

**Evaluación de cambios microbiológicos, pH,
actividad de agua y color de tallarines
instantáneos con vegetales y sabor a pollo
bajo temperatura de deterioro acelerado**

Axel Ramiro Morales Calel

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA

**Evaluación de cambios microbiológicos, pH,
actividad de agua y color de tallarines
instantáneos con vegetales y sabor a pollo
bajo temperatura de deterioro acelerado**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el Grado
Académico de Licenciatura.

Presentado por

Axel Ramiro Morales Calel

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2007

El autor 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.

Axel Ramiro Morales Calel

Honduras
Diciembre, 2007

**Evaluación de cambios microbiológicos, pH, actividad de agua
y color de tallarines instantáneos con vegetales y sabor a pollo
bajo temperatura de deterioro acelerado**

Presentado por

Axel Ramiro Morales Calel

Aprobado:

Wilfredo Domínguez, M.Sc.
Asesor Principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Carrera Agroindustria Alimentaria

Francisco Bueso, Ph.D.
Asesor

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

Edgar Ugarte, M.Sc.
Asesor

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

DEDICATORIA

A Dios Omnipotente, por darme vida y llenarme de fuerzas para culminar este proyecto de investigación.

A mi amado e inolvidable papá (Q.E.P.D.), quien en vida fue para mi un soporte y una protección y ahora bajo el resguardo de Dios Todopoderoso es infinita su compañía.

A mi preciosa y amorosa mamá, por darme cariño, apoyo, consejos y por ser valiente y seguir adelante en esta vida.

A mis hermanas y hermanos: Lisuly, Marisol, Marvin, Julio, Enrique y en especial a mi hermana Pascuala, por ser un pilar importante en mi familia, mujer valiente a quien debo gran parte de mis éxitos obtenidos.

A mis amigos y personas que siempre estuvieron conmigo en las buenas y en las malas, y que mediante su apoyo incondicional tengo la oportunidad de escribir estas líneas.

A mi muy recordado primo Oscar (Q.E.P.D.), por haber sido parte importante de mi niñez y juventud, Dios lo tenga en su presencia.

AGRADECIMIENTOS

Al “Ajaw”, Dios Altísimo, por darme entendimiento y sabiduría para lograr otra meta más en mi vida académica.

A mi familia, por su apoyo anímico, moral, material y económico a lo largo de estos cuatro años de estudio.

A Zamorano “El Alma Mater” y Carrera de Agroindustria, que mediante los profesores y trabajadores de campo, hemos recibido conocimientos y enseñanzas que enmarcan nuestra vida profesional y social.

A mis asesores Wilfredo Domínguez, Edgar Ugarte y Francisco J. Bueso, por guiarme en la realización de este proyecto.

A mis grandes amistades, aquellas personas que me tendieron la mano sin esperar nada a cambio, que me ayudaron a superar los momentos más difíciles de mi vida en Zamorano y con quienes compartí gratos momentos, Dios los bendiga.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

Agradezco a mis padres, hermanos, hermanas y en especial a mi hermana Pascuala, por los sacrificios realizados para contribuir con el financiamiento de mis estudios y de toda mi formación profesional.

A Fundación Kellogg y Fondo Dotal Suizo, por confiar en mi persona y concederme la beca de estudios con la cual he logrado culminar mi preparación académica.

RESUMEN

Morales, A. 2007. Evaluación de cambios microbiológicos, pH, actividad de agua y color de tallarines instantáneos con vegetales y sabor a pollo bajo temperatura de deterioro acelerado. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria, Zamorano, Honduras. 26p.

Para determinar la vida de anaquel de productos alimenticios es necesario evaluar cambios en sus características físico-químicas y microbiológicas durante varios meses. La obtención de resultados rápidos se da mediante pruebas aceleradas que consisten en modificar uno o más de los factores responsables del deterioro del alimento. En estas pruebas aceleradas pueden ocurrir reacciones que no ocurrirían en condiciones normales. El objetivo de este estudio fue evaluar el crecimiento de microorganismos indicadores de calidad bajo el efecto de dos temperaturas (25 y 50°C), a través del tiempo (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 32 y 40 días). Se estudiaron cambios en pH, actividad de agua y color. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo. Se inocularon coliformes aislados de medio VRBA. Se colectaron tres muestras cada 4 días para el tratamiento de 50°C y cada 8 días para el tratamiento de 25°C (5 mediciones por tratamiento). Se analizaron los datos con el paquete estadístico SAS[®] con un nivel de significancia de $P < 0.05$. Mediante ANDEVA y separación de medias Tukey se encontraron reducciones estadísticamente significativas en el conteo de microorganismos, actividad de agua y pH en ambas temperaturas a través del tiempo, no hubo diferencia estadística significativa para los parámetros de color. Se encontraron correlaciones altas positivas entre crecimiento de microorganismos y valores de actividad de agua. No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos para los conteos de microorganismos a los 8 y 16 días de iniciado el experimento.

Palabras Clave: aerobios mesófilos, coliformes totales, mohos y levaduras, vida de anaquel.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Autoría.....	ii
Página de firmas.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Agradecimiento a patrocinadores.....	vi
Resumen.....	vii
Contenido.....	viii
Índice de Cuadros.....	x
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Anexos.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVOS.....	2
1.1.1 Objetivo general.....	2
1.1.2 Objetivos específicos.....	2
2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 GENERALIDADES SOBRE SOPAS INSTÁNTANEAS.....	3
2.2 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS.....	3
2.3 MICROORGANISMOS INDICADORES DE CALIDAD DE ALIMENTOS.....	4
2.3.1 Coliformes totales.....	4
2.3.2 Aerobios mesófilos totales.....	5
2.4 CICLO DE CRECIMIENTO MICROBIANO.....	5
2.5 FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO MICROBIANO.....	6
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
3.1 RECURSOS TÉCNICOS.....	8
3.1.1 Ubicación del estudio.....	8
3.1.2 Equipos y materiales de laboratorio.....	8
3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	9
3.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	9
3.4 TOMA DE MUESTRAS.....	10
3.5 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	11
3.6 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS.....	11
3.6.1 Color.....	11
3.6.2 Actividad de Agua (a_w).....	11
3.6.3 pH.....	11

4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
4.1	SOPAS INSTANTÁNEAS SUJETAS A 50°C.....	12
4.2	SOPAS INSTANTÁNEAS SUJETAS A 25°C.....	14
4.3	EFECTO DE LA TEMPERATURA.....	15
5	CONCLUSIONES	18
6	RECOMENDACIONES	19
7	BIBLIOGRAFÍA	20
8	ANEXO	22

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Resumen de resultados microbiológicos, físicos y químicos de muestras de sopa instantáneas a 50°C.....	12
2.	Análisis de correlación entre pH, a_w y el crecimiento microbiano a 50°C.....	13
3.	Actividad de agua como variable de predicción de crecimiento de microorganismos a 50°C.....	13
4.	Resumen de resultados microbiológicos, físicos y químicos de muestras de sopa instantánea a 25°C.....	14
5.	Análisis de correlación entre pH, a_w y el crecimiento microbiano a 25°C.....	15
6.	Actividad de agua como variable de predicción de crecimiento de microorganismos a 25°C.....	15
7.	Efecto de la temperatura sobre características microbiológicas y físico-químicas de sopas instantáneas.....	16

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Diagrama de toma de muestras a través del tiempo.....	10
2.	Crecimiento de microorganismos y comportamiento de a_w a 25 (T25) y 50°C (T50) a través del tiempo.....	17

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1.	Procedimiento de cálculos estándar en placa para la enumeración de microorganismos.....	23
2.	Análisis de actividad de agua con AquaLab	24
3.	Análisis de color con colorímetro Hunter L*a*b.....	25
4.	Actividad de agua y crecimiento de microorganismos.....	26

1. INTRODUCCIÓN

La vida de anaquel de un producto alimenticio se define como el tiempo máximo recomendado para su consumo humano, porque después de este período cambia sus características físicas, químicas, microbiológicas y sensoriales, que suelen ser dañinos para la salud del ser humano (Food Processing Technology, 2006). Para algunos productos alimenticios, determinar la vida de anaquel resulta en tenerlos bajo estudio varios meses, razón por la cual se utilizan pruebas aceleradas adecuadas para obtener resultados rápidos (Kuntz, 1996). En una prueba acelerada de anaquel se modifica uno o más de los factores responsables del deterioro del alimento como lo son la temperatura, la humedad, la luz y el oxígeno. Se debe tomar en cuenta que en las pruebas aceleradas de anaquel pueden ocurrir reacciones que no ocurren en condiciones normales, tal como la desnaturalización de proteínas a altas temperaturas, también el efecto de la alta temperatura sobre la permeabilidad del empaque puede acelerar el deterioro del producto (Kuntz, 1996).

