

Efecto de la adición de propionato de calcio o sorbato de potasio en la vida de anaquel de una torta de naranja

Mario Ernesto Bermúdez González

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2017

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Efecto de la adición de propionato de calcio o sorbato de potasio en la vida de anaquel de una torta de naranja

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

Presentado por

Mario Ernesto Bermúdez González

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2017

Efecto de la adición de propionato de calcio o sorbato de potasio en la vida de anaquel de una torta de naranja

Mario Ernesto Bermúdez González

Resumen. Los productos panificados son altamente perecederos afectados a nivel microbiológico por hongos y bacterias. La industria ha invertido en investigaciones de nuevas tecnologías como el uso de conservantes. El objetivo del estudio fue aumentar la vida de anaquel de una torta de naranja de la panadería Los Ángeles a través del uso de propionato de calcio o sorbato de potasio. Se aislaron e identificaron cinco hongos del producto a través del método de Samson. Para el análisis *in vitro* del efecto inhibidor de los conservantes se utilizó un Diseño Completamente al Azar con tres tratamientos por conservante evaluados en el tiempo (día tres y siete) con dos repeticiones. Las concentraciones con mayor efecto inhibidor a nivel *in vitro* fueron empleadas para evaluar la vida de anaquel, aplicando un diseño completamente al azar con dos tratamientos y un control con tres repeticiones. A través de una prueba sensorial discriminatoria ABX se evaluaron diferencias percibidas por panelistas no entrenados. Los hongos aislados se identificaron del género *Mucor* sp. y *Aspergillus* sp. Las concentraciones con mayor efecto inhibidor a nivel *in vitro* fueron propionato de calcio (0.20%) y sorbato de potasio (0.10%). Ambos conservantes aumentaron de 6 a 12 días la vida de anaquel de la torta. La adición de conservantes al producto no modificó los atributos sensoriales percibidos por los panelistas. Se debe analizar el costo-beneficio por la adición de conservantes en la panadería Los Ángeles.

Palabras clave: Conservantes, hongos deterioradores, inhibición, vida útil

Abstract. Bakery products get spoiled by molds and bacteria. The industry has invested in research looking for new technologies such as the use of preservatives. The objective was to extend the shelf-life of Los Angeles bakery's orange cake by using calcium propionate or potassium sorbate. Through Samson's method five molds were isolated and identified. A Completely Random Design was used with three treatments by preservative, evaluated over time (day three and seven) with two replicates, for the *in vitro* analysis of the preservatives. Concentrations with the best *in vitro* inhibitor effect were applied to evaluate shelf-life, by the use of Completely Random Design with two treatments and one control with three replicates. Through a discriminatory sensorial test ABX differences were evaluated by non-trained panelists. The isolated molds were identifying as *Mucor* sp. and *Aspergillus* sp. The concentrations with the best *in vitro* inhibitor effect were calcium propionate (0.20%) and potassium sorbate (0.10%). Both preservatives extended the shelf-life of the cake from 6 to 12 days. The addition of preservative in the product did not change the sensorial attributes perceived by the panelists. The addition of preservative in the product should be analyzed from the cost-benefit point of view in the Los Angeles bakery.

Key words: Inhibition, preservatives, shelf-life, spoilage molds.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros y Figuras	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4. CONCLUSIONES	12
5. RECOMENDACIONES	13
6. LITERATURA CITADA.....	14
7. ANEXOS	17

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Características que propician el crecimiento de hongos deterioradores de alimentos y características de la torta de naranja.....	8
2. Efecto de inhibición de propionato de calcio en los cinco hongos aislados.....	9
3. Efecto de inhibición de sorbato de potasio en los cinco hongos aislados.	10
4. Análisis vida de anaquel de torta de naranja utilizando propionato de calcio (0.20%) o sorbato de potasio (0.10%).	11
5. Respuestas dadas durante el análisis sensorial de diferenciación forzada (n = 96) de dos tratamientos y el control.	11
 Figuras	 Página
1. Diagrama de flujo para la elaboración de torta de naranja.....	5
2. <i>Mucor</i> sp. observado con lente óptico de 40X (A) tomado en la Universidad de Antioquia (Rodríguez 2016) y (B) tomado en la Universidad Zamorano.....	7
3. <i>Aspergillus</i> sp. observado con lente óptico de 40X (A) tomado en el Centro Universitário Luterano de Palmas (Tavares de Lima 2008) y (B) tomado en la Universidad Zamorano.	8
 Anexos	 Página
1. Sintaxis de SAS 9.4 para análisis de efecto de inhibición de conservantes.	17
2. Inhibición del desarrollo de hongos de los conservantes × concentraciones.	18
3. Sintaxis de SAS 9.4 para análisis de vida de anaquel.	19
4. Sintaxis de SAS 9.4 para análisis sensorial de diferenciación.	20
5. Boleta de evaluación sensorial de diferenciación.....	21
6. Fotos tomadas de hongos deterioradores observados con lente óptico de 40X (A) y (B) <i>Aspergillus</i> sp. y (C) <i>Mucor</i> sp.	22

1. INTRODUCCIÓN

El sector panificador en Nicaragua se encuentra en continuo crecimiento. En busca de disminuir los costos de producción y el posicionamiento del pan en el mercado, la industria panificadora ha optado por la implementación de tecnologías, tales como uso de empaques especializados, estandarización de proceso y adición de conservantes para la mitigación de dichas problemáticas (López 2016).

Panadería Los Ángeles es una microempresa ubicada en Managua, la cual ofrece una cartera de más de diez productos a sus clientes, opera bajo condiciones artesanales, sin aplicación de ningún tipo de tecnología; lo cual ha generado una alta tasa de producto devuelto dado su descomposición, reflejado directamente en los costos de producción. Su estrategia de negocio es la distribución y venta de sus productos a precios más accesibles siendo la torta de naranja la de mayor venta. La torta es un producto horneado, obtenido del batido de grasa, con una vida de anaquel de seis días. Generalmente es empacado en bolsas plásticas de polietileno de baja densidad (Shin y Selke 2014).

