



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

APLICACIÓN DE UN CONSERVADOR EN PRODUCTOS DE
MALVAVISCO Y FONDANT, EN WONG'S S.A. DE C.V.

INFORME DE EXPERIENCIA PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

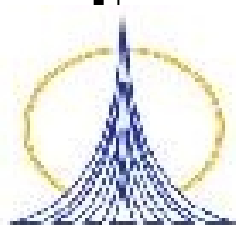
P R E S E N T A :

JAVIER H. MARIN SERAFÍN

DIRECTOR DE INFORME: I.B.Q. HILDA OLVERA

MÉXICO, D.F.

ENERO, 2006





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Después de un largo camino
por fin llegó a una de las metas
que tanto he anhelado,
sin embargo no habría sido posible conseguirlo
sin la ayuda de mis seres queridos,
por eso quiero dedicarles este logro
y agradecerles todo lo que han hecho por mí.**

**A mi esposa Juanita
por su amor, apoyo y comprensión.**

**A mis hijas Ana Quetzalli y Ameyalli
por ser la fuerza que me motiva a seguir adelante.**

**A mis padres
Belem Serafín y Placido Marín
por apoyarme en todo momento,
por el gran esfuerzo que hicieron
y sobre todo por su gran amor.**

**A mis hermanas
Alba y Mini
por ser un gran ejemplo.**

**A mí hermano Silvano
que siempre estará conmigo
en mi mente y en mi corazón.**

**A mis cuñados
Alberto y Octavio
y a mis sobrinos
Daniel, Edgar, Fanny,
Ximena y Esteban.**

**A mis suegros
Placido Ventura y Rafaela Ramírez
por su gran apoyo
y a mis cuñados (as) Guadalupe, Wendy,
Oscar, Ernesto y Claudia
y a mis sobrinos (as) Marlen, Oscarin y Alitzel.**

***A mis compañeros de la universidad
por haber compartido conmigo
momentos inolvidables
y por haberme brindado su amistad.***

***A mis profesores
por haber compartido sus experiencias
y conocimientos y en especial a Alejandro Tecpa
por ser un excelente maestro y un gran amigo.***

***A mis compañeros de trabajo
que han compartido su tiempo
y su experiencia conmigo.***

***A la Universidad Nacional Autónoma de México
por haberme dado la oportunidad
de ser el profesional que ahora soy.***

***Al cuerpo colegiado que se encargó de revisar mi informe,
quiero agradecer por haberme brindado su tiempo y conocimiento
y haber enriquecido mi informe con sus acertadas observaciones:***

***I.B.Q Hilda Olvera Del Valle
Biol. Eloísa Adriana Guerra Hernández
Q. Maria Estela Jiménez Encarnación
I.Q. Franciscio Javier Mandujano Ortiz
M.C. Raúl Zavala Chavero***

INDICE

1. Resumen	1
2. Planteamiento del problema	2
3. Introducción	3
3.1 Un poco de historia	3
3.2 Productos que se elaboran en Wong`s y su proceso de producción	3
4. Marco teórico	5
4.1 Desarrollo de microorganismos en productos de confitería	5
4.2 Características de los mohos y levaduras	7
4.2.1 Mohos	8
4.2.1.1 Condiciones de desarrollo de los mohos	9
4.2.2 Levaduras	10
4.2.2.1 Condiciones de desarrollo de las levaduras	10
4.3 Control microbiano con agentes químicos	11
4.4 Desinfectantes y antisépticos	13
4.5 Conservación química de los alimentos	14
4.6 Conservador natural (Nuevo Desfan-100)	14
4.7 Mecanismo de acción del Nuevo Desfan-100	16
4.7.1 Rompimiento de los enlaces beta 1-4 glucosídicos de la pared celular	16
4.7.2 Inactivación de proteínas celulares de la membrana plasmática	16
4.8 Características física de los productos de malvavisco y fondant	21
4.9 Vida de anaquel y condiciones de almacenaje del malvavisco y productos de fondant	22
5. Objetivos	23
6. Material y método	24
6.1 Primera etapa, evaluación sensorial	
6.2 Segunda etapa, evaluación del efecto inhibitor de ND-100 en una cepa de hongos.	28
6.3 Tercera etapa, evaluación del efecto residual del ND-100	30
7. Resultados	31
7.1 Resultados de la primera etapa	31
7.1.1 Malvavisco	31
7.1.2 menta	32
7.1.3 Cremas de naranja	33

7.2 Resultados de la segunda etapa	34
7.2.1 Malvavisco	34
7.2.2 menta	35
7.3 Resultados de la tercera etapa	36
7.3.1 Malvavisco	36
7.3.2 Menta	37
8. Análisis de resultados	38
8.1 Primera etapa	38
8.1.1 Malvavisco	38
8.1.2 Menta	38
8.1.3 Crema de naranja	39
8.2 Segunda etapa	40
8.2.1 Malvavisco	40
8.2.2 Menta	40
8.3 Tercera etapa	41
8.3.1 Malvavisco	41
8.3.2 Menta	42
9. Conclusiones	43
9.1 Primera etapa	43
9.2 Segunda etapa	43
9.3 Tercera etapa	43
10.Recomendaciones	44
11. Glosario	46
12. Bibliografía	50

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad de agua en diversos productos azucarados	6
Tabla 2 Mínima actividad de agua (aw) en la que pueden crecer diferentes microorganismos.	7
Tabla 3. Diferentes modos de acción a nivel bioquímico de los antimicrobianos.	12
Tabla 4. Diferentes formas de unirse de los antimicrobianos a su blanco en la célula.	13
Tabla 5. Conservadores químicos utilizados en algunos alimentos	15

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la quitina, un homopolímero de unidades de N-acetil-D-glucosamina principal compuesto de las paredes celulares de los mohos.	17
Figura 2. Mecanismo de acción del ND-100 en la pared celular	17
Figura 3. Estructura fundamental de una doble capa de fosfolípidos	18
Figura 4. Estructura de la membrana celular	19
Figura 5. Mecanismo de transporte de proteínas en las membranas celulares	20
Figura 6. Mecanismo de acción del ND-100 en la membrana celular	21

INDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama A. Aplicación de ND-100 en malvavisco para evaluación sensorial	25
Diagrama B. Aplicación de ND-100 en mentas para evaluación sensorial.	26
Diagrama C .Aplicación de ND-100 en cremas de naranja para evaluación sensorial.	27
Diagrama D. Aplicación de ND-100 en mentas y malvavisco para su evaluación microbiológica.	29

Diagrama E. Resiembra de las muestras de malvavisco y menta en medio de cultivo para hongos.	30
--	----

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Resultados de la evaluación sensorial del malvavisco, prueba por triplicado.	31
Cuadro 2. Resultados de la evaluación sensorial de la menta , pruebas por triplicado.	32
Cuadro 3. Resultados de de la evaluación sensorial, de las cremas de naranja, prueba por triplicado.	33
Cuadro 4. Resultado de la evaluación microbiológica del malvavisco al día uno de la aplicación del ND-100, prueba por triplicado.	34
Cuadro 5. Resultados de la evaluación microbiológica de la menta al día uno de la aplicación del ND-100, prueba por triplicado.	35
Cuadro 6. Resultados de la evaluación microbiológica del malvavisco a los 15 y 30 días de la aplicación del ND- 100, prueba por triplicado.	36
Cuadro 7. Resultados de la evaluación microbiológica de la menta a los 15 y 30 días de la aplicación del ND- 100, prueba por triplicado.	37
Cuadro 8. Cuadro comparativo entre la muestra de malvavisco inoculada con 5 ml de cepa de hongos y muestra inoculada con 5 ml de cepa de hongos y 0.03% de ND-100	40
Cuadro 9. Cuadro comparativo entre la muestra de menta inoculada con 5 ml de cepa de hongos y muestra inoculada con 5 ml de cepa de hongos y 0.03% de ND-100.	40
Cuadro 10. Resultados de los análisis de malvavisco a los 15 y 30 días, tomando como referencia las muestras inoculadas con 5 ml de cepa de hongos al día uno.	41
Cuadro 11. Resultados de los análisis de menta a los 15 y 30 días, tomando como referencia las muestras inoculadas con 5 ml de cepa de hongos al día uno.	42

1. RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la inhibición y eliminación de microorganismos (mohos) en una línea de productos (Malvaviscos, mentas y cremas de naranja) en la empresa Wong's S.A. de C.V. Para tal fin se empleó un conservador de origen natural conocido comercialmente como Nuevo Desfan-100 (ND-100), que es un desinfectante orgánico, bactericida, fungicida y algicida. Su ingrediente activo es el extracto cítrico de semillas de toronja (*Citrus máxima*) y dependiendo de la dosis empleada tiene efecto bacteriostático o bacteriolítico.

El trabajo se desarrolló en tres etapas: en la primera se definió la dosis de ND-100 que debía aplicarse a los malvaviscos y productos de fondant (mentas y cremas de naranja) tomando como principal criterio la evaluación sensorial. Se encontró que las dosis de 0.01% y 0.03% se pueden aplicar sin ningún problema a los malvaviscos, mentas y cremas de naranja, pues no se percibe residual amargo en los productos cuando estos se cubren con chocolate.

En la segunda etapa se evaluó el efecto inhibidor del ND-100 en una cepa de mohos. De acuerdo con los resultados obtenidos en la primera etapa se considero la dosis de 0.03% como la mas apta para realizar las pruebas y comprobar el efecto inhibidor en los mohos. Con la dosis de 0.03%, se observó una disminución en el desarrollo de estos microorganismos en un 62.76% en el caso de los malvaviscos y un 74.99% para las mentas, al día uno de su aplicación. En el caso de las cremas de naranja se considero innecesario realizar la segunda y tercera prueba por presentar características muy similares a las mentas.

En la tercera etapa se realizó una resiembra de las muestras de malvavisco y menta a los 15 y 30 días de aplicado el ND-100, esto con el fin de evaluar el efecto inhibidor del ND-100 en los mohos como consecuencia del efecto residual que posee dicho conservador. Se observó que hubo una disminución en el desarrollo de estos microorganismos en un 85.10% en malvaviscos y un 100% en mentas.

Por lo anterior se recomienda aplicar el ND-100 en los productos de malvavisco, menta y cremas de naranja a nivel planta a una concentración de 0.03% por no afectar el sabor de estos productos y por que disminuye de manera notable el desarrollo de los mohos.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El presente informe describe una parte de las actividades realizadas a lo largo de mi trayectoria profesional, como requisito para la titulación por **Experiencia Profesional**. A través de la experiencia adquirida en el campo laboral, los fenómenos biológicos y los conocimientos teóricos (teorías, técnicas y metodologías de investigación) aprendidos durante mi formación académica han adquirido un sentido más amplio y más profundo.

De entre todas las actividades que he desarrollado a lo largo de mi trayectoria profesional propuse el siguiente trabajo por ser uno de los más recientes y además de que permitía desarrollarlo como un trabajo de investigación más que como un informe de actividades. Sin embargo, es importante mencionar que el presente trabajo no se apega totalmente a lo que esperaríamos de un informe realizado en algún centro de investigación, debido a que los tiempos y las políticas de la empresa donde se desarrolló la investigación son diferentes.

Este informe no solo reporta datos y resultados que sirvieron en su momento para tomar una decisión y resolver un problema, también expresa de manera indirecta las diferencias que pueden existir entre la investigación del sector académico y el privado.

La investigación se desarrolló en una empresa del sector alimenticio (confitería) a raíz de un problema de contaminación microbiológica, detectado en la vida de anaquel de algunos productos.

En Wong's S.A. de C.V. se fabrican diversos productos de entre ellos el malvavisco y los productos de fondant (*mentas y cremas de naranja*), son más susceptibles de presentar y desarrollar mohos y levaduras debido a su mayor contenido de humedad y a su proceso de producción. De acuerdo con observaciones hechas durante el seguimiento de vida de anaquel en los productos de fondant (*mentas y cremas de naranja*), se encontró que a partir de los cinco meses de manufacturados, comienza a desarrollarse de forma visible el micelio de los mohos; y en el caso de los malvaviscos, si las condiciones ambientales son favorables también puede llegar a desarrollarse el micelio, lo que provoca una mala apariencia en el producto y origina el rechazo por parte del consumidor.