En estas pruebas aceleradas de anaquel es importante considerar que todos los microorganismos tienen una temperatura óptima, mínima y máxima de crecimiento, esto significa que a determinada temperatura la velocidad de duplicación (o la velocidad de crecimiento poblacional) es mayor. La temperatura afecta la estabilidad de las proteínas celulares porque induce cambios conformacionales que alteran la actividad biológica de estos compuestos, especialmente la de enzimas (Medina, 2005).

Los microorganismos que deterioran los alimentos están en función de las condiciones del medio ambiente que los rodea, y puede ser considerablemente influenciado por el pH y el contenido de humedad del alimento (actividad de agua). Adicionalmente, la velocidad del crecimiento de los microorganismos responsables del deterioro depende de la temperatura, de la humedad relativa atmosférica y de la composición de la atmósfera, especialmente del contenido de dióxido de carbono y oxígeno (Salas, SF).

Las pruebas aceleradas han sido muy útiles en la industria de alimentos para determinar la estabilidad en anaquel de productos que al evaluarlos en condiciones ambientales llevaría mucho tiempo. Se ha encontrado información sobre el uso de este método en pruebas de anaquel para sopa de arroz instantáneo con pedazos de carne y vegetales, alimentos vegetales listos para comer empacados en contenedores plásticos autoclavables.

En este estudio se pretendió observar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de microorganismos en el alimento bajo estudio y analizar su relación con los cambios físicos y químicos. La principal limitante para su realización fue la disponibilidad de material y equipo adecuado para mantener condiciones de temperatura y humedad constantes a lo largo del experimento.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Evaluar los cambios microbiológicos, pH, actividad de agua y color de tallarines instantáneos con vegetales y sabor a pollo bajo temperatura de deterioro acelerado.

1.1.2 Objetivos específicos

- Cuantificar coliformes totales, aerobios mesófilos, hongos y levaduras en las muestras de sopa instantánea a 25 y 50°C.
- Evaluar los cambios físicos y químicos en el alimento a través del tiempo para cada temperatura.
- Analizar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de microorganismos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES SOBRE SOPAS INSTÁNTANEAS (INSTANT NOODLES)

Varios tipos de tallarines son producidos a través del mundo. Basado en los ingredientes secos utilizados, los tallarines pueden ser clasificados en tallarines de trigo, tallarines de trigo sarraceno, tallarines de gomas o almidón y tallarines de arroz. Los tallarines coreanos o japoneses son producidos con harina de trigo común, sal y agua. Los tallarines chinos son hechos con harina de trigo común y contienen una sal alcalina (carbonato de sodio y carbonato de potasio) en lugar de bastante cloruro de sodio. El color amarillo de los tallarines chinos es debido al desarrollo de un color amarillento de los flavones bajo las condiciones alcalinas del alimento (Kruger *et al.*, 1998).

La diversidad de tallarines esta dada principalmente por el contenido de humedad y el grado de precocimiento. Tallarines frescos (crudo) contienen alrededor de 35% de humedad (BH), tallarines húmedos cocidos antes de mercadeo alrededor de 52%, y tallarines secos alrededor de 10%. Los tallarines instantáneos son cocidos al vapor y después secados o freídos en grasa, y estos contienen cerca de 8% de humedad. Tallarines fritos contienen cerca de 20% de lípidos. Dependiendo del tipo de álcali utilizado en la manufactura de los tallarines, el pH oscila entre los valores de 6.7 y 10.4 (Kruger *et al.*, 1998).

2.2 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR LOS ALIMENTOS

Las bacterias son procariotes y se dividen en eubacterias (bacterias verdaderas) y organismos *Archaea* (antes “arqueobacterias”), de acuerdo con los análisis rRNA S16 y estudios detallados de la composición y metabolismo celulares. Hay pocos organismos *Archaea* de interés en la industria alimentaria ya que la mayoría son eubacterias. En general, el tamaño de una bacteria con forma de bastón (bacilo) es de unos 2µm x 1 µm x 1µm. Aunque sean muy pequeñas, 500 células de *Listeria monocytogenes* pueden constituir la dosis infectiva necesaria para producir el aborto de una mujer gestante. Las bacterias patógenas corrientes transmitidas por los alimentos, como especies de *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Campylobacter jejuni*, son eubacterias que crecen a la temperatura corporal (37°) y atacando a las células humanas originan síntomas de toxiinfecciones alimentarias como diarrea y vómitos (Forsythe, 2000).

En sopas instantáneas tenemos como patógeno más serio a *Staphylococcus aureus*, el cual puede producir enterotoxinas indestructibles al secado o cocción, y puede permanecer en el empaque por más de un año. Los tiempos y temperaturas necesarias para destruir a *S. aureus* son: 45min por 60-61°C, 10min por 65-66°C ó 2min por 71-73°C (Kruger *et al.*, 1998).

2.3 MICROORGANISMOS INDICADORES DE CALIDAD DE ALIMENTOS

El recuento de bacterias, mohos y levaduras reflejan la calidad sanitaria de un alimento, las condiciones de manipulación, las condiciones higiénicas de la materia prima. Un recuento bajo de aerobios mesófilos no implica o no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas, de la misma manera un recuento elevado no significa presencia de flora patógena. Ahora bien, salvo en alimentos obtenidos por fermentación, no son recomendables recuentos elevados (Eskin y Robinson, 2001).

2.3.1 Coliformes totales

Coliforme significa con forma de *coli*, refiriéndose a la bacteria principal del grupo, la *Escherichia coli*, descubierta por el bacteriólogo alemán Theodor von Escherich en 1860. El grupo coliformes agrupa a todas las bacterias entéricas que se caracterizan por tener las siguientes propiedades bioquímicas: ser aerobias o anaerobias facultativas; ser bacilos Gram negativos; ser oxidasa negativos; no ser esporógenas; y fermentar la lactosa a 35°C en 48 horas, produciendo ácido láctico y gas (Wikipedia, 2007). El grupo coliforme comprende especies de los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* y en él se incluye a *E. coli* (Forsythe, 2000).

En la higiene de alimentos los coliformes no se consideran indicadores de contaminación fecal sino solamente indicadores de calidad. Los coliformes totales se usan para evaluar la calidad de la leche pasteurizada, leche en polvo, helados, pastas frescas, fórmulas para lactantes, fideos y cereales para el desayuno. Los coliformes fecales se usan para evaluar los mariscos frescos. Por último, la *E. coli* se usa como indicador en quesos frescos, quesillos, cereales para el desayuno, masas con relleno, alimentos infantiles, cecinas cocidas y verduras frescas (Wikipedia, 2007).

