran importancia determinar cuánto aumenta el contenido de

éste en el producto. El tratamiento con la mezcla de ambos cultivos probióticos obtuvo una producción mayor de ácido láctico estadísticamente significativa ($P < 0.05$). No hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los demás tratamientos, pero se observa que hay mayor producción de ácido láctico en los tratamientos que incluyen el cultivo iniciador y los probióticos (cuadro 12). De acuerdo a Soto (2004), la mezcla de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum* tienen una producción mayor de ácido láctico así como una reducción mayor de pH, por lo que se podría decir que la mezcla de microorganismos da mejor resultado en un producto cárnico tipo salami con buen sabor y con las características de un salami. La presencia de ácido láctico en concentraciones de 1.5-2.5% confieren al salami un sabor característico (Leisner 2000).

Cuadro 12. Evaluación de ácido láctico después del secado y maduración.

Tratamiento	% Acido láctico día 28
	Promedio \pm DE*
Iniciador	1.67 \pm 0.18 ^b
L-01	1.53 \pm 0.05 ^b
CRL-431	1.51 \pm 0.04 ^b
Inic.+L-01	1.83 \pm 0.06 ^b
Inic.+CRL-431	1.85 \pm 0.22 ^b
L-01+CRL-431	2.32 \pm 0.20 ^a

a-b medias con letras distintas son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

*DE: desviación estándar.

4.6 ANÁLISIS DE PROTEÍNA

Las proteínas son constituyentes importantes de los salamis, tanto por el aspecto nutricional como por sus propiedades tecnológicas. Las proteínas son los principales componentes estructurales y funcionales de carnes procesadas (Cabezas 2003). No hubo diferencia significativa entre los tratamientos ($P > 0.05$) (cuadro 13).

Cuadro 13. Evaluación de proteína después del secado y maduración.

Tratamiento	%Proteína día 28
	Promedio \pm DE*
Iniciador	19.18 \pm 0.96 ^a
L-01	17.98 \pm 0.59 ^a
CRL-431	20.18 \pm 0.09 ^a
Inic.+L-01	19.27 \pm 0.24 ^a
Inic.+CRL-431	18.95 \pm 1.74 ^a
L-01+CRL-431	20.31 \pm 0.50 ^a

a medias con la misma letra no difieren entre sí significativamente ($P > 0.05$).

*DE: desviación estándar.

4.7 ANÁLISIS DE HUMEDAD

La reducción de humedad y consecuentemente de actividad de agua, así como el desarrollo de las propiedades organolépticas ocurren durante la etapa de maduración (Fernández y Ordoñez 2000). La disminución de la humedad depende de factores internos y externos, así como también de una fermentación láctica eficiente y del tiempo de maduración (Sanz *et al.* 2005). Hubo diferencia significativa ($P < 0.05$) en la cantidad de humedad entre los diferentes tratamientos. El tratamiento con la mezcla de ambos probióticos tuvo una humedad menor estadísticamente significativa ($P < 0.05$) y de acuerdo a los cuadros 10 y 11 tuvo menor pH y mayor producción de ácido láctico respectivamente estadísticamente significativa ($P < 0.05$), lo que produjo una fermentación láctica eficiente y por ende la disminución de la humedad de acuerdo a Sanz (2005). De acuerdo a Fernández y Ordoñez (2000), los embutidos fermentados tipo salami se caracterizan por su bajo valor de humedad y de actividad de agua.

Cuadro 14. Evaluación de humedad después de secado y madurado.

Tratamiento	% Humedad día 28
	Promedio \pm DE*
Iniciador	45.19 \pm 0.46 ^a
L-01	39.36 \pm 0.24 ^b
CRL-431	39.66 \pm 0.30 ^b
Inic.+L-01	38.68 \pm 0.08 ^b
Inic.+CRL-431	38.14 \pm 0.06 ^c
L-01+CRL-431	35.50 \pm 0.52 ^d

a-d medias con letras distintas son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

*DE: desviación estándar.

4.8 ANÁLISIS DE RELACION HUMEDAD/PROTEINA

De acuerdo a Ambrosiadis (2004), cita algunos estudios realizados donde los valores de la relación humedad/proteína son bastante variables, superiores a los encontrados en este trabajo, este autor sugiere que la relación humedad/proteína se utiliza para como un sistema de clasificación para salamis fermentados, siendo ésta una forma más de garantizar la calidad de estos productos. No hubo diferencia significativa entre los tratamientos ($P > 0.05$), (cuadro 16). Todos los tratamientos figuran bajo la categoría de salami seco, según Larson (2002), los embutidos secos (pepperoni y salami) son aquellos que han sido sometidos a temperaturas menores de 27°C, con períodos de secado entre 10 y 120 días y que se caracterizan por tener una relación de humedad/proteína entre 1.5 y 2.5%.