Los productos panificados son altamente perecederos y presentan cambios en el sabor, pérdida de humedad y endurecimiento. Además, son afectados a nivel microbiológico por hongos y bacterias; y a menor escala por levaduras (Salgado-Nava y Jiménez-Munguía 2012). Los productos panificados se consideran comercialmente estériles una vez salidos del horneado debido al efecto de las altas temperaturas en la inactivación y eliminación de microorganismos, sin embargo, su posterior manipulación permite la recontaminación por hongos, comúnmente, del género *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. (Moore *et al.* 2007). La proliferación de éstos afecta las características sensoriales, pero además se da la producción de una toxina por parte del *Aspergillus* (aflotoxina); la cual es nociva para la salud humana ya que es considerada como un cancerígeno potencial (Miranda Castro *et al.* 2012). Por lo anterior muchas técnicas se han desarrollado para preservar la vida de anaquel y prevenir el deterioro por hongos y bacterias en productos de panificación.

La industria de alimentos ha invertido en investigaciones para asegurar la inocuidad utilizando nuevas tecnologías como lo es el uso de conservantes. Éstos se definen como: "Cualquier sustancia que no se consume normalmente como alimento por sí misma, cuya adición intencional al alimento es para un fin tecnológico" (RTCA 2005). El principal propósito del uso de conservantes es aumentar la estabilidad del alimento, sin alterar la naturaleza del mismo (RTCA 2005). Dentro de los aditivos con fines de conservación se encuentran sales propiónicas, sórbicas y ascórbicas (Álvarez *et al.* 2007).

Las sales propiónicas, neutralizadas con hidróxido de calcio para formar propionato de calcio, bajo el código 282, son comúnmente usadas como agentes antimicrobianos. Según Codex Alimentarius (2015) su uso no es restrictivo, éste depende de las buenas prácticas de manufactura. Es reconocido como inocuo donde a concentraciones desde 0.075% hasta 3.75% no hay residuos dañinos en el cuerpo (Drozen 2004), ni cambios en las características sensoriales del alimento. La acción del propionato sobre los hongos es efectiva y es generalmente usado en productos con levaduras ya que la acción contra éstas es mínima, su límite sugerido es 2000 mg/kg (Branen *et al.* 2002).

Las sales sórbicas utilizadas en la industria alimentaria son aquellas de base potásica, aceptadas por el Codex Alimentarius como un aditivo alimenticio bajo el código 202 (Codex Alimentarius 2015). Principalmente se usan en la elaboración de pastas, confites y hasta cosméticos como un agente antimicrobiano con propiedades efectivas contra hongos y levaduras. Es ideal para alimentos que involucran procesos a altas temperaturas; para productos de panadería tiene un límite máximo de uso 1000 mg/kg o bien 0.10% (Codex Alimentarius 2016).

El estudio tiene el propósito de evaluar el efecto de la adición de propionato de calcio o sorbato de potasio en la vida útil de torta de naranja. Los objetivos de la investigación fueron:

- Aislar e identificar los hongos desarrollados en la torta elaborada en la panadería Los Ángeles.
- Analizar el efecto *in vitro* de diferentes niveles de conservantes en la inhibición de los hongos aislados.
- Determinar el aumento en la vida de anaquel obtenido por los conservantes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La elaboración de la torta de naranja con conservantes se realizó en la Planta de Innovación de Alimentos; las evaluaciones microbiológicas, aislamiento de hongos e identificación de éstos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano; las evaluaciones sensoriales se realizaron en el Laboratorio de Análisis Sensorial. La planta y laboratorios mencionados, pertenecen al Departamento de Agroindustria Alimentaria de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, ubicada en el Valle del Yeguaré, departamento de Francisco Morazán, Honduras.

La investigación se dividió en cuatro fases.

Fase I. Aislamiento e identificación de hongos propios de la torta de naranja.

Fase II. Análisis *in vitro* del efecto de inhibición de conservante.

Fase III. Análisis de vida de anaquel.

Fase IV. Evaluación Sensorial

Fase I. Aislamiento e identificación de hongos propios de la torta de naranja.

Siembra y aislamiento de hongos. Se realizó el aislamiento de hongos del producto provisto y elaborado por la panadería Los Ángeles. La torta se transportó a Zamorano empacada en polietileno de baja densidad y a temperaturas entre 30 – 35 °C para ser incubada a 35 °C hasta presentar deterioro microbiano provocando el desarrollo de hongos. Para la extracción de los distintos hongos se frotó, con asa de inoculación, la superficie mohosa de la torta y se inoculó en tres puntos en Agar Papa Dextrosa (APD) acidificado a un pH de 4.5, para ser incubados a 25 °C por 5 días. Utilizando el método de agar solidificado (Samson *et al.* 2010) se inocularon los hongos desarrollados en APD (pH 4.5) únicamente en un punto del plato Petri utilizando Agar Extracto de Malta (AEM) y posteriormente incubados a 25 °C por 5 días. El ambiente estéril se alcanzó utilizando mecheros, jeringas estériles y flameadas y etanol con 95% de pureza.

Almacenamiento de platos Petri con hongos aislados. Logrado el aislamiento en APD y en AEM se almacenan los platos a 4 °C por 10 días. Semanalmente se resembró utilizando el método de agar solidificado de Samson para mantener hongos sanos y de esporas reproductivas viables.

Desarrollo de esporas de hongos. Logrado el aislamiento en AEM se incubó a 25 °C por 9 días (4 días adicionales al proceso de siembra y aislamiento de Samson).

Elaboración de placas. Se cortó un cuadrado de 0.7×0.7 cm de área del agar conteniendo desarrollo de hongo, seguidamente se removió el agar. Se colocó una gota de etanol de 95% de pureza para la deshidratación de cualquier resto del medio. Se colocaron 2 gotas de azul de lactofenol para la tinción tanto de esporas como las estructuras del hongo (Samson 2010).

Observación en microscopio óptico. Las placas elaboradas se colocaron bajo el lente óptico a 4X, 10X y 40X; donde se examinó la formación de las hifas, esporangios y esporas para su posterior identificación a partir de las claves de Samson.