Así como otras bacterias Gram-negativas no patogénicas, los coliformes crecen bien en varios tipos de medios y en varios alimentos. Se ha reportado que pueden crecer a tan bajas temperaturas como -2°C y tan altas como 50°C. En alimentos es poco o muy bajo a 5°C, además muchos autores han reportado el crecimiento coliformes a 3-6°C. Se ha reportado también el crecimiento de coliformes en el rango de pH de 4.4-9.0 (Jay, 1997).

2.3.2 Aerobios mesófilos totales

Los microorganismos aerobios mesófilos son la flora total compuesta por bacterias, hongos filamentosos y levaduras, aerobios estrictos o facultativos que presentan unas características térmicas intermedias. Con este análisis se refleja la calidad sanitaria e higiénica de la elaboración del alimento. Altos recuentos no son aconsejables salvo en el caso de los productos fermentados. Tasas de 10^6 ó 10^7 gérmenes/g indican descomposición del producto (Ikerlarre, 2000).

Los mohos tienen la capacidad de adaptarse a condiciones del entorno que no todos los microorganismos son capaces de tolerar, como un nivel de acidez o alcalinidad en un rango mayor que las bacterias. Debido a que viven desde 2 hasta un valor de 9 de pH. Su pH óptimo es aproximadamente 5.6, valor que no todas las especies bacterianas soportan (Franco, 2007).

Según Tortajada *et al.* (2001), las micotoxinas son sustancias nocivas para la salud, generadas por el crecimiento de hongos que contaminan los alimentos, la presencia de una micotoxina implica la posible existencia de otras toxinas, debido a que un solo hongo produce diferentes micotoxinas.

Las levaduras son hongos, en general, se distinguen del resto de hongos, debido a que normalmente son unicelulares, pero se distinguen de las algas, debido a que no realizan el proceso de fotosíntesis y se distinguen de los protozoarios, porque su pared celular es rígida. Su forma de reproducción predominante es la gemación (Franco, 2007).

El recuento de aerobios mesófilos en alimentos es uno de los métodos más utilizados como indicadores microbiológicos de calidad. Se aplica a todos los alimentos con excepción de los productos fermentados o madurados tales como queso, ciertos tipos de embutidos y yogurt (ISPCH, 2000).

2.4 CICLO DE CRECIMIENTO MICROBIANO

El crecimiento microbiano puede ser definido como el incremento ordenado de todos los constituyentes celulares que resulta de los procesos de biosíntesis y generación de energía. El crecimiento puede referirse al incremento en masa de una sola célula o el incremento del tamaño de una población celular (Microbiology Procedure, 2007).

Según Forsythe (2000), el ciclo de crecimiento microbiano consta de seis fases:

- (1) Fase de latencia: Las bacterias no se multiplican pero sintetizan enzimas apropiadas para su entorno o medio ambiente. Cuando una población microbiana es inoculada en medio fresco, el crecimiento generalmente no inicia de inmediato sino después de un cierto tiempo.
- (2) Fase de aceleración: Se multiplica una proporción creciente de bacterias.

- (3) Fase exponencial o logarítmica: La población bacteriana se multiplica por duplicación (1-2-4-8-16-32-64, etc.). El número de bacterias se multiplica a tal velocidad que para representar su crecimiento es mejor utilizar valores exponenciales (logaritmos).
- (4) Fase de desaceleración: Una proporción creciente de células bacterianas ya no se multiplica.
- (5) Fase estacionaria: La velocidad de crecimiento es igual a la de muerte lo que determina que en todo momento haya el mismo número de bacterias. La muerte se debe al agotamiento de los nutrientes, a la acumulación de productos finales tóxicos y/o a cambios del medio, como modificaciones del pH. La duración de la fase estacionaria depende de diversos factores como las condiciones de los microorganismos y del medio (temperatura, etc.). Debido a las condiciones estresantes las bacterias esporógenas producen esporas.
- (6) Fase de muerte: El número de bacterias que mueren es mayor que el de las que se reproducen. Las esporógenas, sobreviven más tiempo que las que no producen esporas.

La duración de cada fase depende del microorganismo y de las condiciones ambientales en que crece, temperatura, pH y actividad de agua (Forsythe, 2000). Las bacterias no pueden crecer sin límite sin agotar los nutrientes disponibles y sin crear productos tóxicos (Medina, 2005)

2.5 FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO MICROBIANO

Químicamente el alimento es un sustrato complejo por lo que es difícil predecir cuándo y cómo crecerán microorganismos en un producto alimenticio determinado. La mayoría de los alimentos contienen suficientes nutrientes para permitir el crecimiento microbiano. Son muchos los factores que previenen o limitan el crecimiento de los microorganismos en los alimentos, siendo los más importantes la a_w , el pH y la temperatura (Forsythe, 2000).

El crecimiento microbiológico requiere un mínimo de a_w , en adición con un pH óptimo, temperatura y otros factores que pueden influenciar el crecimiento de microorganismos. La actividad de agua es considerada como uno de los varios factores primordiales que pueden ser modificados para proveer estabilidad e inocuidad en los alimentos. El requerimiento mínimo para el crecimiento microbiano es a_w 0.62 el cual permite el crecimiento de levaduras xerofílicas. Un incremento de a_w permite el crecimiento de mohos y otras levaduras, finalmente el crecimiento bacteriano a una alta actividad de agua. El valor de a_w más importante para la inocuidad de productos alimenticios es probablemente 0.86 el cual permite el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, un patógeno bien conocido (Eskin y Robinson, 2001).

El intervalo de pH de un microorganismo se define como el comprendido entre el valor mínimo (en el límite ácido de escala) y el valor máximo (en el extremo básico de la escala). Hay un pH óptimo para cada microorganismo, al igual que la temperatura, al que su crecimiento es máximo. A medida que el pH se separa del óptimo en ambas direcciones el crecimiento microbiano se ve limitado. Los cambios de pH que con el tiempo sufre un alimento reflejan que hay actividad microbiana. Al principio un alimento puede tener un pH que no permita el crecimiento bacteriano pero a consecuencia del metabolismo de otros microorganismos (levaduras y mohos) se originan cambios de pH que permiten dicho crecimiento (Forsythe, 2000).

La temperatura ambiental es uno de los factores más importantes que afecta la tasa de crecimiento de los microbios. Hay una temperatura mínima, debajo del cual no ocurre crecimiento. En la medida que la temperatura sea elevada, la tasa de crecimiento también incrementa, esto es de acuerdo con las leyes que gobiernan el efecto de la temperatura sobre las reacciones químicas que aceleran el crecimiento. La mayoría de microorganismos tienen un crecimiento óptimo entre 20 y 40°C y son llamados mesófilos (Microbiology Procedure, 2007).

Las temperaturas superiores a las de crecimiento óptimo producen la muerte de los microorganismos o lesiones subletales. Las células lesionadas pueden permanecer viables, pero son incapaces de multiplicarse hasta que la lesión haya sido reparada (UNAVARRA, 2007). Ertola (2000) menciona que las altas temperaturas inactivan las enzimas que catalizan las reacciones bioquímicas en el metabolismo de los microorganismos.

Según Cojulún (2007), el rango de temperatura utilizada en estudios acelerados de vida de anaquel para productos alimenticios que se pueden almacenar a temperatura ambiente, es de 30 a 45°C. Las temperaturas de almacenamiento a seleccionar deben favorecer la cinética del crecimiento microbiano, pero la alteración de un parámetro externo puede dar una representación falsa de las condiciones normales de almacenamiento. La población microbiana potencialmente problemática puede no estar acondicionada para desarrollarse en estos ambientes alterados. Adicionalmente puede perderse una cascada de reacciones a baja temperatura (RHMTHEC, 2003).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 RECURSOS TÉCNICOS

3.1.1 Ubicación del estudio

El estudio se realizó en los laboratorios de Microbiología y Análisis de Alimentos, Carrera de Agroindustria, Zamorano, localizado en el departamento de Francisco Morazán, kilómetro 30 camino a Danlí, al este de Tegucigalpa, Honduras.