Con el propósito de controlar este defecto en los malvaviscos y productos de fondant (*mentas y cremas de naranja*) se decidió emplear un conservador natural que inhibiera y a la vez eliminara los mohos sin alterar las características físicas y sensoriales de los productos mencionados. Para ello se propuso evaluar dicho conservador aplicándolo directamente en los productos.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Un poco de historia.

Wong's S.A de C.V es una empresa del ramo de la confitería, fue fundada hace 75 años por una familia de emigrantes chinos; la tercera generación de la familia Wong's se mantuvo al mando de la empresa hasta 1995, año en el que fue vendida a unos empresarios mexicanos quienes se encargaron de impulsar nuevamente la producción y comercialización de la *Vaquita*, chocolate de gran tradición en México. Junto con la línea de chocolates macizos se impulsó también la producción de una línea de productos de *malvavisco* y *fondant* cubiertos con chocolate.

La fabricación de los diferentes productos en Wong's siguen un complejo camino que se divide en dos líneas de producción: una comprende la fabricación de chocolate y otra la elaboración de *malvaviscos* y dulces de *fondant*.

3.2 Productos que se elaboran en wong's y su proceso de producción.

La producción del chocolate en Wong's inicia con la compra del cacao fermentado (*Theobroma cacao*) proveniente de Tabasco y Chiapas. Al momento de recibir las habas de cacao en la planta de producción se realiza una evaluación sensorial. Una vez que el cacao es aceptado se procede al descascarillado, tostado y alcalinizado, para posteriormente ser molido, obteniendo así un producto conocido como *licor de cacao* el cual se utiliza como materia prima para la producción del chocolate o se puede prensar para obtener como subproductos *cocoa* y *manteca de cacao*, materias primas básicas para la producción del chocolate (Beckett, 1998). En todo este proceso se lleva a cabo un estricto control de calidad que comprende tanto análisis fisicoquímicos como microbiológicos de las materias primas obtenidas del cacao.

Con las materias primas obtenidas del cacao: *licor de cacao*, *manteca de cacao* y *cocoa* se fabrica el chocolate en su variedad de *chocolate con leche* y *chocolate semiamargo*. Para ello, se sigue un proceso de mezclado, refinado y conchado, cada una de estas etapas influye de manera importante en el desarrollo del sabor.

Una vez concluida la etapa de conchado, si la viscosidad no es la adecuada se procede a ajustar la viscosidad del chocolate entre 18 000 y 22 000 cps, con el propósito de favorecer el flujo del chocolate a través de las tuberías y cumplir con un requisito de formulación. Una vez que es ajustada la viscosidad del chocolate se bombea a los tanques de almacenamiento donde se conservara en agitación a una temperatura de 40°C hasta el momento de su utilización.

Algo que es importante mencionar es qué el chocolate como producto terminado es poco susceptible de presentar y desarrollar mohos, levaduras y bacterias, debido principalmente a su baja humedad (menos del 1%) y al proceso de

producción que en él interviene. Los cambios bruscos de temperatura (calor 60 °C a frío 10 °C) ayudan a eliminar los microorganismos que están presentes y los que logran sobrevivir no encuentran la humedad suficiente para realizar sus actividades metabólicas y de reproducción.

Por otra lado, está la línea de producción del *malvavisco* y *fondant*, la cual sigue un camino diferente al del chocolate.

El *malvavisco* es un producto elaborado con sacarosa, gretina, glucosa, agua e ingredientes adicionales como: conservador, color y sabor artificial.

El proceso de producción consiste en realizar un jarabe con agua, sacarosa, gretina y glucosa, llevar a ebullición y posteriormente batir en una máquina especial para ello, hasta adquirir una consistencia esponjosa, ahí mismo se adiciona el color, sabor y conservador.

Una vez elaborado el malvavisco se vacía sobre la tolva de una maquina conocida como mogul, el malvavisco se deposita perfectamente y de forma continua en las impresiones hechas sobre molduras de almidón, se deja reposar 24 h y se saca del almidón eliminando el excedente del mismo haciéndolo pasar por una corriente de aire. Posteriormente el malvavisco se coloca en una banda transportadora de forma manual y se hace pasar por un baño de chocolate semiamargo (trampado). Posteriormente esa misma banda cruza un túnel frigorífico que se encuentra a una temperatura de 12° C. Al final del túnel el malvavisco es colectado para su empaque final (Wong's, 2002)

La fabricación del *fondant* sigue un camino similar al del malvavisco en algunas etapas. Inicia con la preparación de un jarabe saturado de azúcar (agua, sacarosa y glucosa), el cual se hace pasar por una máquina la cual se encarga de evaporar el agua a 117-118°C hasta llegar a un concentrado de 85-90% de sólidos, posteriormente se enfría rápidamente a 40°C, mientras que está siendo sometido a agitación para dar lugar a una rápida nucleación y cristalización (Tsheuschner, 2001). Después de este proceso se forma el fondant el cual tiene la apariencia de una pasta que se puede considerar como una suspensión de cristales finos de azúcar en un jarabe saturado. Normalmente el tamaño de los cristales es alrededor de 10 µm. Una vez obtenido el fondant se vacía a unas marmitas donde se homogeneiza el tamaño de los cristales mediante agitación a una temperatura de 100°C, se ajusta la viscosidad del producto y se adiciona el sabor y color, ya sea para mentas o cremas de naranja.

Posteriormente la pasta es vaciada en la tolva de una maquina conocida como mogul, por la cual circulan unos cofres de madera que contienen almidón previamente moldeado con la forma circular de la menta, se inyecta el fondant en las impresiones de almidón y se deja reposar 24 h, luego se sacan las piezas del almidón eliminando el excedente del mismo con una corriente de aire. A partir de ahí se sigue el mismo procedimiento que en el malvavisco (Wong's, 2002).

4. MARCO TEORICO

4.1 Desarrollo de microorganismos en productos de confitería.

La tecnología de elaboración de dulces se basa esencialmente en la ciencia y arte del manejo del azúcar, su principal ingrediente, ello se debe a que con el azúcar se pueden obtener efectos especiales en textura. Estos se logran principalmente mediante la regulación del estado de cristalización del azúcar y de las proporciones relativas de azúcar y humedad.

Además del azúcar podemos encontrar otros ingredientes en los confites, como aceites vegetales, leche y productos lácteos, cacao y chocolate, gomas, jarabe de azúcar para revestimiento, pectinas, grenetinas, almidones, frutas en forma de mermeladas, colorantes, saborizantes, acidulantes, etc. (Silliker y Elliot.1985).

Cada una de las materias primas antes mencionadas puede ser fuente potencial de microorganismos, por ello se requiere contar con un adecuado aseguramiento de la calidad que garantice que las materias primas que se reciben se encuentran sanitariamente aceptables.

Una gran ventaja, es que la mayor parte de los productos de confitería no se halla sujeto a alteraciones microbianas debido a su elevado contenido en azúcar y su escasa humedad. Se exceptúan los bombones con rellenos blandos de “fondant” o de “azúcar invertido” que bajo ciertas condiciones revientan. Ciertas **levaduras** y algunas especies de **Clostridium** que crecen en estos dulces desarrollan una presión gaseosa que puede romper el bombón o más a menudo, hará salir al exterior parte del jarabe o “fondant” a través de algún punto débil de la cubierta de chocolate (Frazier y Westhof; 1978).

Las alteraciones sufridas en los azúcares y las soluciones azucaradas concentradas se limitan a las causadas por los **microorganismos osmófilos**, es decir, los capaces de crecer a presiones osmóticas muy altas (Brock T.D., 1978). Entre ellos se encuentran algunas especies pertenecientes a los géneros **Leuconostoc** y **Bacillus**, ciertas levaduras especialmente del género **Sacharomyces** y algunos **mohos**. A medida que disminuye la concentración de los azúcares aumenta el número de microorganismos capaces de desarrollarse en estas soluciones.

Todos los organismos requieren agua para la vida y la disponibilidad del agua es uno de los factores más importantes que afectan el crecimiento de los microorganismos. La disponibilidad del agua no depende solamente del contenido de agua que haya en el ambiente, sino también de la afinidad que tienen por ella algunos solutos. Por ejemplo, las sales y los azúcares disueltos en agua, tienen gran afinidad por éste disolvente(Tomas D. Brock y Michael T. Madigan, 1993).

La disponibilidad del agua se expresa generalmente en términos físicos como actividad acuosa o potencial de agua. En la microbiología de los alimentos la actividad acuosa (a_w), se expresa como la relación de la presión de vapor del agua del aire sobre una sustancia o solución, dividida por la presión de vapor a la misma temperatura de agua pura. En palabras más sencillas la actividad acuosa es la fracción del agua que sirve para que se lleven a cabo las reacciones químicas, enzimáticas y microbiológicas en los alimentos. A mayor actividad acuosa las reacciones biológicas, químicas y enzimáticas son más rápidas. A menor actividad acuosa las reacciones son más lentas.

La disponibilidad del agua para los microorganismos, se ve afectada no solo, por la cantidad y afinidad de la misma con los solutos de una solución, sino además por la forma física como se encuentra unida el agua al soluto.

La **actividad acuosa** tiene una gran influencia en el crecimiento de los microorganismos, los que más agua requieren son las bacterias (> 0.91), después las levaduras (>0.88), y finalmente los hongos (>0.80); de todos, las bacterias patógenas son las que necesitan actividades acuosas mayores para su crecimiento, mientras que las levaduras osmófilas se pueden desarrollar en actividades acuosas > 0.60 (Badui Salvador;1990). La alteración microbiana de los productos de confitería puede considerarse en función de los datos señalados en la tabla 1 y 2.

Tabla 1

Actividad de agua en diversos productos azucarados

Tipo de producto	a_w
Fondant	0.75 – 0.84
Gelatinas de frutas	0.59 – 0.76
Mazapán	0.65 – 0.70
Malvavisco	0.63 – 0.73
Chicles y pastillas	0.51 – 0.64
Chocolate	0.37 – 0.50
Caramelo	< 0.48
Dulces hervidos	< 0.30

Datos de Cakebread (1971) y Hilker (1976).

Tabla 2.

Mínima actividad del agua (aw) en la que pueden crecer diferentes microorganismos.

Grupo	Mínima aw
Bacterias:	
<i>Escherichia coli</i>	0.935-0.960
<i>Salmonella sp.</i>	0.945
<i>Bacillus subtilis</i>	0.950
<i>Sarcina sp.</i>	0.915-0.930
<i>Micrococcus roseus</i>	0.905
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.900
<i>Halobacterium sp.</i>	0.750
Hongos filamentosos:	
<i>Aspergillus niger</i>	0.88
<i>Aspergillus glaucus</i>	0.78
<i>Xeromyces bisporus</i>	0.60
Levaduras:	
<i>Candida utilis</i>	0.94
<i>Schizosaccharomyces sp.</i>	0.93
Levaduras diversas	0.88
<i>Saccharomyces rouxii</i>	0.60

Datos de scoot. W. J. 1957. Advan. Food Res. 7:83-127

Y de Mossel, D.A. A. Y M. Ingram. 1955. J. Appl. Bacteriol. 18:232-268.

4.2 Características de los mohos y levaduras

Como se ha visto, tanto las bacterias como los mohos y las levaduras son capaces de desarrollarse en los productos de confitería, sin embargo, este estudio se centrará básicamente en los mohos, ya que son los principales responsables de causar la mala apariencia en los productos de malvavisco y fondant, sin embargo también se dará de forma teórica una descripción breve de las características más importantes de las levaduras.