Cuadro 15. Relación humedad/proteína de los diferentes tratamientos de salami.

Tratamiento	Humedad/Proteína
	Promedio \pm DE*
Iniciador	1.97 \pm 0.05 ^a
L-01	2.35 \pm 0.08 ^a
CRL-431	1.92 \pm 0.18 ^a
Inic.+L-01	2.20 \pm 0.02 ^a
Inic.+CRL-431	2.10 \pm 0.03 ^a
L-01+CRL-431	1.90 \pm 0.26 ^a

a medias con la misma letra son significativamente iguales ($P > 0.05$).

*DE: desviación estándar.

5. CONCLUSIONES

- A los cuarenta días de elaboración del producto, los tratamientos con los probióticos *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei* presentaron cargas logarítmicas que les permiten denominarse probióticos.
- El tratamiento con *Lactobacillus casei* presentó cargas logarítmicas mayores en presencia de un cultivo iniciador a diferencia del tratamiento con sólo el probiótico *Lactobacillus casei*.
- La mezcla de microorganismos dan mayor resultado en un producto cárnico tipo salami. El tratamiento con la mezcla de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei* presentó la mayor carga (6.34 log UFC/g).
- La mezcla de probióticos *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei* en el salami presentaron un mayor conteo de microorganismos probióticos, menor pH, mayor producción de ácido láctico, menor a_w y menor porcentaje de humedad que los cultivos aislados o conjuntamente con un cultivo iniciador.
- Los *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei* son viables en la producción de un producto cárnico fermentado tipo salami de acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento.

6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un análisis de viabilidad de los diferentes tratamientos después de la fermentación para así determinar el comportamiento de los probióticos *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus paracasei* en los diferentes ambientes a los que se les sometió y la influencia de la temperatura y humedad relativa en su desarrollo.
- Efectuar el pesado de las muestras semanalmente con mayor control de inocuidad, utilizando guantes, mascarilla, redecilla y la balanza completamente desinfectada.
- Realizar análisis de PCR para confirmar la viabilidad de los probióticos en el salami.
- Es necesario hacer mayor investigación en la producción de productos cárnicos fermentados con probióticos ya que no existe reportada mucha información sobre esta clase de productos y es un área de la industria de alimentos hondureña no muy investigada.
- Probar otros cultivos probióticos ya que los productos funcionales son de gran interés comercial actualmente, de acuerdo a las nuevas tendencias del mercado.

7. BIBLIOGRAFÍA

Ambrosiadis, J. 2004. Physicochemical, microbiological and sensory attributes for the characterization of Greek Traditional sausages. *Meat Science* 66, 279-287.

Brasil. 2000. Ministerio de agricultura de abastecimiento. Instrucción normativa n° 22 de 31 de junio de 2000. Anexo V. Reglamento técnico de identidad y calidad de salami.

AOAC (Association of Official Chemists) (1990). Official method of analysis. 15th edn. AOAC. Arlington. VA.

Cabezas. A.. 2003. .Desarrollo de un prototipo de salami para la Planta de Cárnicos de la Zamoempresa de Lácteos y Cárnicos de Zamorano. Proyecto de tesis presentado como requisito para optar al título de Ingeniero Agrónomo Agroindustrial. Zamorano, Honduras. 28 p.

Center of Science in the Public Interest Reports. 1998. Functional Foods: Public Health Boon or 21st. Century Quackery. International Association of Consumer Food Organizations. Reino Unido.

Cichoski. A; Terra. N. 2004. Teorías dos obstáculos (Hurdle Technology) en productos cárnicos curados. *Higiene alimentaria* 18 (116/117), 33-36.

Demeyer, D.; Verplaetse, A.; Gistelinck, M. 1987. Fermented meat: An integrated process. *ICoMST* 33: 241-247.

Feiner. G. 2006. Meat products handbook. Practical science and technology. Woodhead publishing limited. 800p.

Fernández. M.; Ordoñez. J. 2000. Accelerated ripening of dry fermented sausages. *Trends in Food Science and technology* 11, 201-209.

Gómez. Y. 2003. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo (*en línea*). Consultado 17 agos. 2007. Disponible en: <http://www.gastroinf.com/PROBIOTICOS>.