3.1.2 Equipos y materiales de laboratorio

Los equipos y materiales utilizados en la parte experimental del proyecto fueron proporcionados por los laboratorios de microbiología y análisis de alimentos.

Equipo

- Autoclave (Market Forge Industries Inc. Everett, MA 02149, Modelo STMEL, Serie No. 206729).
- Balanzas de precisión (Mettler, Toledo. AE 200-S SNR J87644 / Acculab VIC-711).
- Baño María (Water Bath, Precision. Serie No. 699121706).
- Cámara de flujo laminar (LABCONCO. Catalogo No. 36209-04 Y. Serie No. 409576).
- Homogenizador de muestras (Stomacher, CE. Nr 2588/401, Hz 60. CE 2000).
- Incubadoras (Isotemp Incubator, Fisher Scientific. Modelo No. 525D, Serie No. 50600190 / Isotemp Incubator, FISHER. Modelo No. 116D, Serie No. 292).
- Agitador (Stir-heat Machine, Isotemp Fisher Scientific. Serie No. 508N2083).
- “Aqualab” Decagon Devices, Inc. Serie No. 0101875.
- “Colorflex” Hunter L*a*b. Modelo 45/0, Serie No. CX0687.
- Potenciómetro (Digital Ionalyzer. Modelo 701^a, S/N 57288).

Materiales

- Sopas instantáneas “Jovi’s” (Tallarines y vegetales con Sabor a Pollo) de la Corporación Dinant.
- Bolsas estériles para Stomacher y bolsas Ziploc (Ziploc® Snack bags, Johnson & Son, Inc. 16.5cm x 8.2cm).
- Cristalería estéril: platos Petri, Erlenmeyers, beakers, frascos de dilución, atomizador y tubos de ensayo.
- Termómetros.
- Solución diluyente (“Difco, Bacto Peptone” al 0.1% en agua destilada).
- Solución de coliformes.
- Medios de Cultivo “Cole-Parmer®”: “Standard Methods Agar” PCA y “Potato Dextrose Agar” PDA; “Difco, Violet Red Bile Agar” VRBA.
- Guantes, pinzas, cuchillos y cucharas estériles.

3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Considerando que las condiciones de laboratorio son uniformes, se empleó un modelo completamente al azar con tres repeticiones por día de muestreo y con 5 mediciones a través del tiempo (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 32 y 40 días), buscando evaluar el efecto de los niveles del factor temperatura sobre las variables objeto de estudio y así también analizar las distintas interacciones que ocurren entre ellos.

Los datos recolectados fueron procesados mediante el paquete estadístico SAS® (Statistical Analysis System) versión 9.1. Se aplicaron análisis de varianza (ANDEVA) de medidas repetidas en el tiempo, separación de medias Tukey, correlaciones y regresiones entre las variables medidas para establecer relaciones e interacciones entre estas, utilizando un nivel de significancia $P < 0.05$, sobre la cual se hicieron las inferencias estadísticas correspondientes.

Población de inferencia: Sopas instantáneas Jovi’s.

Unidad Experimental: Muestras de sopa instantánea separadas en bolsas “Ziploc”.

Variables respuesta: conteo de coliformes totales, aerobios mesófilos, mohos y levaduras, pH, valores de color L^* a^* b^* y actividad de agua (a_w).

Tratamientos: temperatura de 25 y 50°C.

3.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se estudiaron 33 muestras de sopas instantáneas “Jovi’s” (Tallarines y vegetales con sabor a pollo) de la Corporación Dinant, Lote 05020137 elaborado el 05/02/07 con fecha de vencimiento 05/02/08 y puesto bajo estudio el 15/05/07. Se compraron 24 unidades (64g)

de sopas instantáneas y se homogenizaron manualmente a la cual se inoculó el cultivo de coliformes.

Se priorizó la inoculación de coliformes considerando que por ser un producto terminado tendría poca o ninguna presencia de estos microorganismos. El cultivo de coliformes se obtuvo mediante aislamiento en medio VRBA, cabe mencionar que no se consideró como un cultivo totalmente puro (solo con colonias de coliformes) debido al método utilizado, por lo tanto se tomó como referencia el conteo inicial para todos los microorganismos.

En la cámara de flujo laminar se procedió a inocular el cultivo de coliformes mediante atomización, mezclando a la vez para obtener un material experimental uniforme, utilizando en total 85ml del cultivo. Se depositó aproximadamente 45g de sopa instantánea inoculada con microorganismos en bolsas “Ziploc” y se ubicaron en incubadoras a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $50\pm 2^{\circ}\text{C}$ con humedad relativa que fluctuaron en 43 y 26% respectivamente.

3.4 TOMA DE MUESTRAS

Los tratamientos aplicados fueron las temperaturas de 25 y 50°C , tomando en cuenta que el crecimiento de los microorganismos se acelera con el incremento en temperatura, el muestreo se realizó con 3 días de por medio para el tratamiento de 50°C y con 7 días de por medio para el tratamiento de 25°C , realizando en total 5 muestreos en el tiempo después del día 0 para ambos tratamientos (Figura 1).



T 50°C = Toma de muestras sujetas a 50°C . T 25°C = Toma de muestras sujetas a 25°C .

Figura 1. Diagrama de toma de muestras a través del tiempo.

En cada toma de muestra para ambos tratamientos se realizaron análisis microbiológicos (coliformes totales, aerobios mesófilos, mohos y levaduras), físicos (color $L^*a^*b^*$, actividad de agua) y químicos (pH), siguiendo los protocolos establecidos para cada tipo de análisis en los Laboratorios de Microbiología y Análisis de Alimentos Zamorano, detallados en Anexos 1, 2 y 3.

3.5 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Se realizaron cómputos estándares en placa, efectuando las siembras mediante la técnica de vertido o “Pour Plate” considerando que con esta técnica se minimiza la contaminación del medio de cultivo. Se utilizó el protocolo descrito en el compendio de métodos para el análisis microbiológico de alimentos (Vanderzant y Splittstoesser, 1992), con ciertas modificaciones para ajustarlos a las condiciones del experimento y a los materiales disponibles (Anexo 1). Los medios de cultivo (Cole-Parmer[®]) utilizados fueron “Standard Methods Agar” PCA para el conteo de mesófilos aerobios, “Potato Dextrose Agar” PDA para hongos y levaduras y (Difco[®]) “Violet Red Bile Agar” VRBA para coliformes totales.

3.6 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

Para los análisis físico-químicos necesarios en este experimento se utilizaron equipos especiales del Laboratorio de Análisis de Alimentos, Zamorano.

3.6.1 Color

Utilizando el “Colorflex Hunterlab” y el “Software Universal Color”, se siguieron los pasos estipulados por el Laboratorio de Análisis de Alimentos Zamorano (Anexo 3). Para evitar error experimental en el análisis del color, se eliminaron de las muestras los pedazos de vegetales deshidratados y otros componentes de la sopa instantánea, dejando solamente los tallarines.

3.6.2 Actividad de Agua (a_w)

Se utilizó el “AquaLab” y siguiendo el procedimiento estipulado en el protocolo para el análisis de muestras en este aparato por el Laboratorio de Análisis de Alimentos Zamorano (Anexo 2). Se tomaron en cuenta todos los componentes de la muestra de sopa instantánea.