4.2.1 Mohos.

El termino “moho” se refiere a una entidad difícil de definir. Los mohos no corresponden a un grupo sistemático homogéneo, aunque se sitúan dentro de diversas familias de hongos microscópicos. Los mohos pertenecen a casi todos los grupos de hongos. Aunque son particularmente numerosos en:

- Los Zigomicetes: orden Mucorales
- Los Ascomicetes: orden Eurotiales, Microascales y Esferiales.
- Los Deuteromicetes, orden hifales

Los mohos son “saprofitos”, es decir se desarrollan a expensas de sustratos inertes o en vías de descomposición, los mohos poseen un aparato vegetativo constituido por: un talo filamentoso, el micelio, cuyos filamentos se denominan hifas; el micelio puede diferenciarse en órganos muy variados según los grupos, especializados en la multiplicación y en la diseminación, que se conocen con la denominación global de esporas (Banwart, 1982).

La alteración de los productos alimenticios por mohos se debe a las modificaciones que estos producen durante su desarrollo: toman del sustrato todos aquellos elementos propios para edificar su contenido celular y para producir la energía necesaria para sus procesos vitales, transformándolos gracias a sus poderosos sistemas enzimáticos.

Antes de poder ser utilizados, los compuestos de peso molecular elevado, como los polisacáridos (sustancias pécticas, hemicelulosa, celulosa) o de reserva (almidón), los lípidos y las proteínas son transformados en moléculas mas simples gracias a las hidrolasas (celulasas, amilasas, lipasas, proteinazas, etc.). Por otra parte, las reacciones de oxidación y de reducción son realizadas gracias a oxidasas, peroxidasas, deshidrogenasas, desmoldasas, etc.

El estudio del metabolismo de los mohos muestra que estos organismos se comportan como notables agentes de biosíntesis o de bioconversión. Los mohos son aptos para extraer o transformar la mayor parte de los componentes de los alimentos.

Los mohos utilizan como fuente de carbono numerosas moléculas orgánicas (glúcidos, aminoácidos, ácidos orgánicos, compuestos policíclicos, alcaloides, etc.) La mayoría de los mohos utilizan todo tipo de fuentes de nitrógeno (nítrico, amoniacal y orgánico) aunque algunas especies solo pueden crecer en presencia de nitrógeno orgánico (Burgeois, Mescle y Zucca.1994).

El azúfre el fósforo, el potasio, el magnesio y los oligoelementos los obtienen con facilidad de los sustratos que invaden.

Desde el punto de vista práctico, las modificaciones químicas que realizan los mohos de las sustancias alimenticias se traducen en alteraciones del valor nutritivo, alteraciones de las características organolépticas, en dificultades de conservación y a veces en enfermedades (micosis, alergias) o intoxicaciones (micotoxinas).

4.2.1.1 Condiciones de desarrollo de los mohos:

- **Disponibilidad de Oxígeno.** La cantidad de oxígeno disponible es un factor importante en el desarrollo de los hongos. La mayoría son aerobios. Los más exigentes viven en las regiones periféricas de los sustratos, los menos pueden hacerlo en profundidad. Algunos soportan incluso una anaerobiosis muy estricta.
- **Temperatura.** La temperatura juega un papel preponderante en el crecimiento del micelio; interviene igualmente en la esporulación y en la germinación de las esporas. La mayoría de los mohos se desarrollan entre 15 y 30°C. Sin embargo hay algunos que logran un crecimiento lento aunque significativo a -6°C. Los mohos resisten temperaturas muy bajas o muy altas; sus esporas sobreviven y permanecen aptas para germinar cuando se recuperan las condiciones normales.
- **Humedad.** La humedad tiene gran influencia sobre el desarrollo de los mohos: no solamente sobre el crecimiento micelial y la esporulación, sino especialmente sobre la germinación de las esporas. Más que la humedad del sustrato, es la disponibilidad de agua (a_w) el parámetro importante para los mohos. A 25°C, algunas especies (xerófilas) pueden crecer a una $a_w < 0.75$ como los *Aspergillus sp.* del grupo glaucus, *A. Halophilicus*, *A. Restrictus*, *Mallema sebi*, *Xeromyces bisporus* que evidentemente se encuentran sobre frutas secas, confituras, leche en polvo y derivados de cereales. El mayor inconveniente es que no se ponen en evidencia en el laboratorio en medios hidrófilos. Sin embargo, la mayoría de los mohos prefieren una a_w más elevada, de 0.80 a 0.95 incluso a veces la saturación.
- **PH.** La mayoría de los mohos no son demasiado exigentes en cuanto al pH, por otra parte saben ajustarlo rápidamente a su conveniencia. La mayoría prefieren sustratos con un pH entre 4 y 8, aunque algunos toleran pHs mucho más ácidos o muy alcalinos.

4.2.2 Levaduras.

Es difícil dar una definición simple y precisa del término “levaduras”, pues incluye un grupo bastante heterogéneo de hongos. Sin embargo es posible definirlos como hongos microscópicos que, en un estadio de su ciclo biológico, se presentan en forma unicelular y se multiplican por gemación la mayoría, y por escisión algunos. Este grupo de microorganismos comprende unos 60 géneros y unas 500 especies.

La capacidad de las levaduras de formar esporas de origen sexual dentro de un asca, o exteriormente a través de un basidio, permite localizarlas respectivamente en la clase de Ascomycetes y Basidiomycetes. Las especies de las que no se conoce su estado sexual (=estado perfecto) se incluyen dentro de la clase de hongos imperfectos o Deuteromycetes (Banwart, 1982).

Las células de las levaduras son generalmente ovoides o esféricas, a veces cilíndricas o con formas específicas: ojivales, triangulares, en forma de limón, su tamaño varía de 2-50 micras.

Las levaduras están desprovistas de clorofila y, por lo tanto, son incapaces de producir los compuestos orgánicos necesarios para su crecimiento a partir de sustancias minerales, como lo hacen los vegetales superiores, las algas y algunas bacterias. Son pues saprofitas y a veces parásitas.

Las levaduras osmófilas (a excepción del *Debaryomyces hanseni*) son anaerobios facultativos que se multiplican rápidamente en aerobiosis, pero provocan una fermentación intensa en anaerobiosis. Las levaduras osmófilas utilizan preferentemente la fructosa cuando se desarrollan sobre azúcar invertido con cantidades equimoleculares de glucosa y fructosa.

Las levaduras no dan lugar a intoxicaciones alimentarias y únicamente *Candida Albicans* y *Cryptococcus neoformans* son patógenas. Aunque no originan problemas sanitarios en los alimentos si ocasionan alteraciones en algunos de ellos: productos azucarados y ácidos. Las levaduras toleran mejor los azúcares que las sales (Burgeois, Mesclé y Zucca .1994).

4.2.2.1 Condiciones de desarrollo de las levaduras:

- **Disponibilidad de Oxígeno.** Para su crecimiento necesitan oxígeno, fuentes de carbono orgánicas y nitrógeno mineral u orgánico, diversos minerales y una temperatura y pH adecuados. Todas las levaduras utilizan la D-glucosa, la D-fructosa y la D-manosa. Las levaduras utilizan numerosos sustratos carbonados, bien sea por vía oxidativa únicamente

- (*Cryptococcus*, *Rhodotorula*) o, por vía fermentativa. En este último caso, vía fermentativa o anaeróbica, se produce etanol y CO₂.
- **Temperatura.** La temperatura de crecimiento está comprendida entre 5 y 37°C, el valor óptimo se sitúa hacia los 25°C. En algunos casos la multiplicación vegetativa tiene lugar incluso a 0°C, pero el crecimiento es muy lento.
- **Humedad.** El contenido de agua del medio es también un factor importante para el crecimiento. Algunas levaduras son osmotolerantes y soportan aw del orden de 0.65 (*Zygosaccharomyces rouxii*), valor al que ningún otro microorganismo puede desarrollarse.
- **PH.** El pH óptimo para el crecimiento de las levaduras varía de 4.5 a 6.5 aunque muchas especies toleran grandes variaciones de pH (de 2.8-8.5).

4.3 Control microbiano con agentes químicos

Un **antimicrobiano** es una sustancia química que mata o inhibe el desarrollo de los microorganismos. Esa sustancia puede ser sintética o natural. Los agentes que matan organismos se llaman agentes “**germicidas**”, con un prefijo que indica la clase de organismo al que matan. Así, tenemos agentes **bactericidas**, **fungicidas** y **algicidas**. Un agente **fungicida** mata hongos, los agentes que no matan, sino que solamente inhiben el crecimiento se llaman agentes “**estáticos**” y podemos hablar de agentes **bacteriostáticos**, **fungistáticos** y **algistáticos**. La distinción entre un agente “estático” y un “cida”, es a menudo arbitraria, pues un agente es cida a altas concentraciones y puede ser estático a concentraciones menores. Para ser efectivo, un agente estático debe estar presente continuamente ya que si se elimina o se neutraliza su actividad, el organismo presente puede iniciar su desarrollo, si las condiciones son favorables (Brock T.D y Madigan M.T. 1993).

Los agentes **antimicrobianos** pueden variar en su toxicidad selectiva. Algunos actúan de un modo no selectivo y tienen efectos similares sobre células de todos los tipos. Otros son mucho más selectivos y más tóxicos para los microorganismos que para los tejidos animales. Los agentes **antimicrobianos** con toxicidad selectiva son especialmente útiles como agentes **quimioterapéuticos** en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, ya que se pueden emplear para matar a los microbios causantes de la enfermedad, sin causar daño al huésped (ver tabla 3).

Tabla 3

Diferentes modos de acción selectiva de los antimicrobianos.	
Modo de acción	
•	Combinación con los grupos SH de las proteínas
•	Precipitación o inactivación de proteínas
•	Disolución de lípidos y desnaturalización de proteínas
•	Rompimiento de enlaces β 1-4 glucosídicos
•	Interacción con los fosfolípidos de la membrana.
•	Inhibición de enzimas
•	Agentes oxidantes

Los agentes **antimicrobianos** afectan el crecimiento en varias formas. Se pueden observar tres clases diferentes de efectos cuando se adiciona un agente **antimicrobiano** a un cultivo de mohos. Como ya se mencionó, un efecto **fungistático** se observa cuando el crecimiento se inhibe, pero no hay la acción de matar. Los agentes fungistáticos suelen inhibir la síntesis de proteínas y actúan fijándose sobre los ribosomas. Sin embargo, esta unión no es muy firme y cuando se disminuye la concentración del antimicótico el ribosoma se ve libre y se vuelve a dar el crecimiento. Los agentes **fungicidas** evitan la proliferación e inducen la muerte pero no tiene lugar la lisis o ruptura celulares, éstos generalmente se unen muy íntimamente con sus blancos celulares y no pueden eliminarse por dilución. Los agentes **bacteriolíticos** inducen la muerte por lisis celular, lo que se observa como una disminución en el número de células. Los agentes bacteriolíticos incluyen a los antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular, como la penicilina, así como los agentes que actúan sobre la membrana celular.

Los antimicrobianos tienen diferentes modos de actuar en la célula y pueden ser muy específicos o muy generales, también pueden unirse a su blanco de diferentes formas (ver tabla 4).

Tabla 4

Diferentes formas de unirse de los antimicrobianos a su blanco en la célula.

Blanco en la célula

- Pared celular
 - Membrana celular
 - Proteínas
 - DNA
 - Ribosomas
 - Enzimas
-

4.4 Desinfectantes y antisépticos.

Son agentes **antimicrobianos** que se usan en situaciones muy diferentes. Los **desinfectantes** son sustancias que matan a los microorganismos y se usan sobre objetos inanimados. Los **antisépticos**, por otro lado, son agentes químicos que matan o inhiben el desarrollo de microorganismos y que no son suficientemente tóxicos para su aplicación sobre tejidos vivos. Los agentes químicos **antimicrobianos** que se suelen denominar germicidas, tienen un amplio uso en situaciones donde no es práctico usar calor en la esterilización (Brock T.D y Madigan M.T. 1993).