Fase II. Análisis *in vitro* del efecto de inhibición de conservante.

Elaboración de medio de cultivo con inhibidores. Se elaboraron siete medios de cultivo (un control sin conservantes y seis con conservantes a diferentes concentraciones cada uno), basados en las recomendaciones del fabricante. Los conservantes, propionato de calcio y sorbato de potasio, se usaron a tres niveles de concentración: 33, 66 y 100% de su límite máximo determinado, el cual es para el propionato de calcio 0.20% y sorbato de potasio 0.10%, respecto al peso del producto final (Codex Alimentarius 2016).

De acuerdo a lo anterior, los tres niveles de concentraciones para cada conservante fueron:

- Propionato de calcio 0.06, 0.12 y 0.20%
- Sorbato de potasio 0.03, 0.06 y 0.10%

Estos niveles fueron agregados en base al peso del agar en polvo y se diluyeron según las recomendaciones del fabricante.

Inoculación e incubación. Elaborados los medios con distintos niveles de conservantes, se inocularon los hongos en un punto en los platos Petri por duplicado e incubaron a 35 °C por 3 y 7 días.

Medición de diámetro de crecimiento. Al tercer y séptimo día de la inoculación se midió el diámetro de expansión/crecimiento del hongo bajo los distintos niveles de presencia de inhibidores fúngicos. Considerando el control como crecimiento máximo y tratamientos como crecimiento condicionado se determinó el porcentaje de inhibición con la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{(\text{Crecimiento máximo} - \text{Crecimiento condicionado})}{\text{Crecimiento máximo}} \times 100 \quad [1]$$

Se calculó el porcentaje de inhibición para cada nivel de los dos conservantes.

Diseño experimental. Se analizó cada conservante (propionato de calcio y sorbato de potasio) por separado utilizando un Diseño Completamente al Azar (DCA) donde se evaluó el efecto de tres niveles de concentración del conservante (33, 66, 100% del máximo permitido) sobre la inhibición de cinco hongos (A1, A2, A3, A4, A5), se realizaron dos

medidas repetidas en el tiempo (tercer y séptimo día) y dos repeticiones para un total de 60 unidades experimentales, y sus respectivos controles por hongo. Los datos se analizaron usando una separación de medias de cuadrados mínimos para evaluar el efecto de inhibición sobre cada hongo utilizando el Programa de Análisis Estadístico SAS® 9.4. por sus siglas en inglés. Se seleccionaron los dos tratamientos con mayor efecto inhibidor para realizar la fase III.

Fase III. Elaboración de la torta y análisis de vida de anaquel.

Materiales e ingredientes. Para la elaboración de la torta de naranja se utilizó: harina de trigo multiuso (26.4%), azúcar (22.0%), margarina (22.0%), huevos (19.8%), agua (6.6%), suero de leche (1.1%), polvo para hornear (1.1%), extracto de naranja (1.1%). En el caso de los conservantes adicionados, propionato de calcio o sorbato de potasio de Distribuidora del Caribe, se seleccionaron los dos tratamientos que presentaron mayor porcentaje de inhibición de las pruebas *in vitro*.

Elaboración del producto. Se elaboraron tres tortas; fórmula original, con propionato de calcio y con sorbato de potasio; los demás ingredientes permanecieron constantes siguiendo el flujo de proceso descrito en la Figura 1.

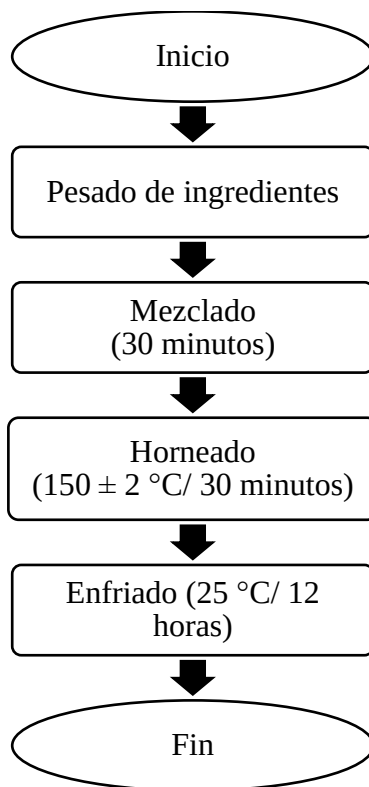


Figura 1. Diagrama de flujo para la elaboración de torta de naranja

Descripción del flujo de proceso.

- Pesar todos los ingredientes en una balanza analítica Ohaus modelo V51PH3.
- Mezclar los ingredientes en la mezcladora HOBART modelo D340 por tratamiento en el siguiente orden: margarina, azúcar, huevo, agua, extracto de naranja, harina de trigo multiuso, polvo para hornear, suero de leche, conservantes (excepto para el control).
- Hornear por 30 minutos a 150 ± 2 °C en el horno BLODGETT modelo DFG-100/200W. Se usó un termómetro de laser PCE- 888 para monitorear la temperatura.
- Enfriado por 12 horas a 25 °C.

Análisis de mohos visibles. Se colocaron tres muestras en bolsas estériles de cada tratamiento (propionato de calcio al 0.20% y sorbato de potasio al 0.10%), y control (sin conservante). Se incubaron a 35 °C por 15 días. Cada día se analizó la aparición de hongos visibles en el producto utilizando el método descrito por Salgado-Nava y Jiménez-Munguía, (2012).

Diseño experimental. Se analizó el desarrollo de mohos visibles en cada tratamiento (propionato de calcio al 0.20%, sorbato de potasio al 0.10% y control sin conservante) utilizando un Diseño Completamente al Azar (DCA), se realizaron tres tratamientos con tres repeticiones para un total de 9 unidades experimentales. Se analizó con separación de diferencia de cuadrados mínimos para evaluar el aumento de la vida de aquel de la torta utilizando SAS® 9.4.

Fase IV. Evaluación sensorial.