3.6.3 pH

Los valores de pH fueron medidos con un potenciómetro “Digital Ionalyzer”, se utilizó 5g de sopa instantánea diluidos en 25ml de agua destilada con pH 7.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 SOPAS INSTANTÁNEAS SUJETAS A 50°C

Los conteos en placa de coliformes totales, aerobios mesófilos, mohos y levaduras, reflejaron disminuciones logarítmicas en la cantidad de microorganismos viables presentes en las muestras de sopa instantánea, obteniendo la eliminación completa de colonias de coliformes al octavo día de iniciado el experimento. El descenso en los conteos de microorganismos puede atribuirse a la disminución de la actividad de agua (a_w) y pH del alimento, ya que estos factores son considerados críticos para el crecimiento microbiano (Cuadro 1).

También es necesario mencionar que el efecto de la temperatura pudo acelerar la actividad metabólica de los microorganismos, de tal forma que demandaron más nutrientes para su crecimiento, si bien es cierto que el alimento tiene bastantes nutrientes en su matriz, estos no estuvieron disponibles porque no estaban en solución, provocando de esta forma el descenso en la población de microorganismos.

Cuadro 1. Resumen de resultados microbiológicos, físicos y químicos de muestras de sopa instantáneas a 50°C.

Variable	Toma de muestra					
	Día 0	Día 4	Día 8	Día 12	Día 16	Día 20
Coliformes totales*	2.79±0.16 ^a	1.98±0.47 ^b	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
Aerobios Mesófilos*	3.60±0.17 ^a	3.25±0.26 ^{ab}	2.13±1.00 ^{ab}	2.45±0.36 ^{ab}	1.08±1.12 ^b	1.05±0.09 ^b
Mohos y Levaduras*	2.68±0.29 ^a	2.07±0.44 ^{ab}	1.31±0.28 ^{bc}	1.46±0.08 ^b	1.31±0.17 ^{bc}	0.51±0.46 ^c
Actividad de Agua (a_w)**	0.56±0.00 ^a	0.44±0.02 ^b	0.36±0.01 ^c	0.34±0.02 ^{cd}	0.31±0.02 ^d	0.32±0.03 ^{cd}
pH	6.27±0.04 ^a	6.23±0.01 ^{ab}	6.15±0.05 ^{abc}	6.14±0.06 ^{bc}	6.06±0.06 ^c	6.09±0.04 ^c
Color L	70.28±1.45 ^a	69.03±0.80 ^{ab}	68.65±1.55 ^{ab}	65.91±1.22 ^b	67.53±1.03 ^{ab}	66.68±1.39 ^b
Color a	4.54±0.35 ^a	4.97±0.26 ^a	4.92±0.52 ^a	5.29±0.07 ^a	5.27±0.19 ^a	5.17±0.15 ^a
Color b	28.1±0.66 ^a	28.96±0.53 ^a	28.63±0.83 ^a	29.43±0.09 ^a	29.28±0.38 ^a	28.58±0.34 ^a

Para cada variable, valores con la misma letra indica que no existe diferencia estadística significativa (Separación de medias Tukey).

Parámetro del color: L: indica claridad; a: en este estudio indica la intensidad de rojo puro del color; y b: en este estudio indica la intensidad de amarillo puro del color.

*Unidades formadoras de colonia por gramo de muestra (Log_{10} UFC/g).

**Valores cercanos a 1 indican mayor humedad disponible para crecimiento microbiano en la muestra.

Según Eskin y Robinson (2000), la actividad de agua (a_w), temperatura y pH son los factores más importantes que controlan el grado de cambios físicos, químicos y el crecimiento de microorganismos en los alimentos. Los cambios en pH pueden atribuirse a cambios químicos en la estructura de la sopa instantánea o también puede ser resultado de la actividad bacteriana. Como se puede observar en el Cuadro 2, realizando un análisis de correlación de Pearson, se determinó que efectivamente si existe una correlación alta positiva entre el crecimiento de coliformes totales, aerobios mesófilos, mohos y levaduras, y la a_w y pH observado durante el estudio, es decir, que la disminución de pH y a_w es directamente proporcional a la reducción logarítmica de los conteos de microorganismos.

Cuadro 2. Análisis de correlación entre pH, a_w y el crecimiento microbiano a 50°C.

Variable Independiente	Parámetros	Variable Dependiente		
		Coliformes Totales	Aerobios Mesófilos	Mohos y Levaduras
a_w	P <0.05	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	Pearson Coef*	0.9409	0.7913	0.8394
pH	P <0.05	<0.0001	0.0001	0.0009
	Pearson Coef	0.8039	0.7867	0.7133

*Coeficiente utilizado para determinar el grado de correlación entre dos variables. P<0.05 indica que si existe correlación alta positiva entre las variables.

Con los resultados del Cuadro 2, se procedió a realizar una regresión de los datos para determinar el crecimiento de microorganismos en términos de pH, a_w o la combinación de estas variables. En el Cuadro 3 se muestran las ecuaciones en términos de a_w , puesto que fueron las que tuvieron un mejor R^2 y la probabilidad de los coeficientes numéricos fueron P<0.05. La variable pH y la interacción pH* a_w no fueron significativos en las ecuaciones.

Cuadro 3: Actividad de agua como variable de predicción de crecimiento de microorganismos a 50°C.

Variable Dependiente	Variable Independiente	Ecuación	R^2	%CV
Coliformes Totales	a_w	$Y = 12.45951x - 4.04937$	0.885	52.406
Aerobios Mesófilos	a_w	$Y = 10.00058x - 1.62812$	0.626	31.742
Mohos y Levaduras	a_w	$Y = 6.93417x - 1.13868$	0.705	26.765

La variable x en la ecuación sería el valor de actividad de agua (a_w).

R^2 = Ajuste del modelo lineal. CV= Indica la variabilidad de los datos.

En este experimento solamente actividad de agua pudo utilizarse para predecir el crecimiento microbiano, esto es considerando una P<0.05. Los R^2 están relativamente bajos y de igual forma los CV no son prometedores, esto nos indica que el crecimiento microbiano no correspondió a un comportamiento lineal.

4.2 SOPAS INSTANTÁNEAS SUJETAS A 25°C

Como se aclaró en el apartado de materiales y métodos de este documento, cada temperatura utilizada se diferencia en el intervalo de toma de muestra, siendo mayor entre las muestras a 25°C, debido a que en teoría los cambios microbiológicos y fisicoquímicos serían menos acelerados. Se observa en el Cuadro 4 que el aumento o disminución del valor de cada variable a través del tiempo presentó diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) para las variables microbiológicas, actividad de agua y valor L del color. No se encontró diferencia estadísticamente significativa para el pH y los valores a y b del color. Es interesante observar que a 25°C los cambios a través del tiempo fueron menos drásticos, comparado con el comportamiento observado a 50°C, esto es observando la separación de medias para cada variable en cada temperatura.

Cuadro 4: Resumen de resultados microbiológicos, físicos y químicos de muestras de sopa instantánea a 25°C.

Variable	Toma de muestra					
	Día 0	Día 8	Día 16	Día 24	Día 32	Día 40
Coliformes totales*	2.79±0.16 ^a	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^b
Aerobios Mesófilos*	3.60±0.17 ^a	3.06±0.39 ^{ab}	2.85±0.27 ^{ab}	1.28±0.04 ^d	1.91±0.63 ^{cd}	2.68±0.10 ^{bc}
Mohos y Levaduras*	2.68±0.28 ^a	1.56±0.15 ^b	1.64±0.27 ^b	1.67±0.29 ^c	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
Actividad de Agua (a _w)**	0.56±0.002 ^a	0.41±0.01 ^b	0.40±0.02 ^b	0.41±0.003 ^b	0.41±0.006 ^b	0.39±0.01 ^b
pH	6.27±0.04 ^a	6.25±0.04 ^a	6.20±0.01 ^a	6.21±0.03 ^a	6.24±0.07 ^a	6.23±0.03 ^a
Color L	70.28±1.45 ^a	68.31±1.31 ^{ab}	67.96±0.62 ^{ab}	66.61±1.09 ^b	67.84±0.20 ^{ab}	70.14±0.92 ^a
Color a	4.54±0.35 ^a	4.89±0.08 ^a	4.70±0.18 ^a	4.93±0.19 ^a	4.93±0.04 ^a	4.89±0.25 ^a
Color b	28.10±0.66 ^a	28.57±0.44 ^a	27.78±0.73 ^a	27.90±0.19 ^a	28.28±0.13 ^a	28.27±0.60 ^a

Para cada variable, valores con la misma letra indica que no tienen diferencia estadística significativa (Separación de medias Tukey).