Aunque las pruebas de germicidas en las condiciones de laboratorio es relativamente sencilla en la práctica la determinación de la eficacia suele ser muy difícil. Esto se debe a que muchos germicidas son neutralizados por materiales orgánicos, de modo que la concentración del germicida no se mantiene durante suficiente tiempo. Además, los mohos y otros microorganismos están recubiertos de partículas y la penetración del agente químico a las células viables puede ser lenta o nula. También las esporas de mohos y bacterias suelen ser muy resistentes a los germicidas. Así la efectividad del germicida finalmente debe ser probada bajo condiciones pretendidas de uso. Se debe destacar que los tratamientos con germicidas no necesariamente esterilizan. Se define **esterilidad** a la ausencia total de organismos vivos y la esterilización con sustancias químicas requiere períodos largos de contacto bajo condiciones especiales.

4.5 Conservación química de los alimentos.

Aunque las sustancias químicas nunca se deben utilizar para sustituir una higiene cuidadosa en los alimentos, hay numerosos agentes químicos antimicrobianos que se utilizan comercialmente para controlar el crecimiento microbiano de los alimentos. Aunque hay una gran cantidad de sustancias antimicrobianas que probablemente sean adecuadas como conservadores de alimentos, solo algunas han sido clasificadas por la administración de alimentos y fármacos de EUA (U.S. Food and Drug Administration) “como generalmente seguros” y tienen una gran aplicación en la industria alimenticia. Muchas de estas sustancias, como el propionato de sodio, se han utilizado por muchos años sin evidencia de toxicidad humana. Otras, como los nitritos, los óxidos de etileno o de propileno, o los antibióticos, son sustancias más controvertidas por la evidencia de que estos compuestos causan detrimento a la salud humana (ver tabla 5).

Los nitritos pueden reaccionar a pH ácido con las aminas secundarias del organismo para formar nitrosamina, una clase de compuestos químicos potencialmente carcinogénicos. Los óxidos de etileno y de propileno son agentes quelantes y, por consiguiente, mutagénicos y se ha sugerido que estos compuestos también son carcinogénicos.

En los últimos años se han buscado nuevos conservadores que tengan la capacidad de proteger los alimentos sin afectar la salud humana. Sin embargo ha sido una tarea difícil ya que ha veces se requiere de muchos años para conocer los verdaderos efectos de las sustancias químicas en la salud humana. A pesar de ello han aparecido conservadores de origen natural que han tenido un buen efecto en la inhibición de los microorganismos y en los cuales no se han detectado hasta el momento efectos tóxicos. Entre estas sustancias están los extractos de algunas plantas, por ejemplo se puede destacar el extracto cítrico de semillas de toronja que ya ha sido probado con éxito en la industria alimentaría, sin embargo una desventaja de esta sustancia es el residual amargo que deja en los alimentos, a mayor concentración el efecto antimicrobiano es mejor pero el residual amargo se intensifica notablemente afectando la calidad de los productos.

4.6 Conservador natural (Nuevo Desfan-100).

El ND-100 es un conservador natural, desinfectante orgánico, bactericida, fungicida, algicida, y dependiendo de la dosis tiene efecto bacteriostático o bacteriolítico (Janssen. 1988).

El Nuevo Desfan-100 es un extracto cítrico de las semillas de toronja (***Citrus máxima***), su ingrediente activo aun no se conoce con exactitud pues el extracto es una mezcla de compuestos muy diversos, entre los que podemos mencionar están

algunos ácidos orgánicos, ácido cítrico y flavonoides (Cartaya, Reynaldo y Nogueiras, 2002). Además como Nuevo Desfan-100 contiene ácido ascórbico natural y glicerina orgánica como estabilizante .

Tabla 5

Conservadores químicos utilizados en algunos alimentos.

Sustancia química	Alimentos
Propionato de sodio o calcio	Pan
Benzoato de sodio	Bebidas carbonatadas, jugos de frutas, encurtidos, margarina conservas y confites.
Cloruro de sodio (salmueras)	Aceitunas
Ácido cítrico	Dulces
Ácido sórbico	Productos cítricos, quesos, encurtidos, ensaladas.
Bióxido de azufre, sulfitos, bisulfitos	Frutas y legumbres secas, vino.
Formaldehído (del proceso de Ahumado de alimentos)	Carne, pescados
Óxidos de etileno y propileno	Espicias, frutas secas, nueces
Nitrito de sodio	Jamón ahumado, tocino.

A las dosis que se utiliza el Nuevo Desfan-100 en los alimentos no genera toxicidad, es biodegradable y tiene efecto deodorizante, actúa por contacto, por lo que no genera inmunoresistencia microbiana, su alta solubilidad permite que sea fácil de transportar por microcapilaridad por lo que puede considerarse como semisistémico de contacto. Puede mezclarse con productos de naturaleza ácida y/o alcalina sin alterar su efecto bactericida, fungicida o algicida. Para propósitos de este trabajo se abreviara el nombre de Nuevo Desfan-100 a ND-100 (Rodza, 2003).

El ND-100 es un producto nuevo en el mercado, sin embargo sus efectos germicidas son notorios y ésta siendo utilizado ya por algunas industrias alimentarias importantes en el país. En Venezuela se han realizado algunos estudios donde se aplicaron extractos cítricos a polluelos para combatir la enfermedad de la coccidiosis aviar y no se detectaron efectos tóxicos en los animales (Tamasaukas, Ruiz, Theis, De Basilio, Herrera, Aguirre y Roa. 1997). Se han planteado algunos mecanismos por medios de los cuales el ND-100 ataca a los microorganismos, sin embargo no se conoce con exactitud los receptores a los cuales se une para actuar.

4.7 Mecanismos de acción del ND-100.

Se han propuesto algunos mecanismos mediante los cuales el ND-100 actúa en las células de los microorganismos, estos mecanismos están dados a nivel bioquímico sobre la pared celular y membrana plasmática. Como éste trabajo se centro básicamente en los mohos, los mecanismos que se sugieren a continuación se detallan sobre una célula eucariótica típica de los hongos.

4.7.1 Rompimiento de enlaces beta 1-4 glucosídicos de la pared celular.

La pared celular de los hongos es una estructura rígida que recubre la membrana celular y proporciona soporte y protección. Las paredes celulares fúngicas se parecen a las paredes celulares de las plantas en su estructura, pero no químicamente. Aunque en las paredes de algunos hongos hay celulosa, muchos de ellos contienen paredes no celulosicas. La quitina, un polímero de la N-acetilglucosamina es un constituyente común de las paredes celulares fúngicas.

La quitina se extiende en haces de microfibrillas como la celulosa; en algunas paredes celulares de los hongos la quitina es remplazada por otros glucanos, como mananos, galactosanos, y quitosanos. En general las paredes celulares fúngicas tienen entre un 80 y un 90% de polisacáridos, y junto con proteínas, lípidos, polifosfatos y iones inorgánicos forman la matriz cementante de la pared, dichos polisacáridos forman enlaces β -1,4-glucosídicos que le confieren rigidez a la pared celular (Fig. 1).

No se conoce exactamente que sustancia del extracto cítrico es la responsable de romper el enlace β -1,4-glucosídico, pero se cree que es una enzima que actúa de forma parecida a la lisozima de la penicilina. Una vez rota la pared celular deja de cumplir sus funciones de protección, en ese momento la membrana es más susceptible a sufrir daños por factores del medio externo, por ejemplo puede sufrir plasmolisis (Fig. 2)

4.7.2 Inactivación de proteínas celulares de la membrana plasmática.

La membrana celular, es una estructura delgada que rodea por completo a la célula. De solamente 8 nm de grueso, esta estructura vital es la barrera crítica que separa el interior de la célula (el citoplasma), de su medio ambiente. Si la membrana se rompe (plasmolisis), se destruye la integridad de la célula, el contenido interno se sale, y la célula muere. La membrana celular también es una barrera sumamente selectiva, que permite a la célula concentrar metabolitos específicos y excretar materiales de desecho.

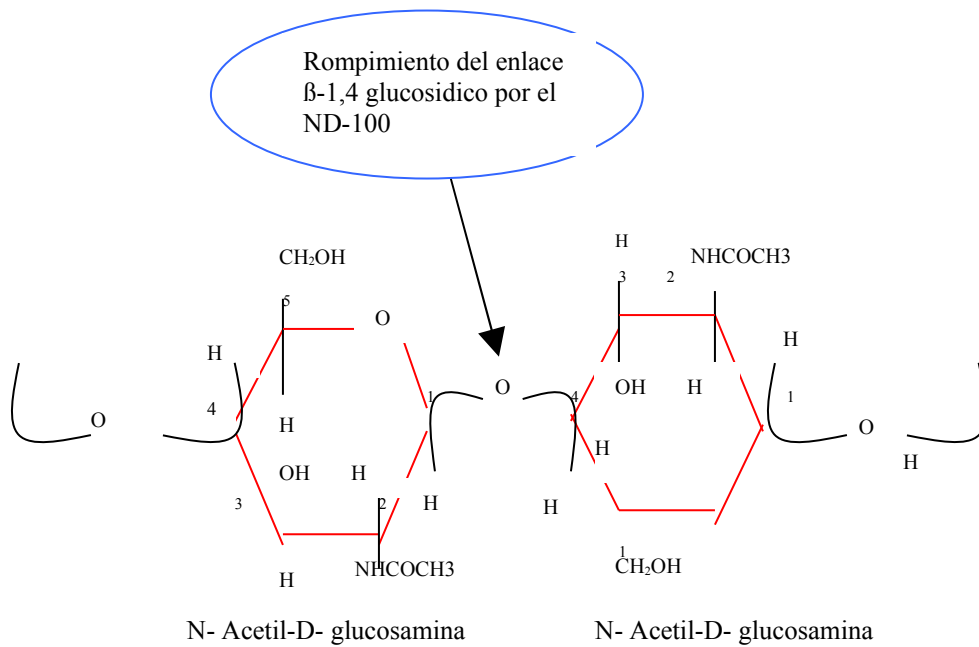


Fig. 1. Estructura de la quitina, un homopolímero de unidades de N-acetil-D- glucosamina con enlaces (β 1-4) (Tomado de Lehninger, 2000).

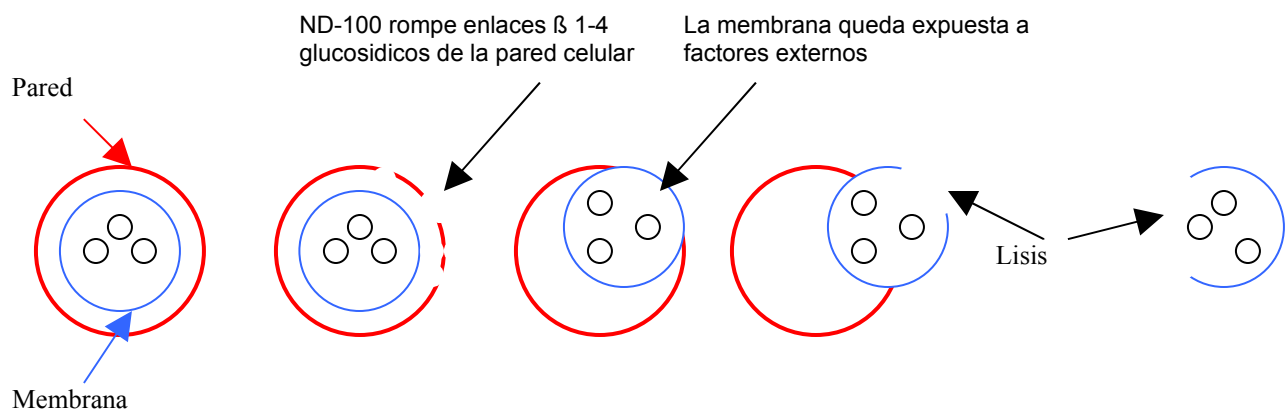


Fig. 2 Mecanismo de acción del ND-100 en la pared celular.