Análisis sensorial. Se realizó un análisis discriminativo con una prueba ABX. El panelista evaluador es de nivel no entrenado y debe comparar la torta X (control) y con la torta A (sorbato de potasio 0.10%) y con torta B (propionato de calcio 0.20%), para encontrar diferencias o semejanzas (Gastelum 2008). Se pretende evaluar si de manera general la adición de conservantes a la torta genera algún cambio perceptible por los consumidores.

Diseño experimental. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), se realizaron tres repeticiones con 32 panelistas cada una. Se analizó con separación de diferencia de cuadrados mínimos para evaluar diferencia perceptible utilizando SAS® 9.4.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase I. Aislamiento e identificación de hongos propios de la torta de naranja.

El producto provisto por panadería Los Ángeles incubado a 35 °C por 10 días mostró deterioro microbiológico causado por hongos conocido como enmohecimiento, donde se aislaron cinco hongos diferentes codificados por el autor como A1, A2, A3, A4 y A5.

Dos de los hongos aislados A1 y A3 se clasificaron en el género *Mucor* debido a que presentaron similitudes a las mencionadas por Acevedo *et al.* (2010) donde describen que los hongos cuentan con hifas hialinas no segmentadas y presentan esporangiosporas cubiertas con una membrana peridial simple denominada columela (Figura 2) (Rodriguez 2016).



Figura 2. *Mucor* sp. observado con lente óptico de 40X (A) tomado en la Universidad de Antioquia (Rodriguez 2016) y (B) tomado en la Universidad Zamorano.

Tres de los hongos aislados A2, A4 y A5 se clasificaron dentro del género *Aspergillus* ya que presentaron similitudes a las descritas por Acevedo *et al.* (2010) donde los hongos del género *Aspergillus* cuentan con hifas hialinas no segmentas y presencia de conidios con esporas externas, denominadas artrosporas, Figura 3 (Tavares de Lima 2008)

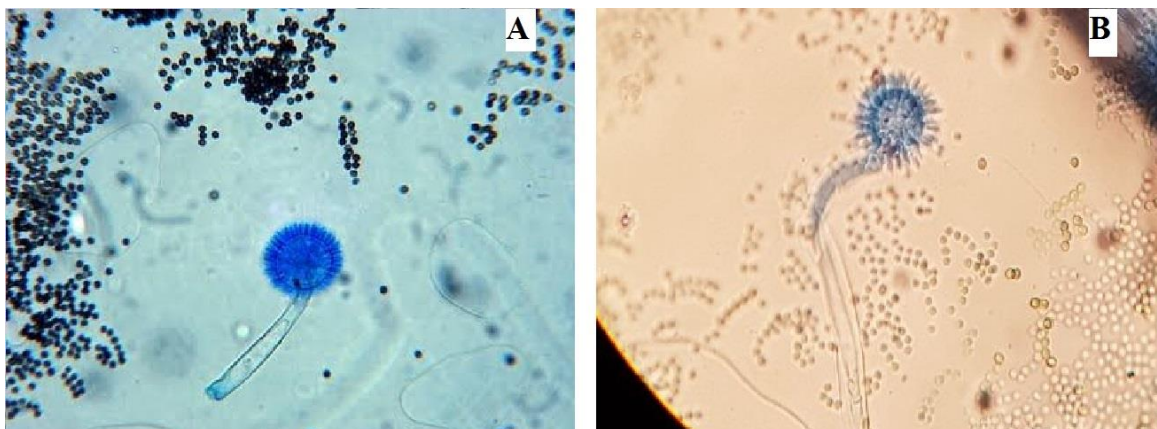


Figura 3. *Aspergillus* sp. observado con lente óptico de 40X (A) tomado en el Centro Universitário Luterano de Palmas (Tavares de Lima 2008) y (B) tomado en la Universidad Zamorano.

En el producto se desarrollaron los géneros de hongo *Mucor* sp. y *Aspergillus* sp. debido a la temperatura de incubación (35 °C), actividad de agua de 0.78 a 0.81 (Adib El-Khoury 1999) y pH entre 5.5 y 6.5 (Álvarez *et al.* 2007), condiciones propicias para el desarrollo de estos hongos. El género *Aspergillus* sp. se desarrolla de manera óptima a temperaturas entre 30 – 37 °C y *Mucor* sp. a 22 – 30 °C, ambos pueden crecer en actividades de agua mayores a 0.70 y pH mayores a 4.0 (Cuadro 1).

La panadería Los Ángeles no cuenta con áreas destinadas al almacenamiento de materias primas lo cual induce a una mayor contaminación cruzada entre producto final y distintas materias primas. Sivasankaran (2014) indica que la inocuidad de la harina y demás ingredientes tienen un significativo impacto en la carga de esporas de hongos deterioradores en el producto. En harina de trigo se han encontrado diferentes especies de *Aspergillus*, como *A. flavus*, *A. versicolor*, y *A. sydowii* (Salgado-Nava y Jiménez-Munguía 2012). La deficiente higiene presente en la panadería induce a otras fuentes de contaminación como los materiales de empaques y superficie de mesas de trabajo. Madden *et al.* (2012) reporta que las esporas del género *Mucor* se encuentran presentes en el agua, suelo, y que en lugares de trabajo con limpieza incorrecta su proliferación es rápida.

Cuadro 1. Características que propician el crecimiento de hongos deterioradores de alimentos y características de la torta de naranja.

Hongo	Rango de temperatura	Aw	pH
<i>Aspergillus</i> sp.	30 – 37 °C	≥ 0.75	≥ 4.00
<i>Mucor</i> sp.	22 – 30 °C	≥ 0.70	≥ 4.00
Torta de naranja	25 – 35°C	0.78 – 0.81	5.5 – 6.5

Fuente: Ray 2005. Adaptado por el autor.

Fase II. Análisis *in vitro* del efecto de inhibición de conservante.