Parámetro del color: L: indica claridad; a: en este estudio indica la intensidad de rojo puro del color; y b: en este estudio indica la intensidad de amarillo puro del color.

*Unidades formadoras de colonia por gramo de muestra (Log_{10} UFC/g).

** Valores cercanos a 1 indican mayor humedad disponible para crecimiento microbiano en la muestra.

Al igual que en el tratamiento de 50°C de temperatura, al octavo día ya no se observó presencia de coliformes totales, esto se puede relacionar con el decaimiento de la actividad de agua del alimento, que en un principio por la inoculación estuvo alto pero a lo largo de esta primera semana el producto fue perdiendo humedad y por ende bajó su actividad de agua hasta tal punto que los coliformes no pudieron sobrevivir.

En el Cuadro 5 se proporciona una correlación de Pearson, indicando que no existió correlación alta entre el pH y las variables microbiológicas, es decir, que en este

tratamiento el crecimiento de los microorganismos no dependió de la acidez de las muestras de sopa instantánea y que la variable determinante en este caso fue la a_w .

Cuadro 5: Análisis de correlación entre pH, a_w y el crecimiento de microorganismos a 25°C.

Variable Independiente	Parámetros	Variable Dependiente		
		Coliformes Totales	Aerobios Mesófilos	Mohos y Levaduras
a_w	Prob <0.05	<0.0001	0.024	0.0006
	Pearson Coef*	0.979	0.529	0.731
Ph	Prob <0.05	0.114	0.057	0.329
	Pearson Coef	0.386	0.456	0.244

*Coeficiente utilizado para determinar el grado de correlación entre dos variables.

Los resultados obtenidos en el tratamiento de 25°C reflejan que la actividad de agua es la variable importante para poder predecir el crecimiento de los microorganismos. Pero tal y como se observa en el Cuadro 6, las ecuaciones que se obtuvieron no tienen un buen ajuste y presentan un coeficiente de variación alto para ser un experimento de laboratorio. Este comportamiento puede atribuirse a que el crecimiento de los microorganismos es muy variable y que no siempre se espera los mismos conteos, aun estando en el mismo alimento.

Cuadro 6: Actividad de agua como variable de predicción de crecimiento de microorganismos a 25°C.

Variable Dependiente	Variable Independiente	Ecuación	R ²	%CV
Coliformes Totales	a_w	$Y = 17.26433x - 6.902$	0.959	47.662
Aerobios Mesófilos	a_w	$Y = 7.25338x - 0.531$	0.279	28.416
Mohos y Levaduras	a_w	$Y = 12.80726x - 4.45754$	0.534	74.215

La variable x en la ecuación sería el valor de actividad de agua (a_w).

R²= Ajuste del modelo lineal.

CV= Indica la variabilidad de los datos.

4.3 EFECTO DE LA TEMPERATURA

En este estudio las temperaturas utilizadas, 25 y 50°C, presentaron diferencias estadísticas significativas en el pH y a_w , no habiendo diferencias estadísticas significativas para las variables de color y el crecimiento de microorganismos a los 8 y 16 días de iniciado el experimento (Cuadro 7).

Cuadro 7: Efecto de la temperatura sobre características microbiológicas y físico-químicas de sopas instantáneas.

Variable	Wilks' Lambda***		Toma de muestra					
	TxTRT	T	Día 0 ^ψ		Día 8		Día 16	
			T25	T50	T25	T50	T25	T50
Coliformes totales*	<0.001	<0.001	2.79±0.16	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
Aerobios Mesófilos*	0.40	0.22	3.6±0.17	3.06±0.39 ^a	2.13±1.002 ^a	2.85±0.27 ^a	1.08±1.12 ^a	
Mohos y Levaduras*	0.32	0.03	2.68±0.28	1.56±0.15 ^a	1.31±0.28 ^a	1.64±0.27 ^a	1.31±0.16 ^a	
Actividad de Agua (a _w)**	0.26	0.02	0.56±0.002	0.41±0.01 ^a	0.36±0.01 ^b	0.40±0.02 ^a	0.31±0.01 ^b	
pH	0.15	0.10	6.27±0.04	6.25±0.04 ^a	6.15±0.05 ^b	6.20±0.01 ^a	6.06±0.06 ^b	
Color L	0.08	0.01	70.28±1.45	68.31±1.31 ^a	68.65±1.55 ^a	67.96±0.62 ^a	67.53±1.03 ^a	
Color a	0.38	0.30	4.54±0.35	4.89±0.08 ^a	4.92±0.52 ^a	4.70±0.18 ^a	5.27±0.19 ^a	
Color b	0.52	0.34	28.10±0.66	28.57±0.44 ^a	28.63±0.83 ^a	27.78±0.73 ^a	29.28±0.38 ^a	

Para cada variable, valores con la misma letra del mismo día indica que no tienen diferencia estadística significativa (Separación de medias Duncan).

ψ En el día 0 se tomaron muestras generales, siendo por lo tanto los mismos datos para los dos tratamientos. Parámetro del color: L: indica claridad; a: en este estudio indica la intensidad de rojo puro del color; y b: en este estudio indica la intensidad de amarillo puro del color.

T25 = Tratamiento con 25°C de temperatura. T50 = Tratamiento con 50°C de temperatura.

*Unidades formadoras de colonia por gramo de muestra (Log₁₀ (UFC/g)).

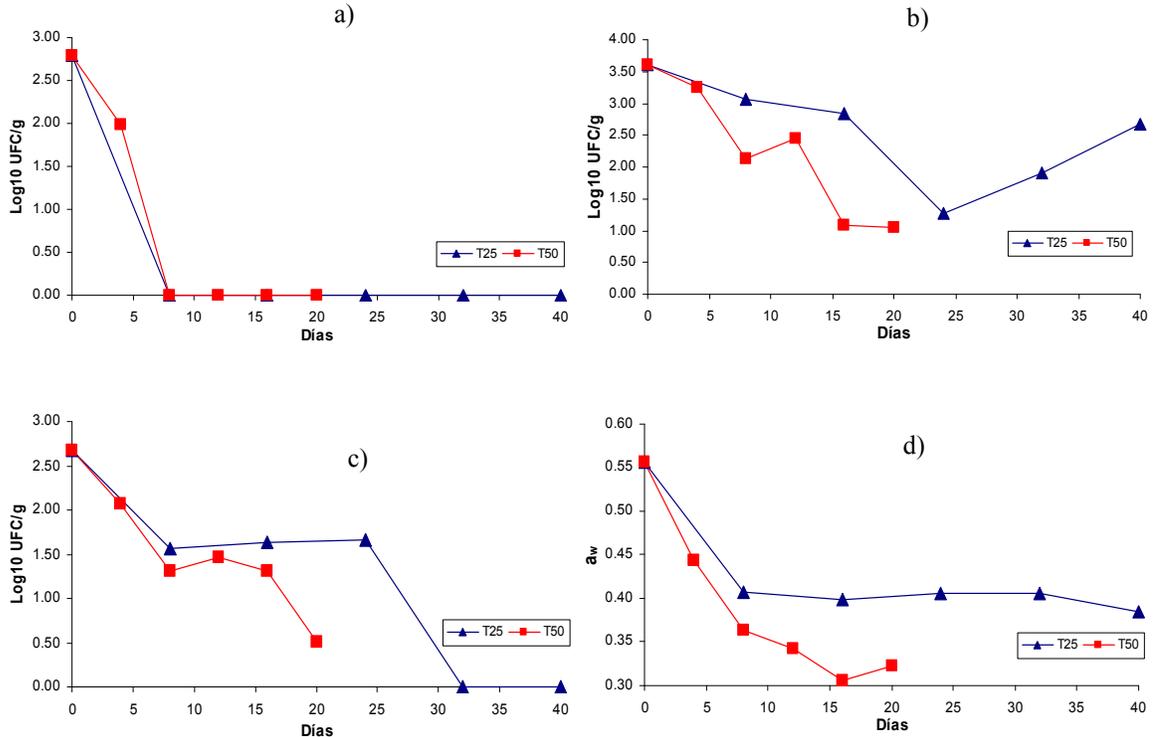
** Valores cercanos a 1 indican mayor humedad disponible para crecimiento microbiano en la muestra.