La estructura general de la mayor parte de las membranas biológicas es una doble capa fosfolípida. Los lípidos son moléculas químicamente únicas, los fosfolípidos contienen partes altamente hidrofóbicas (ácidos grasos) y partes hidrofílicas (glicerol), y pueden existir en muchas formas químicas diferentes como resultado de la variación en la naturaleza de los ácidos grasos o de los grupos portadores de fosfatos unidos al esqueleto de glicerol (fig. 3).

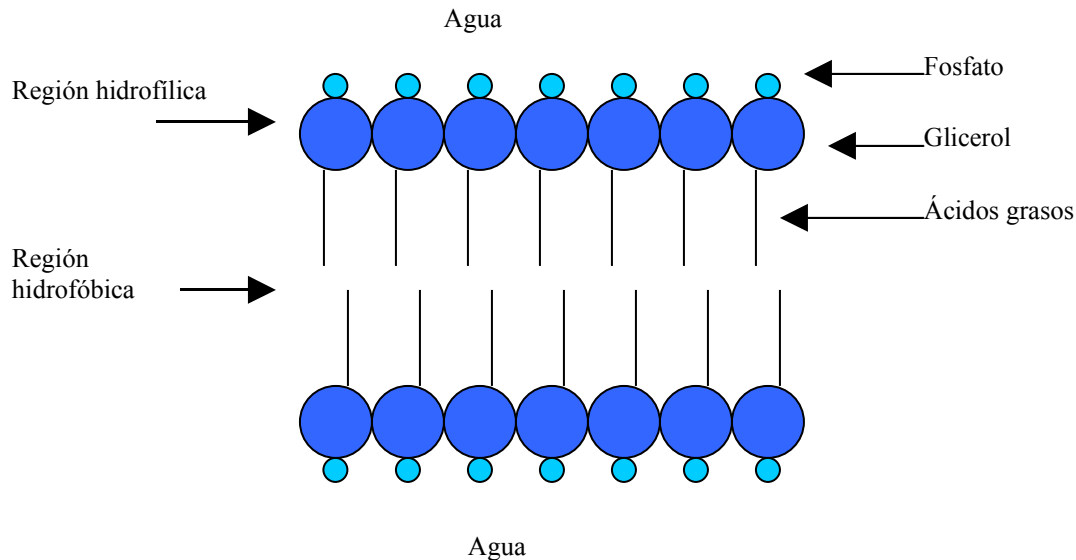


Fig. 3 Estructura fundamental de una doble capa de fosfolípidos.

El componente principal de la membrana es la doble capa lipídica, compuesta por fosfolípidos y proteínas, Las principales proteínas de la membrana celular están incluidas en la matriz fosfolipídica (fig. 4). Estas proteínas suelen tener superficies externas muy hidrofóbicas, que se asocian íntimamente con las posibles cadenas de ácidos grasos altamente no polares. Las moléculas de proteína también se encuentran unidas a los grupos iónicos de los fosfolípidos.

La membrana plasmática no es solamente la barrera que separa el interior del exterior. Tiene un papel muy importante en la función de la célula. A través de la membrana celular deben pasar todos los nutrientes y también deben salir todos los productos de desecho. La mayor parte de las moléculas que se mueven a través de la membrana no se mueven pasivamente; se dice que las moléculas son transportadas a través de la membrana. A pesar de su delgadez, la naturaleza hidrofóbica de la membrana de la célula le permite funcionar como una barrera resistente. Algunas sustancias pequeñas, no polares y solubles en grasas, como ácidos grasos, alcoholes y benceno pueden penetrar fácilmente las membranas

celulares disolviéndose en la fase lipídica de la membrana. Sin embargo, las moléculas cargadas como los azúcares, ácidos orgánicos, los aminoácidos y las sales inorgánicas, que son hidrofílicas, no pasan fácilmente la barrera de la membrana. Estas moléculas pasan la membrana gracias a la acción de las proteínas de transporte de las membranas.

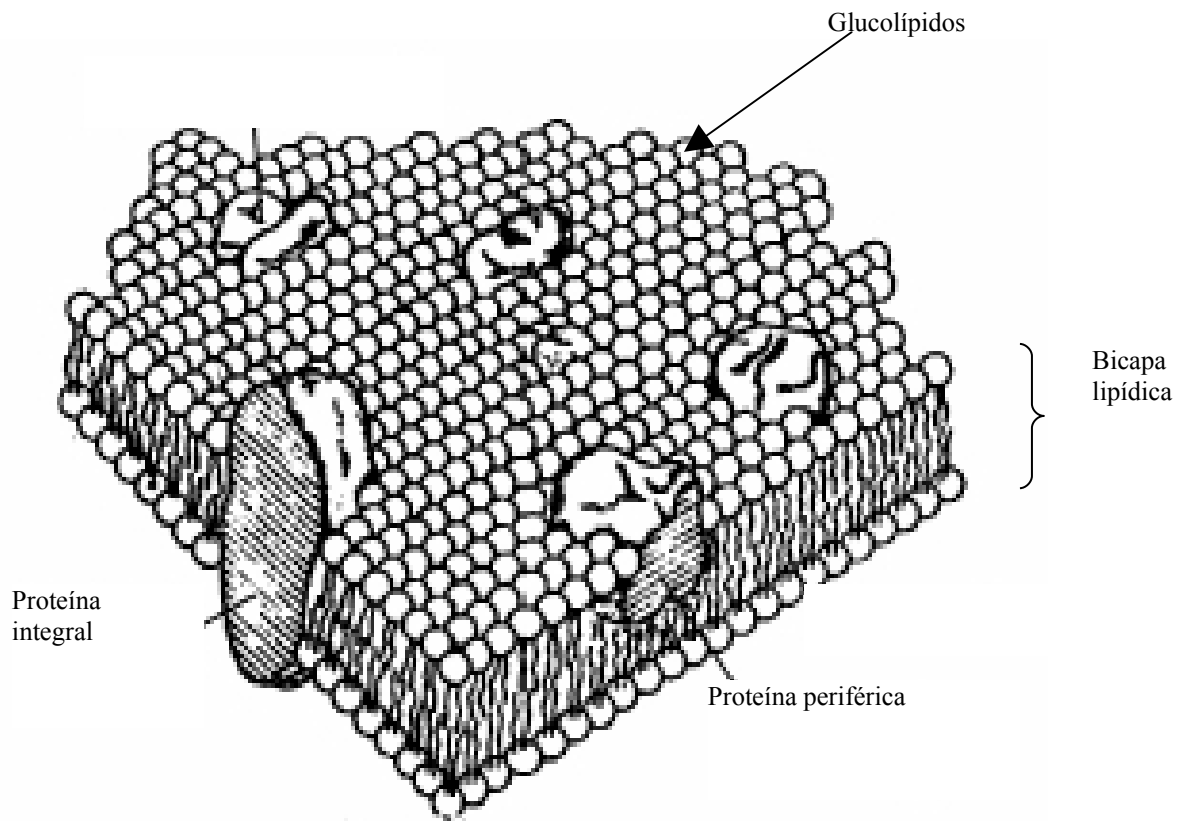


Fig. 4 Estructura de la membrana celular (Tomado de Brock y madigan. 1993)

Se han identificado tres clases de proteínas de transporte. Los **uniportadores** son proteínas que transportan una sustancia de un lado de la membrana a otro. Los **inportadores** transportan la sustancia de interés a través de la membrana junto con una segunda sustancia que se requiere para transportar a la primera.

Los **antiportadores** transportan una sustancia a través de la membrana en una dirección, mientras transportan la segunda sustancia en la dirección opuesta (Fig. 5).

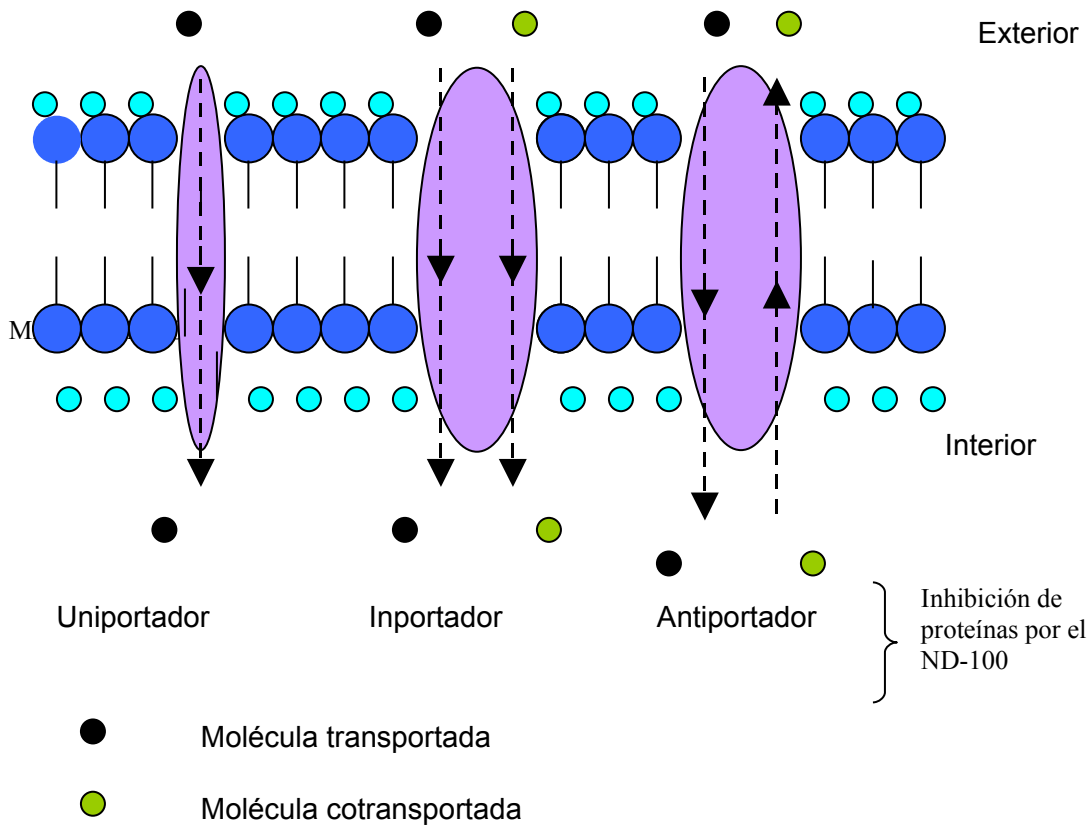


Fig. 5 Mecanismo de transporte de proteínas en las membranas celulares (Tomado de Brock y madigan. 1993)

La necesidad de mecanismos de transporte mediado en los microorganismos se puede apreciar fácilmente. Si la difusión fuera el único medio de transporte disponible, las células podrían no ser capaces de adquirir las concentraciones adecuadas de solutos. En los procesos de difusión, tanto la velocidad de captación como el nivel intracelular son proporcionales a la concentración externa. Los mecanismos de transporte mediado solucionan este problema haciendo posible que la célula acumule solutos en contra del gradiente de concentración.

Una característica del transporte mediado por un acarreador es la naturaleza altamente específica del evento de transporte. Algunas proteínas acarreadoras reaccionan solamente con una clase única de moléculas.

Algunos compuestos antimicrobianos destruyen las propiedades de permeabilidad selectiva de la membrana. Estas sustancias son moléculas hidrofóbicas que se disuelven en las dobles capas lipídicas y permiten la difusión pasiva de sustancias

ionizadas hacia dentro o hacia fuera de la célula. La membrana al perder su capacidad de formar gradientes de concentración impide las funciones celulares, y esto se convierte en un factor letal para los microorganismos (Rodney y Boyer 1999).

Se cree que el ND-100 al poseer un carácter hidrofóbico, logra disolverse en la doble capa lipídica e inactivar las proteínas de transporte de las membranas de las células fúngicas de esta manera impide el funcionamiento normal de la célula y provoca su muerte o inhibición (Fig. 5).