Se puede observar que mientras la concentración de propionato de calcio aumenta de 0.06 a 0.20% hay un mayor efecto de inhibición en los cinco hongos aislados. Los hongos A1 y A3, pertenecientes al género *Mucor* sp., presentan un aumento en su porcentaje de inhibición en 28.23 y 13.80% respectivamente, los hongos A2, A3 y A5 no mostraron sensibilidad al cambio de concentración del propionato de calcio de 0.06 a 0.12%, pero sí al incremento a 0.20%. Por otro lado, a la concentración de 0.20% del conservante el hongo A5, seguido de A3 y A1 mostraron la mayor susceptibilidad, mientras A2 y A4 la menor susceptibilidad. Al nivel de concentración menor establecida en el estudio A3 fue el más susceptible mientras A2 presentó la menor susceptibilidad (Cuadro 2). El hongo A2 presentó la menor resistencia ante todos los niveles de propionato de calcio utilizados en el estudio.

Cuadro 2. Efecto de inhibición de propionato de calcio en los cinco hongos aislados.

Hongos aislados	Porcentaje de inhibición (%) a distintos niveles de conservante $\pm$ DE			
	PC (0.20%)	PC (0.12%)	PC (0.06%)	%CV
A1	52.37 $\pm$ 9.44 ABa	40.05 $\pm$ 4.26 ABb	24.14 $\pm$ 6.78 Bc	17.69
A2	40.38 $\pm$ 10.95 Ba	25.44 $\pm$ 18.57 Bab	7.80 $\pm$ 5.43 Cb	45.19
A3	56.52 $\pm$ 4.21 ABa	49.24 $\pm$ 0.87 Ab	42.72 $\pm$ 4.00 Ac	3.96
A4	51.87 $\pm$ 9.78 Ba	34.60 $\pm$ 22.11 ABb	32.90 $\pm$ 10.14 ABb	35.37
A5	64.88 $\pm$ 10.58 Aa	41.31 $\pm$ 12.19 ABb	25.59 $\pm$ 10.67 Bb	30.13

^{a-b-c} Medias en la misma fila con distinta letra minúscula denotan diferencia significativa entre tratamiento ($P < 0.05$)

^{A-B-C} Medias en la misma columna con distinta letra mayúscula denotan diferencia significativa entre tratamiento ($P < 0.05$)

% CV = Coeficiente de variación

DE = Desviación Estándar

PC = Propionato de calcio

A1 y A3 = *Mucor* sp.

A2, A4 y A5 = *Aspergillus* sp.

En el caso del sorbato de potasio se pudo observar que a medida aumentaba la concentración de 0.03 a 0.10% el efecto inhibitor aumentó en los cinco hongos. Los hongos A1 y A3 (*Mucor* sp.) y A5 (*Aspergillus* sp.) mostraron un aumento en el efecto inhibitor del 44.28, 43.49 y 32.5%, respectivamente. Por otro lado, los hongos A2 y A4 (*Aspergillus* sp.) no presentaron diferencia significativa en su porcentaje de inhibición al aumentar la concentración del conservante de 0.03 a 0.06%. Además, A1 y A3 mostraron mayor susceptibilidad a la concentración 0.10%, con un porcentaje de inhibición del 62.14 y 72.05%; y A2 y A4 mostraron menos susceptibilidad a 0.10% del conservante con un porcentaje de inhibición del 36.81 y 56.52%, respectivamente. Utilizando el sorbato de potasio a la menor concentración del estudio, el hongo A4 fue el más susceptible mientras los hongos A1 y A2 fueron los menos susceptible (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de inhibición de sorbato de potasio en los cinco hongos aislados.

Hongos aislados	Porcentaje de inhibición (%) a distintos niveles de conservante $\pm$ DE			
	SP 0.10%	SP 0.06%	SP 0.03%	%CV
A1	62.14 $\pm$ 6.34 Ba	38.93 $\pm$ 6.10 ABb	17.86 $\pm$ 2.74 Bc	12.87
A2	36.81 $\pm$ 15.28 Da	27.08 $\pm$ 4.17 Cab	17.71 $\pm$ 14.58 Bb	35.77
A3	72.05 $\pm$ 13.92 Aa	46.14 $\pm$ 7.32 Ab	28.56 $\pm$ 14.32 ABc	8.87
A4	56.52 $\pm$ 5.28 Da	37.67 $\pm$ 4.50 BCb	34.47 $\pm$ 5.31 Ab	11.78
A5	60.17 $\pm$ Ca	44.09 $\pm$ 4.22 ABb	27.60 $\pm$ 10.63 ABc	17.41

^{a-b-c} Medias en la misma fila con distinta letra minúscula denotan diferencia significativa entre tratamiento ($P < 0.05$)

^{A-B-C} Medias en la misma columna con distinta letra mayúscula denotan diferencia significativa entre tratamiento ($P < 0.05$)

SP = Sorbato de potasio

A1 y A3 = *Mucor* sp.

A2, A4 y A5 = *Aspergillus* sp.

Los hongos del género *Mucor* sp. fueron más susceptible al aumento de concentración tanto de propionato de calcio como de sorbato de potasio en comparación con *Aspergillus* sp. La resistencia del *Aspergillus* sp. es debido a su alta propagación en cualquier sustrato y formación de esporas resistentes hasta 70 °C, lo cual hace más eficiente su medio de reproducción (Ray 2005). Por otro lado, *Mucor* sp. es de propagación rápida a temperaturas cercanas a 20 °C, cuando éstas superan los 30 °C el desarrollo y formación de esporas es lento (Rodríguez 2016). En el estudio se utilizaron temperaturas de 35 °C (simulando las condiciones de comercialización del producto) lo cual genera un crecimiento lento del *Mucor* resultando mayor susceptibilidad al efecto inhibidor de los conservantes.

Los tratamientos con propionato de calcio a 0.20% (Cuadro 2) y con sorbato de potasio a 0.10% (Cuadro 3) mostraron el mayor porcentaje de reducción de los hongos. Ambos conservantes aumentaron su capacidad inhibitoria a medida que su concentración aumenta. La resistencia al conservante depende del nivel de concentración y la acción sobre el hongo y las características de reproducción y propagación de estos, donde *Aspergillus* sp. mostró mayor resistencia al efecto inhibitorio del conservante y *Mucor* sp. mayor susceptibilidad, mostrado en los Cuadros 2 y 3.