*** Estadístico que determina la interacción del tiempo con los tratamientos (TxTRT), y el efecto del tiempo sobre el experimento (T). P< 0.05 indica que si hubo efecto o interacción.

Forsythe (2000), menciona que si la temperatura de almacenamiento de un alimento, a un contenido de humedad constante y un empaque sellado, incrementa; la a_w del alimento también incrementa. A la vez afirma que cuando la temperatura de almacenamiento de un alimento aumenta, su actividad de agua tiende a bajar, esto ocurre solo si el empaque utilizado no es la adecuada y sea permeable al vapor de agua. El plástico utilizado en el empaque de alimentos y bebidas tiene como factor limitante su permeabilidad al vapor de agua, gases y luz. Por factores económicos y falta de recursos en este estudio se utilizaron bolsas Ziploc, los cuales no estuvieron herméticamente selladas, esto permitió la migración de humedad del alimento hacia el ambiente.

Según Jay (1997), hay factores ambientales que interactúan con el pH y que respecto a la temperatura, el pH del sustrato se vuelve más ácido a la medida en que aumenta la temperatura, asociando esto al experimento realizado, se pudo observar que a 50°C se tuvieron valores de pH más bajos que a 25°C, a los 8 y 16 días de iniciado el estudio.

En cuanto al crecimiento de microorganismos, en este caso no se obtuvieron diferencias estadísticas significativas entre temperaturas a los 8 y 16 días de iniciado el estudio, pero es importante observar el crecimiento de estos microorganismos a través del tiempo para visualizar diferencias en una forma más clara, tal y como se presenta en las siguientes gráficas.



a) Coliformes totales; b) Bacterias aerobias mesófilas; c) Mohos y levaduras; y d) Actividad de agua.

Figura 2. Crecimiento de microorganismos y comportamiento de a_w a 25 (T25) y 50°C (T50) a través del tiempo.

Se puede observar en la Figura 2 que el efecto de la temperatura fue inverso al crecimiento de los microorganismos, ya que a 50°C los microorganismos iban muriéndose más rápido que los microorganismos a 25°C, y esto tiene relación directa con el decaimiento en actividad de agua registrada en ambas temperaturas.

5. CONCLUSIONES

- En ambas temperaturas, 25 y 50°C, se observó una disminución significativa en los conteos de microorganismos durante los 40 días de almacenamiento.
- Los coliformes totales inoculados no pudieron adaptarse a las condiciones de temperatura, humedad y pH del alimento, presentando cero unidades formadoras de colonias a los 8 días de iniciado el estudio a 25 y 50°C.
- El bajo pH y a_w fueron factores determinantes para limitar el crecimiento de los coliformes totales, aerobios mesófilos, mohos y levaduras.
- Los tratamientos 25 y 50°C no presentaron diferencias estadísticas significativas en la disminución de los conteos microbianos a los 8 y 16 días de iniciado el experimento. Adicionalmente la disminución de la a_w y el pH fue significativamente mayor para el tratamiento de 50°C en los mismos días.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar otros estudios incluyendo otras temperaturas, reduciendo el intervalo de toma de muestras y alargando el tiempo de estudio, para conocer el comportamiento de los microorganismos en otros ambientes y observar mejor su dinámica a través del tiempo. Incluir y controlar otros factores de deterioro como humedad relativa y luz.
- Utilizar material de empaque impermeable a vapor de agua o uno similar al utilizado en el producto comercial para simular las condiciones reales a la cual puede estar el alimento.
- Evaluar el crecimiento de microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella entérica*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*, para tener una mejor idea del efecto de la temperatura, actividad de agua y pH sobre las bacterias causantes de enfermedades.

7. BIBLIOGRAFÍA

Cojulún, R. 2007. Refinamiento de procesos de selección de productos alimenticios promisorios: vida útil. Curso de desarrollo de nuevos productos. Zamorano, Honduras. 15p.

Eskin, M.; Robinson, D. 2001. Food Shelf Life Stability: Chemical, Biochemical and Microbiological Changes. CRC Series, Washington, D.C. Contemporary Food Science. 370p.

Ertola, R. 2000. Crecimiento microbiano (en línea). Consultado el 2 de noviembre de 2007. Disponible en <http://www.biologia.edu.ar/microind/crecimiento%20bacteriano.htm>

Food Processing Technology. 2006. Shelf life (en línea). Consultado el 28 de noviembre de 2006. Disponible en: <http://www.foodprocessing-technology.com/glossary/shelf-life.html>

Forsythe, S. 2000. Alimentos seguros: microbiología. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 400p.

Franco, J. 2007. Microorganismos: Los mohos (en línea). Consultado el 3 de septiembre de 2007. Disponible en: <http://www.doschivos.com/trabajos/biologia/1904.htm>

Ikerlarre, A. 2000. Guía de alimentación (en línea). Consultado el 2 de septiembre de 2007. Disponible en: <http://www.ikerlarre.e.telefonica.net/paginas/agradecimientos.htm>

ISPCH, 2000. Recuento microorganismos aerobios mesófilos (en línea). Consultado el 2 de septiembre de 2007. Disponible en: http://www.ispch.cl/lab_amb/serv_lab/aerobios_micro.html

Jay, J. 1997. Modern Food Microbiology: Intrinsic and extrinsic parameters of food that affect microbial growth. Fifth Edition. Food Science Text Series. Pág. 38-61.

Kuntz, L. 1996. Accelerated Shelf-life Testing (en línea). Consultado el 27 de noviembre de 2006. Disponible en: <http://www.foodproductdesign.com/archive/1991/1291QA.html>

Kruger, J.; R.B. Matsuo y J.W. Dick. 1998. Pasta and Noodle Technology. American Association of Cereal Chemists, Inc. Minnesota. 356p.