Hammes. W; Bantleon, A. 1990. Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Reviews* 87, 165-174.

Hansen. C. 2007. FD-DVS L.casei-01-nu-trish. Consultado 5 set. 2007. Disponible en: http://www.chr-hansen.es/productos/bioplus_2b.html

Hansen. C. 2007. CASEI 431/CRL-43. Consultado 9 set. 2007. Disponible en: www.chr-hansen.com/probiotics/documentation/l_casei_431crl431.html .

ICMSF. 2000. Microorganisms in foods. 6 ed. Edit. Aspen Publisher Inc. Meryland. 615p.

Larson, R. 2002. “Complete Food and Nutrition Guide” Jhon Wiley and Sons, Inc. 2a Edición. New Jersey, USA.

Leisner, G. 2000. Shelf-life evaluation of foods. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. Second Edition.

Lesur, L. 1999. Salchichonería: una guía paso a paso. Edit. Trillas. México. 143 p.

Lorenzo. J; Michinel. M. 2000. Biochemical characteristics of two spanish tradicional dry-cured sausage varieties: androlla and botillo, Journal of food composition and analysis 13, 809-817.

Loria, R. 2005. Probióticos: efectos e implicaciones en la fisiología de la nutrición (*en línea*). Consultado 17 agos. 2007. Disponible en: <http://www.nutrar.com/detalle.asp?ID=2358>.

Multon, J. 2000. Aditivos y auxiliares de fabricación en la industria agroalimentaria. 2 ed. Edit. Acribia. España. 795p.

Nilsen, J.; Dickson, J. 1990. Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus* produced by *Pediococcus acidilactic* to inhibit *Lysteria monocytogenes* associated with fresh meta. Appl. Environ. Microbial., 56:2142-2145.

Palumbo, S; Smith, J. 1994. Investigations on the posible ocurrente of nitrosamines in Lebanon bologna J. Food. Sci. 39:1257-1258.

Reuter, G. 1995. Versuche zur rohwurstreifung mit *Lactobacillen*- und Mikrokokkenstarterkulturen. Fleischwirtsch. 52: 465-468, 471-473.

Rowland, I. 2002 “Alimentos funcionales. Nuevas tendencias” .Alimentos Funcionales Probióticos. R.M. Ortega, A.Marcos, J.Aranceta, J.A.Mateos, A.M. Requejo, L. Serra. Editores. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.

Samelis. J. 1988. Stability and safety of traditional Greek salami –microbiological ecology study. International Journal of Food Microbiology 44, 69-82.

Sanz. Y; Flores. J. 2005. Effect of pre-ripening microbial and chemical changes in dry fermented sausages. Food Micrbiology 14, 575-582.

Schrezenmeir, J; Verse, M. 2001. "Probiotics, prebiotics and synbiotics-approaching a definition" Am.J.Clin.Nutr.73:361S-364S.

Senasa. 2000. Reglamento de Inspección de carnes y productos cárnicos (*en línea*). Consultado 10 oct. 2007. Disponible en: http://www.senasa-sag.gob.hn/index.php?option=com_content&task=view&id=61&Itemid=62.

Shah, N. 2001. "Functional Foods from Probiotics and Prebiotics" Food technology 55 (11):46-53.

Shortt, C. 1999. "The Probiotic Century: Historical and Current Perspectives". Trens in Food Sci. and Technol. 10:411-417

Soler, E. 2004. Probióticos (*en línea*). Consultado 17 oct. 2006. Diponible en: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/soto_d_ri/capitulo1.pdf

Soto, R. 2004. Viabilidad de un microorganismo probiótico en un producto cárnico fermentado. Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al título de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de las Américas- Puebla, México, 45 pp. Disponible en: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/soto_d_ri/capitulo_2.html.

Thomas, D. 2005. Efecto de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus reuteri* en las propiedades físico-químicas y sensoriales del yogur. Proyecto especial presentado como requisito para optar al título de Ingeniero Agrónomo Agroindustrial en el grado académico de licenciatura. Zamorano, Honduras, 38 p.

Villalobos, C. 2006. Los probióticos del Yogurt Dos Pinos. Consultado: 09 set. 2007. Disponible: www.dospinos.com/images/dospinos/principal/LOS_PROBIOTICOS_DEL_YOGURT_DP_2.pdf

Wagner, L. 1993. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus sp* de origen cárnico. Consultado: 09 set. 2007. Disponible en: www.ucm.es/BUCM/tesis/19911996/D/2/D2016101.pdf.