Fase III. Elaboración de la torta y análisis de vida de anaquel.

La adición de propionato de calcio y del sorbato de potasio aumentó la vida de anaquel de la torta de naranja. Ésta sin conservantes tiene una vida de anaquel de 6 días y la adición de conservantes de la investigación ampliaron la vida de anaquel a 12 días (Cuadro 4). Demostrando que ambos conservantes tienen una acción antimicrobiana efectiva. Similares resultados reportados por Sivasankaran *et al.* (2014), donde productos panificados con alta humedad cuya vida de anaquel es de 2 días, a través de la adición de propionato de calcio puede alcanzar una vida de anaquel de 4 días.

Por otro lado, el sorbato de potasio posee un potencial antimicrobiano de 74% de inhibición (Branen *et al.* 2002), pero su uso no es recomendado en la industria panificadora por su efecto inhibidor sobre las levaduras (Salgado-Nava y Jiménez-Munguía 2012), dado que la torta de naranja no contiene levaduras como agente leudante, su uso se consideró en la investigación. Los resultados del Cuadro 4 justifican el uso de sorbato de potasio en torta de naranja, el cual aumentó la vida de anaquel del producto de manera similar que el propionato de calcio, refutándose lo dicho por Salgado-Nava y Jiménez-Munguía, respecto a la baja eficiencia del ácido sórbico en productos panificados.

Cuadro 4. Análisis vida de anaquel de torta de naranja utilizando propionato de calcio (0.20%) o sorbato de potasio (0.10%).

Torta de naranja	Vida de anaquel (días) $\pm$ DE
Con sorbato de potasio (0.10%)	13.33 $\pm$ 0.71 a
Con propionato de calcio (0.20%)	12.33 $\pm$ 2.00 a
Sin conservante	6.78 $\pm$ 1.09 b
%CV	12.76

^{a-b} Medias en la misma columna con distinta letra minúscula denotan diferencia significativa entre tratamiento ($P < 0.05$)

Fase IV. Evaluación sensorial.

Los panelistas no entrenados no detectaron diferencias perceptibles entre los tratamientos las tortas elaboradas con propionato de calcio 0.20% y con sorbato de potasio 0.10% y el control; en menor proporción identificaron diferencias entre tortas (Cuadro 5). Por lo tanto, la adición de conservantes utilizando sus límites máximos permitidos no generó ningún cambio en los atributos sensoriales, confirmado por Adib El-Khoury (1999), quien determina que un buen conservante, además de cumplir su función inhibitoria, no debe aportar a las características sensoriales del producto.

Cuadro 5. Respuestas dadas durante el análisis sensorial de diferenciación forzada (n = 96) de dos tratamientos y el control.

Respuesta dada	Cantidad de panelista que responden $\pm$ DE
Sorbato de potasio (0.20%)	13.33 $\pm$ 4.04 a
Propionato de calcio (0.10%)	12.00 $\pm$ 5.00 a
Ninguna	6.67 $\pm$ 1.15 b
%CV	17.12

^{a-b} Medias en la misma columna con distinta letra minúscula denotan diferencia significativa entre tratamiento ($P < 0.05$)

4. CONCLUSIONES

- La torta de naranja elaborada y provista por panadería Los Ángeles presentó crecimiento de hongos de los géneros *Mucor* sp. y *Aspergillus* sp.
- Propionato de calcio y sorbato de potasio inhiben el desarrollo de *Mucor* y *Aspergillus* y a medida que incrementa su concentración aumenta su efecto inhibidor.
- A nivel *in vitro* propionato de calcio (0.20%) y sorbato de potasio (0.10%) generaron el mejor efecto fungistático.
- El uso de propionato de calcio y sorbato de potasio en concentraciones de 0.10% y 0.20%, respectivamente, aumentaron la vida de anaquel de la torta a 12-13 días.
- La adición de conservantes en la torta de naranja no afecta los atributos sensoriales

5. RECOMENDACIONES

- Analizar el efecto costo-beneficio de la adición de conservantes según las condiciones dadas por la empresa.
- Identificar las fuentes de contaminación en panadería Los Ángeles.
- Evaluar la calidad de la materia prima en panadería Los Ángeles

6. LITERATURA CITADA

Acevedo L, Galo C, Pérez E. 2010. Manual de micología. Honduras: Universidad Nacional Autónoma. 17 - 30 p.

Adib El-Khoury A. 1999. Shelf life extension studies on pita bread [Tesis]. McGill University: Montreal. 143 p.

Álvarez M, Castillo A, Rosa B, Hernández G. 2007. Incremento de la durabilidad del panqué por la aplicación de conservantes. Ciencia y Tecnología de los Alimentos; [Consultado 2017 jun 12]. 17(2):4–6. https://www.academia.edu/20298530/Crecimiento_de_mohos_visible_en_pancu%C3%A9_envasado_con_etanol?auto=download

Aroca ES. 2010. Estudio del sorbato de potasio en la vida útil de mermelada de zanahoria (*Daucus carota*) con adición de coco (*Cocos nucifera*) [Tesis]. Universidad Técnica de Ambato: Ecuador. 17 p.

Balarezo PJ. 2011. Evaluación del uso de propionato de calcio y sorbato de potasio en la estabilidad del pan precocido almacenado en refrigeración, para su comercialización en supermercados [Tesis]. Universidad Técnica de Ambato: Ecuador. 8 p.

Branen L, Davidson PM, Salminen S, Thorngate JH. 2002. Food Additives. 2nd ed. New York (EE. UU.): Marcel Dekker Inc; [consultado 2017 may 30]. http://ariefm.lecture.ub.ac.id/files/2012/10/A._Larry_Branen_P._Michael_Davidson_Seppo_SalmiBookFi.org-FOOD-ADDITIVES.pdf

Cerezal P, Duarte G. 2004. Influencia sensorial de aditivos químicos en tunas (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller) peladas en almíbar conservada por métodos combinados [Tesis]. Universidad de Antofagasta: Antofagasta. p. 10-12.