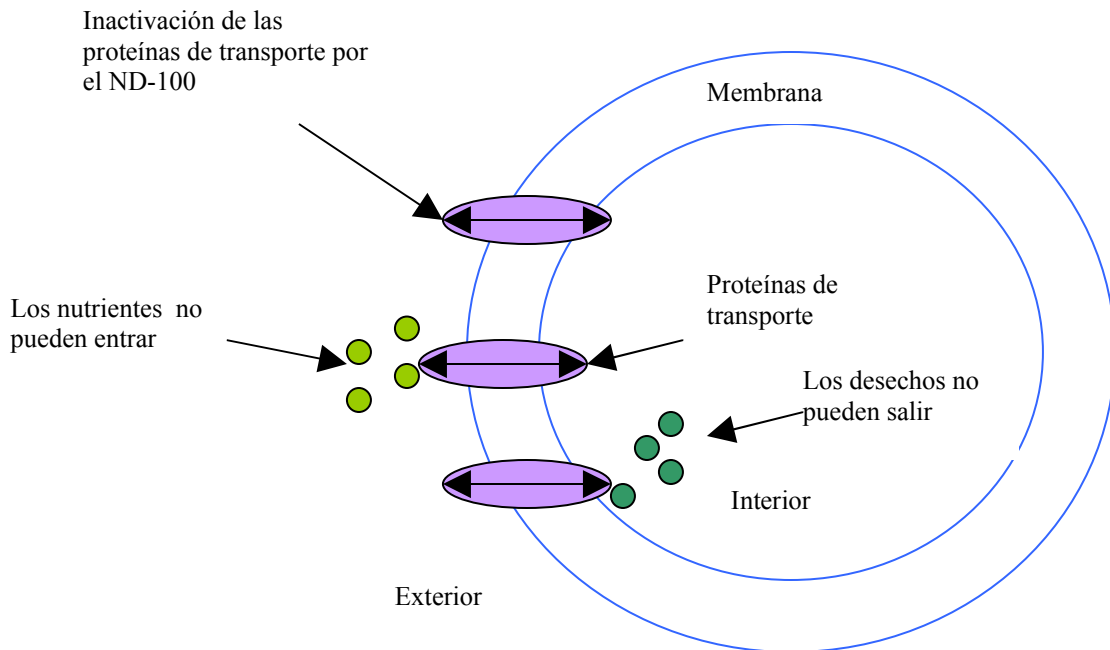


Fig. 6 Mecanismo de acción del ND-100 en la membrana plasmática.

4.8 Características físicas de los productos de malvavisco y fondant.

Los malvaviscos trampados tienen una consistencia suave al tacto y al morder, son de sabor fresa y están cubiertos con chocolate semiamargo, el cual le confiere un toque amargo al malvavisco, no hay un predominio del sabor entre la fresa y el chocolate lo que le confiere homogeneidad en el sabor.

Las mentas son de consistencia suave al morder, pero firmes al tacto, son de sabor menta y están cubiertos con chocolate semiamargo, no hay un predominio

del sabor entre la menta y el chocolate lo que le confiere homogeneidad en el sabor.

Las cremas de naranja son de consistencia suave al morder, pero firmes al tacto, son de sabor naranja, el sabor es intenso incluso llega a picar la lengua si se consumen sin el trampado, hay un ligero predominio del sabor de la naranja sobre el chocolate.

Los productos donde se pretende emplear ND-100 poseen características muy particulares que pueden o no favorecer el desarrollo de los microorganismos. Por ejemplo las mentas y las cremas de naranja tienen menos agua que los malvaviscos (8 % de humedad) pero tienen la característica de poseer **agua libre** en una cantidad que favorece un ambiente rico en humedad, situación indispensable para el desarrollo de los hongos y de cualquier microorganismo. Por el contrario los malvaviscos contienen mas agua que las mentas (11% de humedad) pero no poseen tanta **agua libre** lo cual es desfavorable para el desarrollo de los hongos. Sin embargo aún cuando el producto se encuentre sanitariamente aceptable, si las condiciones ambientales son favorables (humedad y temperatura alta) se puede iniciar la proliferación de cualquier microorganismo.

Otra característica de las mentas es su capacidad de formar cristales, por lo tanto, tenderá a tener más agua libre y menos **agua ligada**, bajo ciertas circunstancias los **cristales** pueden favorecer la absorción de humedad del medio ambiente. Por el contrario, el malvavisco no forma cristales, por lo tanto tenderá a ligar mas agua y habrá menos agua disponible. Sin embargo, si las condiciones ambientales son favorables (humedad y temperatura alta) puede llegar a desarrollar hongos como se ha observado, aunque su tendencia es menor que en el caso de las mentas.

4.9 Vida de anaquel y condiciones de almacenaje del malvavisco y Productos de Fondant.

Los malvaviscos tienen un tiempo de vida medio de 7 meses y las mentas y cremas de naranja de 8 meses. Estos productos no deben almacenarse a temperaturas mayores a los 22° C para evitar que la cubierta de chocolate se derrita. De igual forma no deben almacenarse en lugares donde la humedad relativa sea mayor a 70% debido a que pueden absorber humedad del medio y esto puede favorecer el desarrollo de los microorganismos, además de que la humedad provoca manchas en la cubierta del chocolate. No deben almacenarse cerca de sustancias olorosas para evitar que se contaminen con olores indeseables.

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general.

- Inhibir el desarrollo de mohos en los productos de malvavisco y fondant (mentas y cremas de naranja), con el fin de asegurar productos higiénicos y una adecuada vida de anaquel.

5.2 Objetivos particulares.

- Evaluar sensorialmente el efecto residual del ND-100 a diferentes concentraciones en malvavisco y fondant (mentas y cremas de naranja) trampados y sin trampar.
- De la evaluación sensorial seleccionar la dosis mas adecuada de ND-100 para realizar las pruebas microbiológicas (mentas y cremas de naranja).
- Evaluar el efecto inhibidor del ND-100 en una cepa de mohos con la dosis seleccionada para los malvaviscos y mentas sin trampar, al día uno de su aplicación.
- Evaluar el efecto residual del ND-100 con la dosis seleccionada para el malvavisco y menta a los 15 y 30 días de su aplicación.

6. MATERIAL Y METODO.

6.1 Primera etapa, evaluación sensorial.

Este procedimiento aplica para malvavisco, mentas y cremas de naranja:

- 1) El primer paso fue seleccionar las dosis con las cuales se iniciarían las pruebas, para ello los proveedores propusieron algunas.
- 2) Se decidió iniciar las pruebas con el malvavisco, posteriormente mentas y al final cremas de naranja.
- 3) Las concentraciones evaluadas fueron las siguientes: 0.01%, 0.03%, y para algunos casos 0.04%, 0.05% y 0.1%. Estas concentraciones se compararon con un testigo.
- 4) Se dosificó con micropipeta cada concentración de ND-100 en 200g de producto (malvavisco, mentas y cremas de naranja) y se mezcló perfectamente.
- 5) Se depositó en almidón cada producto y se dejó reposar 24 hrs.
- 6) Una parte del producto se trampó (se cubrió con chocolate) y la otra permaneció sin trampar para ser evaluada sensorialmente, y así poder comparar como enmascara el chocolate semiamargo el sabor residual del ND-100.
- 7) Para la evaluación sensorial se utilizó la **Prueba de comparación apareada simple**, en esta prueba se presentaron solamente dos muestras al evaluador y se le pidió que identificara la muestra más amarga, una de ellas fue la muestra de referencia o testigo y la otra fue la muestra a evaluar, con cada dosis se realizó la misma prueba (Anzaldúa 1990).
- 8) Se realizó el ajuste de concentración de acuerdo a las observaciones en los casos que así lo ameritaron. Ver diagrama A.

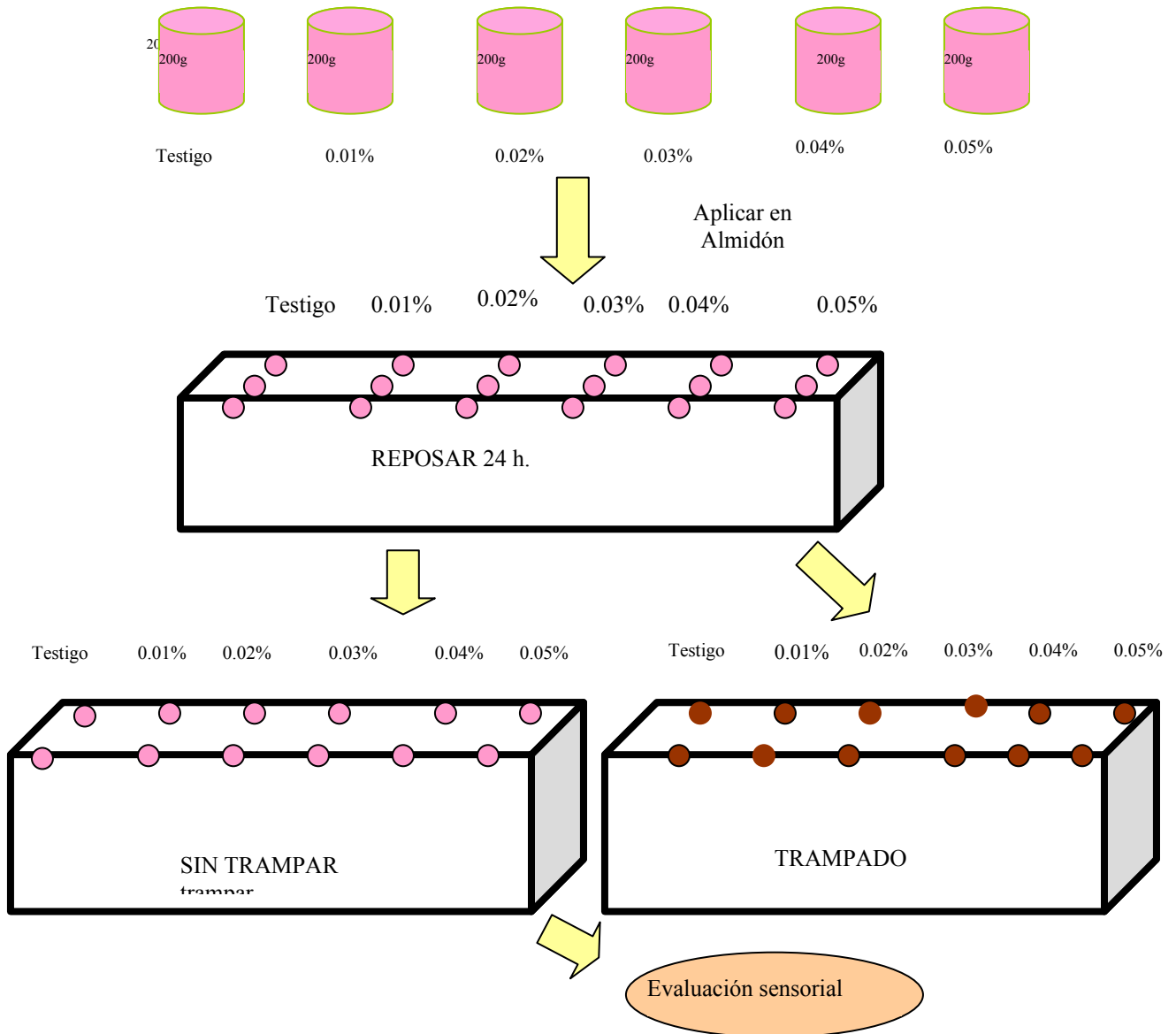
Nota 1: El malvavisco fue el primer producto en evaluarse debido a que su producción en planta es mas constante y ello permitió programar las pruebas en un tiempo mas corto, después se evaluó la menta y al final las cremas de naranja, siguiendo el mismo criterio.

Nota 3: El proveedor del ND-100 propuso iniciar las pruebas con las dosis de 0.1, 0.05 y 0.01%. De acuerdo con su experiencia la dosis de 0.1% tiene un buen efecto inhibitor pero desconocía su efecto en el sabor del malvavisco, por ello se selecciono una dosis intermedia (0.05%) y una baja (0.01).

Nota 4: En la segunda prueba con malvavisco (ver resultados cuadro 1) se reajustaron las dosis a 0.03 y 0.04%.