Medina, M. 2005. Requerimientos para el crecimiento microbiano (en línea). Consultado el 26 de noviembre de 2006. Disponible en: http://www.unizar.es/departamentos/bioquimica_biologia/docencia/FMBvirtual/CultbBact/Reque.htm

Microbiology Procedure. 2007. Methods of determining microorganisms growth (en línea). Consultado el 29 de agosto de 2007. Disponible en: <http://www.microbiologyprocedure.com/growth-of-microorganisms/methods-of-determining-growth.htm>

RHMTHECH 2003. Microbial shelf life assurance testing (en línea). Consultado el 2 de noviembre de 2007. Disponible en: <http://www.rhmtech.co.uk/science/microbial.php>

Salas, W. SF. Deterioro e índice de deterioro: Crecimiento microbiano (en línea). Consultado el 28 de noviembre de 2006. Disponible en: <http://tarwi.lamolina.edu.pe/~fwsalas/CAP-03.rtf>

Tortajada, F.; Castell, G.; Tornero, B.; Gimeno, C. 2001. Micotoxinas y cáncer pediátrico (en línea). Valencia, España. Consultado el 3 de septiembre de 2007. Disponible en www.pehsu.org/cancer/cancerpdf/micotoxinasycancer.pdf

UNAVARRA. 2007. Microbiología de los alimentos (en línea). Consultado el 2 de noviembre de 2007. Disponible en: <http://www.unavarra.es/genmic/curso%20microbiologia%20general/09-factores%20de%20supervivencia.htm>

Vanderzant, C.; Splittstoesser, D. 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. 3 ed. Washington, D.C. American Public Health Association Inc. (APHA). 1219p.

Wikipedia, 2007. Coliforme (en línea). Consultado el 2 de septiembre de 2007. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Coliforme>

8. ANEXO

Anexo 1. Procedimiento de cálculos estándar en placa para la enumeración de microorganismos.

1. Desinfectar el área de trabajo con alcohol etílico al 70%, fenol o formaldehído.
2. Derretir el medio de cultivo en baño maría con agua destilada y mantenerlo a 45°C.
3. Ajustar la temperatura de agua e dilución entre 15-25°C.
4. Rotular los platos Petri, en la base, con el número de muestra (por duplicado), el factor de dilución, fecha e iniciales del analista.
5. Agitar o mezclar la muestra para uniformizarla.
6. Tomar 10g de la muestra y diluirla en 90ml de agua peptonada (0.1% “Difco, Peptone), para obtener una dilución de 1:10.
7. Preparar las diluciones decimales a partir de esta dilución, transfiriendo 1ml de la muestra con una pipeta estéril a un tubo de ensayo con 9ml de agua de dilución para tener el factor 1:100 y así sucesivamente, de tal manera que en un plato Petri como mínimo, el número de colonias fluctúe entre 25 y 250. Mezclar bien estas diluciones.
8. Transferir 1ml de la muestra a la dilución correspondiente a los platos Petri debidamente identificados, utilizando una pipeta para cada dilución.
9. Agregar aproximadamente 20ml del medio de cultivo a 45°C en cada plato. Para mesófilos aerobios se debe utilizar el medio PCA (Plate Count Agar), para coniformes totales se requiere VRBA (Violet Red Bile Agar) y para hongos y levaduras se utiliza PDA (Papa Dextrosa Agar).
10. Mezcle el medio de cultivo con la muestra en forma lenta con 5 movimientos rotatorios a favor y 5 en contra de las manecillas del reloj y 5 en línea recta de izquierda a derecha, al final se repite el movimiento inicial.
11. Deje los platos en reposo hasta que el medio de cultivo se solidifique.
12. Invierta los platos Petri, para evitar que el agua de condensación facilite el crecimiento de colonias esparcidas debido a la alta humedad.
13. Incubar los platos a la temperatura requerida para cada tipo de microorganismo.
 - Mesófilos aerobios totales: 35-37°C por 24-48 horas.
 - Coniformes total: 35°C por 24 horas.
 - Mohos y levaduras: 25°C por 2-5 días.

Se debe realizar siempre un control del medio de cultivo (placa Petri solamente con el cultivo) y un control de agua de dilución (placa petri con medio de cultivo y agua de dilución).

Fuente: Vanderzant y Splittstoesser, 1992

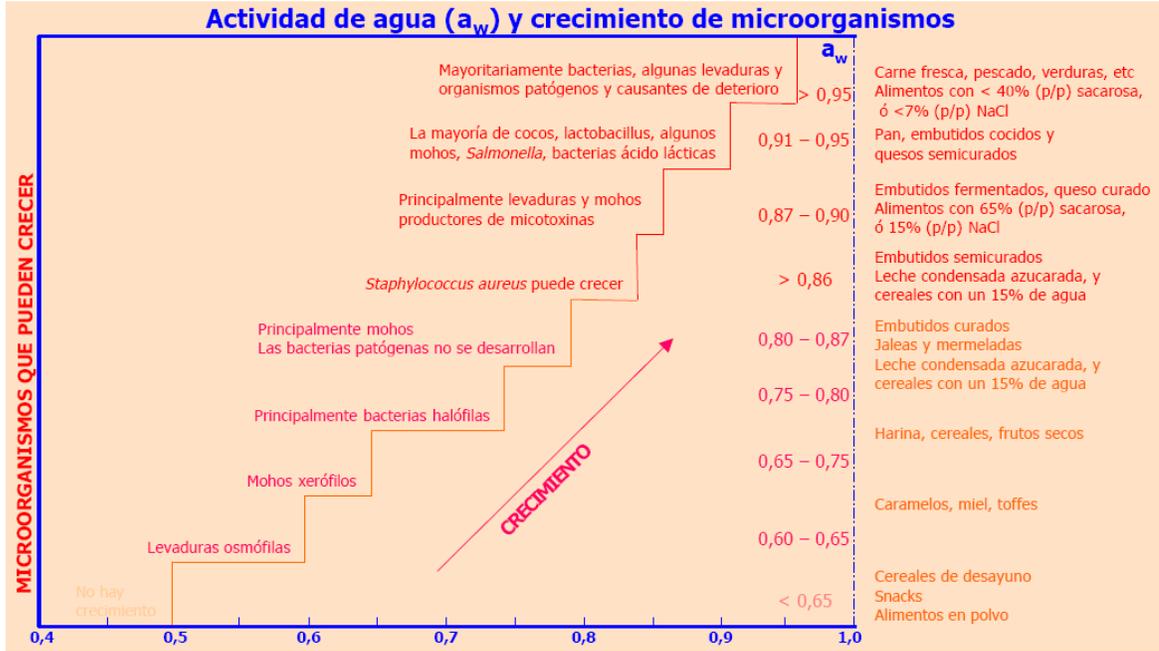
Anexo 2. Análisis de actividad de agua con AquaLab.

1. Encender 10-15 minutos antes de utilizar.
2. Colocar la muestra (correctamente homogenizada y representativa) en los recipientes respectivos del AquaLab, la cantidad a colocar tiene que ser hasta la mitad .
3. Mantener los recipientes cerrados hasta el momento de colocarlos en la cámara de lectura del AquaLab.
4. Cuando ya este listo, colocar los recipientes con la muestra sin la tapa, cerrar la cámara y esperar mientras toma la lectura, él solo dará la señal al finalizar (sonido).
5. Tomar los datos de a_w y la temperatura.
6. Abrir la cámara y seguir con las siguientes muestras.
7. Al finalizar dejar todo limpio y el instrumento apagado.

Anexo 3. Análisis de color con colorímetro Hunter L*a*b.

1. Conecte el Colorflex a la computadora, encienda la computadora y entre al programa “Universal Color”.
2. Limpie el lente del Colorflex y todos los acoples que vaya a utilizar con escobilla y toallas suaves.
3. Calibrar el aparato con los estándares correspondientes (blanco y negro).
4. Escoja el acople adecuado para su muestra (en este caso acople plano) y límpielo cuidadosamente con pañuelos suaves.
5. Coloque su muestra sobre acople seleccionado hasta cubrir todo el lente de la misma, recuerde de cubrir siempre su muestra a analizar con el cobertor negro.
6. Ahora puede leer sus muestras presionando la opción Read Sam.
7. Limpie los acoples y el lente del Colorflex y apague la computadora.

Anexo 4. Actividad de agua y crecimiento de microorganismos.



Fuente: LAB-FERRER. www.aqualab.com.