Codex Alimentarius. 2015. Lista de especificaciones del CODEX relativas a los aditivos alimentarios: CAC/MISC 6-2015 [internet]. Estados Unidos: FAO. [consultado 2016 oct 14]. www.fao.org/input/download/standards/9/CXA_006efs_2015.pdf

Codex Alimentarius. 2016. Norma general para los aditivos alimentarios: CODEX STAN 192-1995 [internet]. Estados Unidos: FAO. [consultado 2016 oct 14]. www.fao.org/gsfonline/docs/CXS_192s.pdf

Drozen M. 2004. GRAS Notification for Calcium Propionate: Our File No. BF4159. [internet]. College Park: FDA. [consultado 2017 jul 15]. <https://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm264105.pdf>

Gastélum R.O. 2008. Comparación y evaluación de las pruebas diferentes Dúo - trío, triangular, ABX e igual diferente. Temas selectos en Ingeniería de Alimentos; [consultado 2017 may 12]. 2(1):70 p. [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-1/TSIA-2\(1\)-Olivas-Gastelum-2008.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-1/TSIA-2(1)-Olivas-Gastelum-2008.pdf)

Jay JM, Loessner, MJ, Golden, DA. 2005. Food Protection with Chemicals and by Biocontrol. In: Springer Science Business Media Inc. Modern Food Microbiology. 7th ed. New York (EE. UU.): Springer New York. p. 301-350.

López Y. 2016 oct 7. Factura eléctrica ahoga a panaderías. La Prensa; [consultado 2016 oct 16]. <http://www.laprensa.com.ni/2016/06/20/economia/2054698-factura-electrica-ahoga-panaderias>.

Marsillo V y Cichelli A. 1992. Influencia del sorbato potásico y del benzoato sódico sobre la estabilidad de las aceitunas de mesa en salmuera [Tesis]. Instituto Sperimentale per la Elaiotecnica y Universita' G.D' Annunzio: Pescara. 3 p.

Madden AA, Stchigel AM, Guarro J, Sutton D, Starks PT. 2012. *Mucor nidicola* sp. nov., a fungal species isolated from an invasive paper wasp nest [Tesis]. Tufts University: Estados Unidos, Universitat Rovira I Virgili. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology: España. 1710–1714 p.

Miranda Castro L, Espinosa Villegas S, Aguayo Pérez J. 2012. Determinación de la vida de anaquel de pan elaborado artesanalmente sin y con la adición de propionato de sodio [Tesis]. Universidad Autónoma de Zacatecas: México. p. 163–168.

Moore M, Dal Bello F, Arendt E. 2007. Sourdough fermented by *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 improves the quality and shelf life of gluten-free bread. European Food Research and Technology. 226:1309 – 1316.

Ray B. 2005. Fundamental food microbiology. 3rd ed. Washington (EE. UU.): CRC Press; [consultado 2017 jul 31]. <http://14.139.206.50:8080/jspui/bitstream/1/2778/1/Fundamental%20of%20Food%20Microbiology.pdf>

RTCA (Reglamento Técnico Centroamericano). 2005. Alimentos y Bebidas Procesadas 67.04.54:10. Aditivos Alimentarios [internet]. Nicaragua: Ministerio de Salud. 410 p. [consultado 2016 oct 19]. www.mspas.gob.gt/images/files/drca/RTCAAditivosAlimentarios.pdf

Rodríguez B. 2016. Atlas de identificación micológica [Internet]. Colombia: Universidad de Antioquia; [consultado 2017 ago 23]. <https://atlasdemicologia.wordpress.com/2016/03/17/mucor-spp/>

Salgado-Nava A, y Jiménez-Munguía M. 2012. Métodos de control de crecimiento microbiano en el pan [Tesis]. Universidad de las Américas Puebla: México. p. 17-26.

Samson R, Houbraken J, Thrane U, Frisvad J, Andersen B. 2010. Food and Indoor Fungi. 2da ed. Estados Unidos: CBS laboratoy manual series. doi:9789070351823

Shin J, Selke S. 2014. Food Processing: Principles and Applications. In: John Wiley & Sons, Inc. Food Packaging. Wisconsin (EE. UU.): Wiley Wisconsin. p. 123-148.

Sivasankaran C, Arockiaswamy WJ, Ramaunjam P, Chellamuthu S. Muruganantham K, Shanmugam L. 2014. Prevention of bread spoilage and to enhance the quality of bread using lactic acid bacteria. International Journal of ChemTech Research; [consultado 2017 ago 18]. 9: 4161-4165.

Tavares de Lima G. 2008. Atlas de micología [Internet]. Brasil: Centro Universitário Luterano de Palmas; [consultado 2017 ago 19]. <http://www.cenapro.com.br/images/documentos/atlasdemicologia-GilsonTavares.pdf>

7. ANEXOS

Anexo 1. Sintaxis de SAS 9.4 para análisis de efecto de inhibición de conservantes.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	41	29154.06811	711.07483	7.11	<.0001
Error	78	7805.69988	100.07308		
Corrected Total	119	36959.76800			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Media porcentaje de inhibición
0.788805	25.10637	10.00365	39.84508

Fuente variación	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Hongo	4	7509.50150	1877.37538	18.76	<.0001
Conservante × Concentración	5	17752.84518	3550.56904	35.48	<.0001
Repetición	1	271.23140	271.23140	2.71	0.1037
Día	1	44.83519	44.83519	0.45	0.5053
Rep*Cons× Concent	5	470.00250	94.00050	0.94	0.4604
Hongo*Cons× Concent	20	2556.02824	127.80141	1.28	0.2200
Cons× Concent*Día	5	549.62410	109.92482	1.10	0.3681

Anexo 2. Inhibición del desarrollo de hongos de los conservantes × concentraciones.