Nota 5: Los resultados de las pruebas sensoriales con malvavisco ayudaron a definir las dosis para las mentas y cremas de naranja.

Diagrama A. Aplicación de ND-100 en Malvavisco para evaluación sensorial.



Para la evaluación sensorial se utilizó el siguiente formato:-

Nombre:
Fecha:
Producto:

Pruebe las dos muestras de malvavisco e indique
Cual es la mas amarga.
Marque con una X la muestra mas amarga

A B

Observaciones:

Diagrama B. Aplicación de ND-100 en mentas para evaluación sensorial.

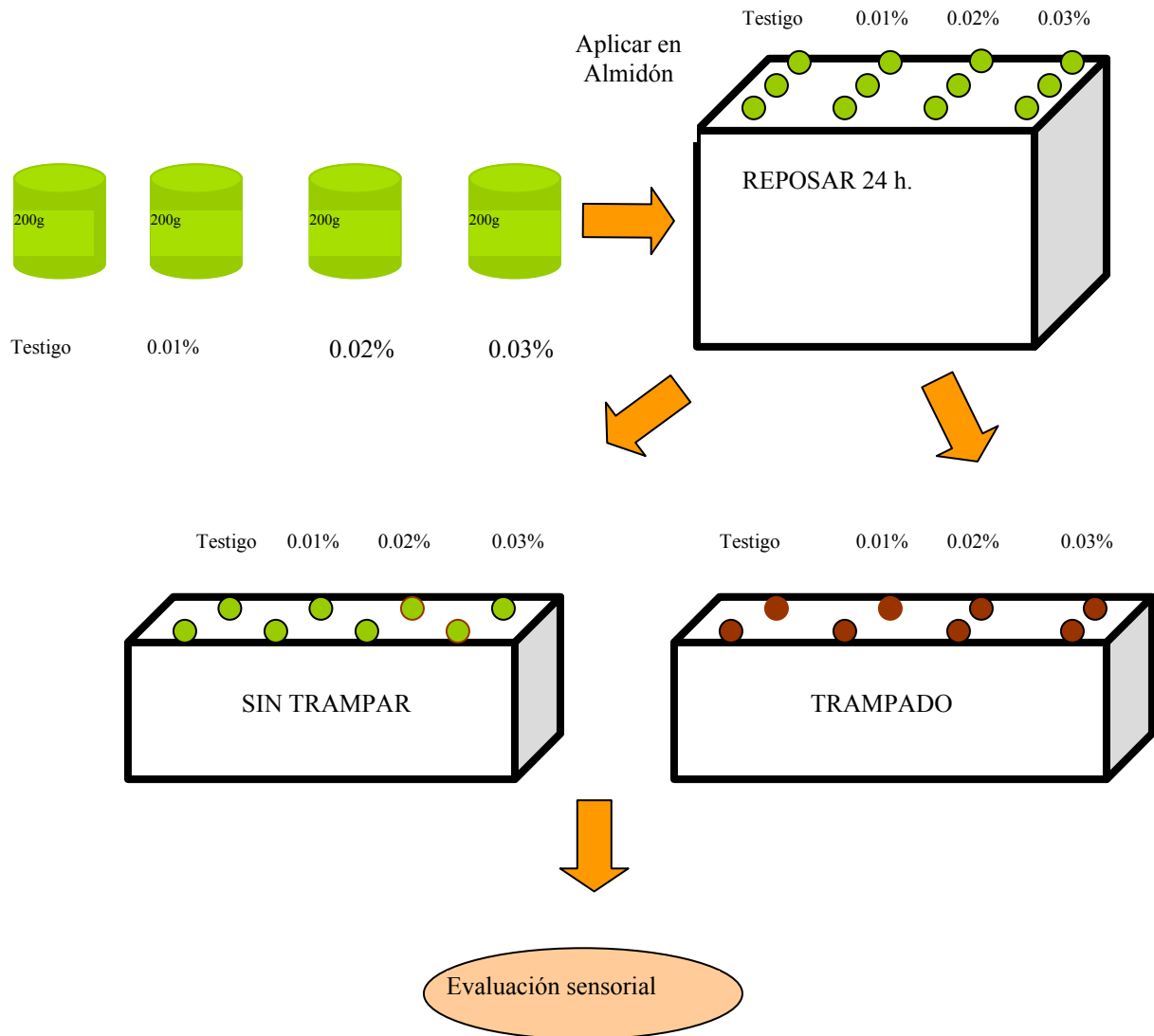
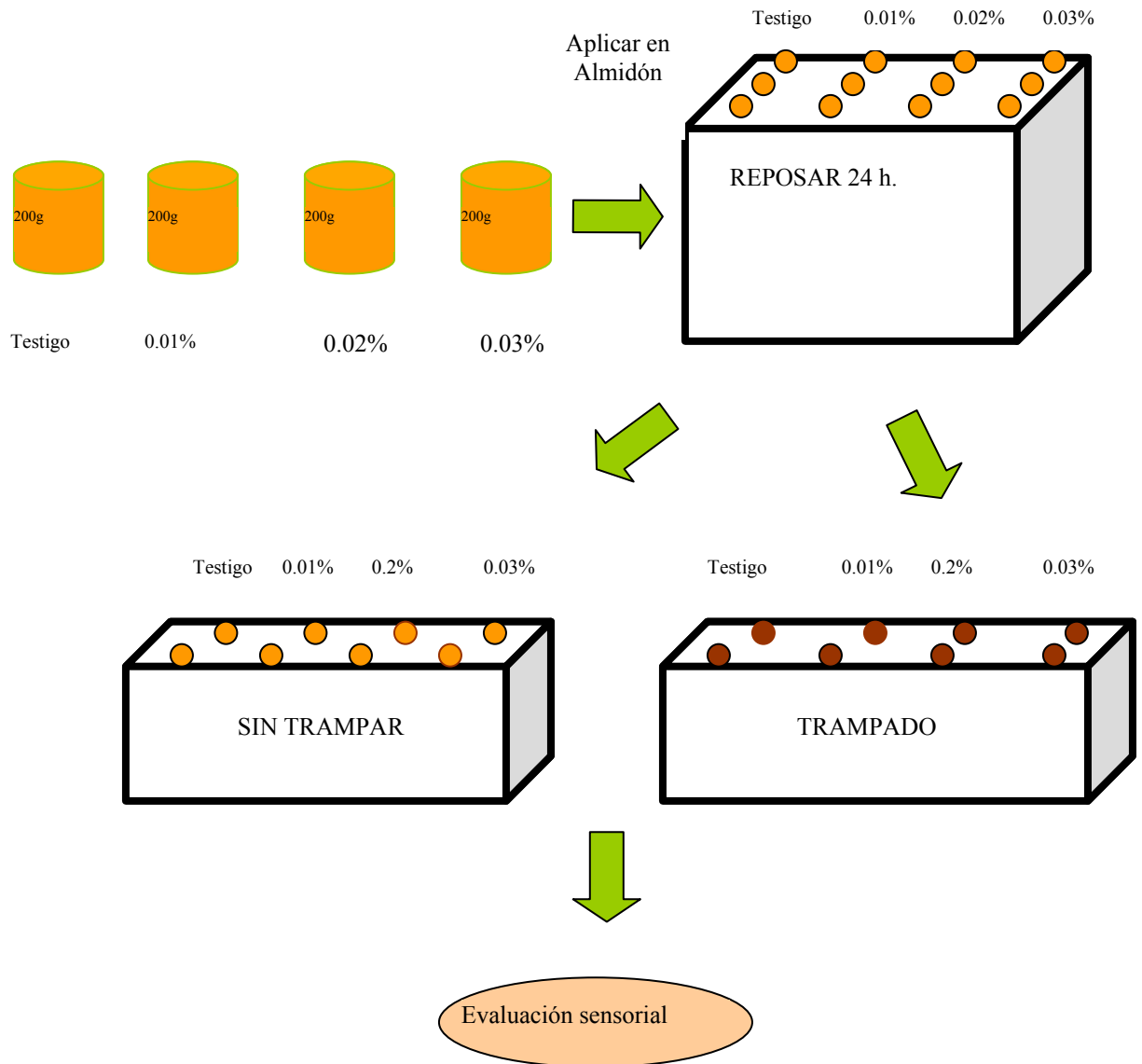


Diagrama C. Aplicación de ND-100 en cremas de naranja para evaluación sensorial.

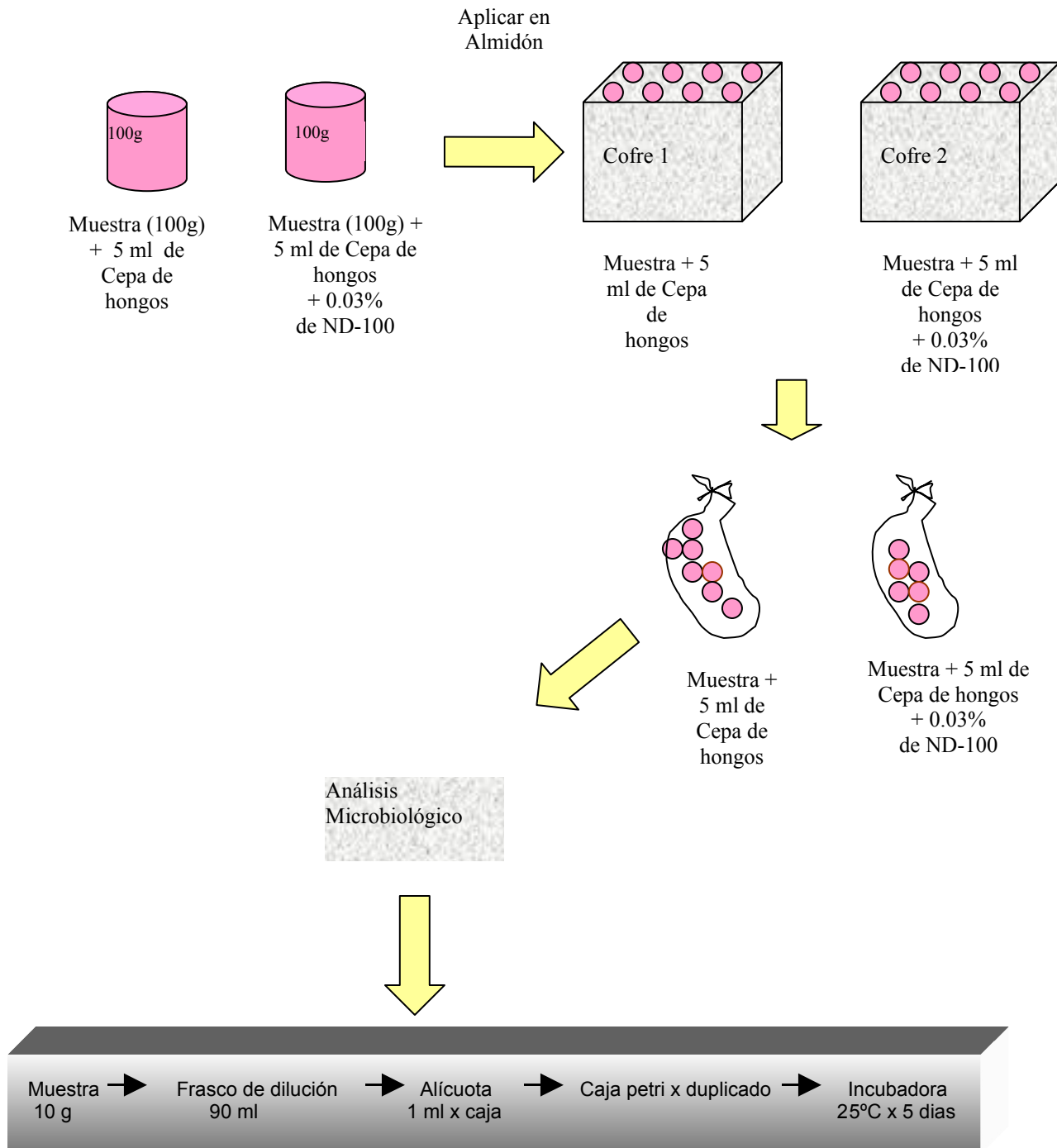


6.2 Segunda etapa, evaluación del efecto inhibitor del ND-100 en una cepa de hongos.

Este procedimiento aplica para mentas y malvavisco sin trampar, las cremas de naranja se omitieron en esta prueba por presentar las mismas características que las mentas.