HONGO	CONSERVANTE × CONCENTRACION	REDUCCIÓN EN PORCENTAJE			
		TERCER DÍA	TERCER DÍA	SEPTIMO DÍA	SEPTIMO DÍA
<i>Mucor</i> sp.	Sorbato de potasio (0.03 %)	-14.29%	-17.14%	-20.00%	-20.00%
	Sorbato de potasio (0.06 %)	-42.86%	-42.86%	-30.00%	-40.00%
	Sorbato de potasio (0.10 %)	-71.43%	-57.14%	-60.00%	-60.00%
	Propionato de calcio (0.06 %)	-17.65%	-18.92%	-30.00%	-30.00%
	Propionato de calcio (0.12 %)	-38.24%	-45.95%	-40.00%	-36.00%
	Propionato de calcio (0.20 %)	-50.00%	-59.46%	-60.00%	-40.00%
<i>Aspergillus</i> sp.	Sorbato de potasio (0.03 %)	-25.00%	0.00%	-33.33%	-12.50%
	Sorbato de potasio (0.06 %)	-25.00%	-25.00%	-33.33%	-25.00%
	Sorbato de potasio (0.10 %)	-50.00%	-50.00%	-22.22%	-25.00%
	Propionato de calcio (0.06 %)	-8.70%	0.00%	-12.50%	-10.00%
	Propionato de calcio (0.12 %)	-21.74%	-5.00%	-50.00%	-25.00%
	Propionato de calcio (0.20 %)	-56.52%	-35.00%	-37.50%	-32.50%
<i>Mucor</i> sp.	Sorbato de potasio (0.03 %)	-24.24%	-10.00%	-40.00%	-40.00%
	Sorbato de potasio (0.06 %)	-54.55%	-50.00%	-40.00%	-40.00%
	Sorbato de potasio (0.10 %)	-84.85%	-83.33%	-60.00%	-60.00%
	Propionato de calcio (0.06 %)	-42.42%	-48.48%	-40.00%	-40.00%
	Propionato de calcio (0.12 %)	-48.48%	-48.48%	-50.00%	-50.00%
	Propionato de calcio (0.20 %)	-54.55%	-51.52%	-60.00%	-60.00%
<i>Aspergillus</i> sp.	Sorbato de potasio (0.03 %)	-40.00%	-27.27%	-36.00%	-34.62%
	Sorbato de potasio (0.06 %)	-40.00%	-36.36%	-32.00%	-42.31%
	Sorbato de potasio (0.10 %)	-50.00%	-54.55%	-60.00%	-61.54%
	Propionato de calcio (0.06 %)	-27.27%	-46.15%	-40.00%	-25.00%
	Propionato de calcio (0.12 %)	-45.45%	-46.15%	-40.00%	0.00%
	Propionato de calcio (0.20 %)	-63.64%	-53.85%	-40.00%	-50.00%
<i>Aspergillus</i> sp.	Sorbato de potasio (0.03 %)	-40.00%	-26.09%	-14.29%	-30.00%
	Sorbato de potasio (0.06 %)	-40.00%	-43.48%	-42.86%	-50.00%
	Sorbato de potasio (0.10 %)	-60.00%	-47.83%	-62.86%	-70.00%
	Propionato de calcio (0.06 %)	-10.71%	-33.33%	-25.00%	-33.33%
	Propionato de calcio (0.12 %)	-28.57%	-53.33%	-50.00%	-33.33%
	Propionato de calcio (0.20 %)	-67.86%	-66.67%	-75.00%	-50.00%

Anexo 3. Sintaxis de SAS 9.4 para análisis de vida de anaquel.

Test	Estadístico		p valor	
Shapiro-Wilk	W	0.86873	Pr < W	0.0028
Kolmogorov-Smirnov	D	0.232598	Pr > D	<0.0100
Cramer-von Mises	W-Sq	0.253593	Pr > W-Sq	<0.0050
Anderson-Darling	A-Sq	1.457404	Pr > A-Sq	<0.0050

R-cuadrado	Coef Var
------------	----------

0.844761	12.76471
----------	----------

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Respuesta	2	224.5185185	112.2592593	58.91	<.0001
REP	2	3.6296296	1.8148148	0.95	0.4012

Torta elaborada	Porcentaje	Porcentaje acumulado
Con propionato de calcio al 0.20 %	48.05	48.05
Con sorbato de potasio al 0.10 %	51.95	100.00

Test chi-cuadrado para proporciones de igualdad	
---	--

Chi-cuadrado	0.3506
DF	1
Pr > ChiSq	0.5537

Anexo 4. Sintaxis de SAS 9.4 para análisis sensorial de diferenciación.

Test	Estadístico		p valor	
Shapiro-Wilk	W	0.85671	Pr < W	0.0883
Kolmogorov-Smirnov	D	0.211719	Pr > D	>0.1500
Cramer-von Mises	W-Sq	0.074259	Pr > W-Sq	0.2242
Anderson-Darling	A-Sq	0.50658	Pr > A-Sq	0.1487

R-cuadrado	Coef Var
------------	----------

0.848485	17.11633
----------	----------

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Respuesta	2	74.66666667	37.33333333	11.20	0.0230
REP	2	0.00000000	0.00000000	0.00	1.0000

Torta elaborada	Porcentaje	Porcentaje acumulado
Con propionato de calcio al 0.20 %	36	47.37
Con sorbato de potasio al 0.10 %	76	100.00

Test chi-cuadrado para proporciones de igualdad	
--	--

Chi-cuadrado	0.2105
--------------	--------

DF	1
----	---

Pr > ChiSq	0.6464
------------	--------

Anexo 5. Boleta de evaluación sensorial de diferenciación.

Hoja de evaluación sensorial
Prueba hedónica de Diferenciación de torta de naranja

Código: _____

Nacionalidad: _____

Fecha: _____

Instrucciones:

- Frente a usted hay dos muestras de referencia marcadas con A y B respectivamente, y una muestra X. La muestra X es idéntica a A o a B. Indique con un círculo a cuál referencia es idéntica.
- Si usted no encuentra ninguna muestra igual, escriba “NINGUNA” en la raya sobre “X”.
- Indique el porqué de su respuesta en OBSERVACIONES.

A

B

_____ X

OBSERVACIONES:

Anexo 6. Fotos tomadas de hongos deterioradores observados con lente óptico de 40X (A) y (B) *Aspergillus* sp. y (C) *Mucor* sp.