- 1) Se esterilizó el material a emplear en una autoclave a 125° C y 15 libras de presión durante 15 min.
- 2) Se lavó con jabón y se desinfectaron las mesas de trabajo con una solución sanitizante.
- 3) Se pesaron 100g de muestra en un vaso de 250 ml y se inocularon 5 ml de una cepa de hongos.
- 4) Se pesaron 100g de muestra en un vaso de 250 ml y se inocularon 5 ml de una cepa de hongos y 0.03 % de ND-100.
- 5) La cepa de hongos se preparó a partir de un micelio desarrollado en la superficie de unos malvaviscos que se tenían como muestra de retención. Para ello se raspó la superficie del malvavisco con una asa, posteriormente se colocó el micelio en un frasco con agua peptonada como medio de enriquecimiento y se dejó incubar durante 5 días a 25° C.
- 6) Cada una de las muestras fue homogeneizada perfectamente.
- 7) Se depositó cada muestra en un cofre con almidón previamente moldeado con la figura del malvavisco y la menta, se identificó cada muestra. Se dejó reposar 24 h a temperatura ambiente.
- 8) Se sacaron las muestras del almidón y se quitó el excedente del mismo.
- 9) Se guardó el producto en bolsas estériles.
- 10) Se realizó un análisis microbiológico de las dos muestras.
- 11) Se preparó un medio comercial de agar papa dextrosa para sembrar las muestras.
- 12) Se pesaron 10 g de muestra y se depositó en un frasco con 90 ml de agua peptonada como medio de dilución (NOM-110-SSA1-1994).
- 13) Se tomó una alícuota de 1 ml (dilución 10^{-1} y se vació en una caja de petrí por duplicado, posteriormente se vació el agar papa dextrosa en la caja y se homogeneizó (NOM-111-SSA1-1994).
- 14) Se dejó incubar por 5 días a 25° C. Ver diagrama D.

Diagrama D. Aplicación de ND-100 en *mentas* y *malvavisco* para su evaluación microbiológica.

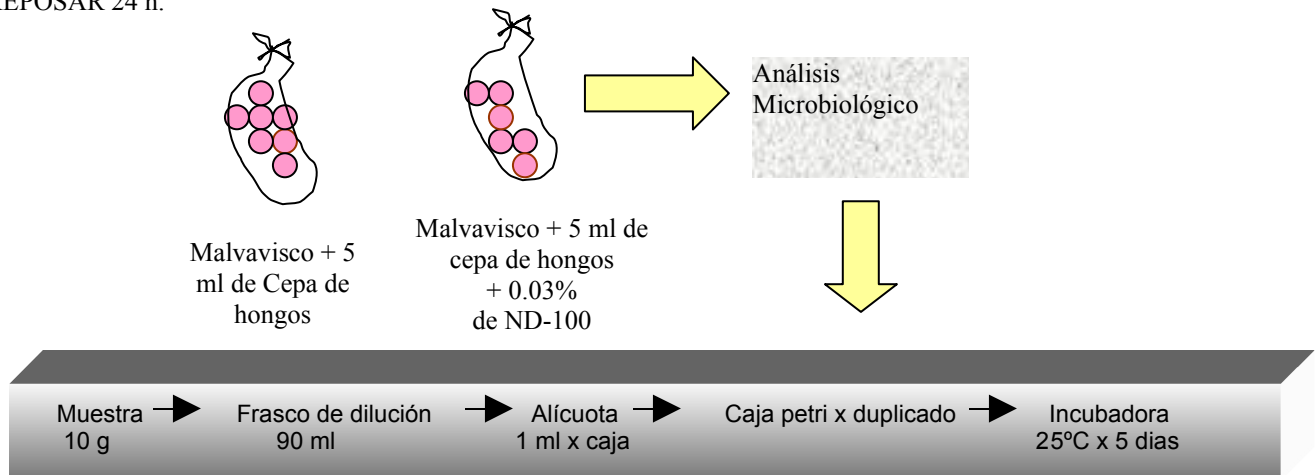


6.3 Tercera etapa, evaluación del efecto residual del ND-100.

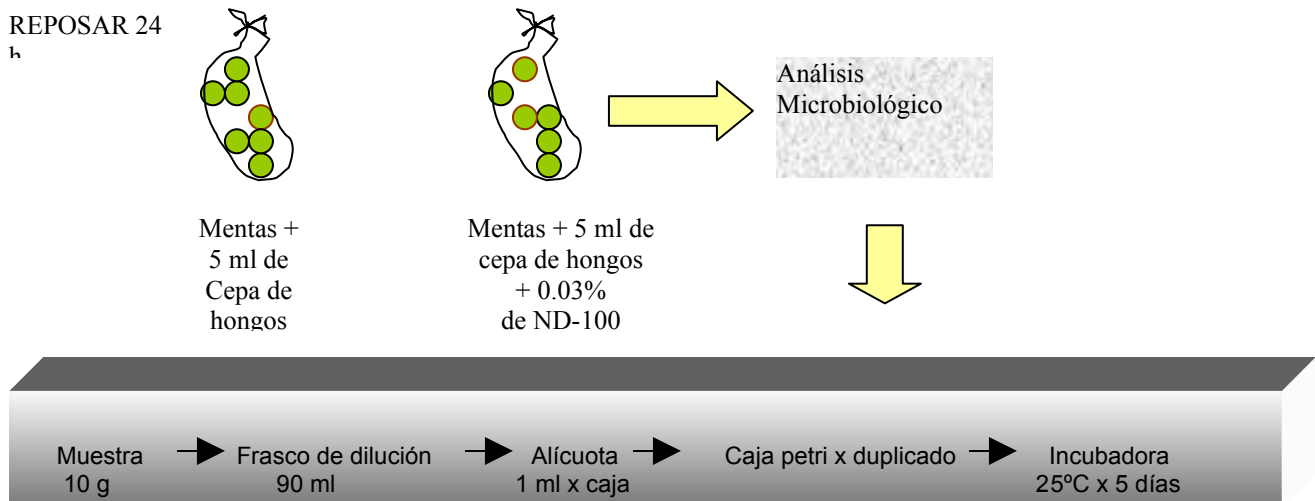
- 1) Se resembró las muestras de malvavisco y menta a los 15 y 30 días de aplicado el ND-100.
- 2) Para ello se realizó un análisis microbiológico de las dos muestras.
- 3) Se preparó un medio comercial de agar papa dextrosa para sembrar las muestras.
- 4) Se pesaron 10 g de muestra y se depositó en un frasco con 90 ml de agua peptonada como medio de dilución (NOM-110-SSA1-1994).
- 5) Se tomó una alícuota de 1 ml (dilución 10^{-1} y se vació en una caja de petri por duplicado, posteriormente se vació el agar papa dextrosa en la caja y se homogeneizó (NOM-111-SSA1-1994).
- 6) Se dejó incubar por 5 días a 25°C. Ver diagrama E.

Diagrama E. Resiembra de las muestras de malvavisco y menta en medio de cultivo para hongos.

REPOSAR 24 h.



REPOSAR 24 h



7. RESULTADOS.

7.1 Resultados de la primera etapa.

7.1.1 Malvavisco

Cuadro 1. Resultados de la evaluación sensorial del malvavisco, prueba por triplicado.

Producto	Prueba	Dosis	Observaciones
MALVAVISCO TAPON	1	Testigo S/T	Sabor a fresa característico del malvavisco. Sabor característico a fresa, se percibe un ligero hormigueo en la lengua. Se percibe una nota de sabor propia del ND-100. Sabor amargo de entrada a salida.
		0.01% S/T	
		0.05% S/T	
		0.1% S/T	
		Testigo T	Sabor balanceado, entrada sabor a fresa y salida sabor a chocolate. Sabor característico a chocolate, no se perciben notas a ND-100. A la entrada no se percibe sabor atípico pero a la salida deja un residual a ND-100. Se percibe un residual amargo más intenso que en 0.05%.
		0.01% T	
		0.05% T	
		0.1% T	
MALVAVISCO TAPON	2	Testigo S/T	Sabor a fresa característico del malvavisco. Se percibe un ligero residual amargo. Se percibe un residual amargo más intenso que en 0.03%.
		0.03% S/T	
		0.04% S/T	
		Testigo T	Sabor balanceado, entrada sabor a fresa y salida sabor a chocolate. Sabor parecido al testigo sin residual amargo. Disminuye el residual que se percibe en la muestra sin tramar, pero queda un ligero sabor que hace que se sienta diferente.
		0.03% T	
		0.04% T	
MALVAVISCO TAPON	3	Testigo S/T	Sabor típico del producto. Se percibe un ligero residual amargo.
		0.03% S/T	
		Testigo T	Sabor típico del producto. Sabor típico del producto no hay residual extraño.
		0.03% T	

T= Producto trampedo

S/T= Producto sin tramar.

7.1.2 Mentas.

Cuadro 2. Resultados de la evaluación sensorial de la menta, prueba por duplicado.

Producto	Prueba	Dosis	Observaciones
MENTA	1	Testigo S/T	Sabor a menta característico del producto.
		0.01% S/T	Se percibe un ligero residual amargo.
		0.02% S/T	No se percibe ningún sabor atípico del producto.
		0.03% S/T	Se percibe una ligera entrada amarga.
		Testigo T	Sabor balanceado, entrada a menta y salida sabor chocolate.
		0.01% T	No se percibe ningún sabor atípico del producto.
		0.02% T	Entra el sabor a chocolate y poca salida de menta, sin residual atípico.
		0.03% T	Entra el sabor a chocolate y poca salida de menta, sin residual atípico.
MENTA	2	Testigo S/T	Sabor a menta característico del producto.
		0.01% S/T	Entrada sabor a menta, no deja ningún residual atípico.
		0.02% S/T	Entrada sabor a menta, no deja ningún residual atípico.
		0.03% S/T	Entrada sabor a menta, no deja ningún residual atípico.
		Testigo T	Entrada sabor a chocolate y salida a menta.
		0.01% T	Entrada sabor a chocolate y salida a menta, sin residual atípico.
		0.02% T	Entrada sabor a chocolate y salida a menta, sin residual atípico.
		0.03% T	Entrada sabor a chocolate y salida a menta, sin residual atípico.

T= Producto trampado

S/T= Producto sin trampar.

7.1.3 Cremas de naranja.

Cuadro 3. Resultados de la evaluación sensorial de las cremas de naranja, prueba por triplicado.

Producto	Prueba	Dosis	Observaciones
CREMAS DE NARANJA	1	Testigo S/T	Entrada sabor naranja, residual amargo propio del producto, no pica.
		0.01% S/T	Se percibe ligero residual amargo a la salida.
		0.02% S/T	Se percibe residual amargo a la salida, mas acentuado que 0.01%.
		0.03% S/T	Se percibe residual amargo a la salida con notas picantes al final.
		Testigo T	Sabor balanceado, entrada sabor chocolate y salida sabor naranja.
		0.01% T	Entrada sabor chocolate, no se percibe residual amargo.
		0.02% T	Entrada sabor chocolate, ligero residual amargo propio del producto.
		0.03% T	Entrada sabor chocolate, ligero residual amargo propio del producto muy parecido a la dosis 0.02.
CREMAS DE NARANJA	2	Testigo S/T	Entrada sabor naranja, residual amargo propio del producto, no pica.
		0.02% S/T	Ligero residual amargo, no pica.
		0.03% S/T	Residual amargo, no pica.
		Testigo T	Entrada sabor chocolate y salida sabor naranja.
		0.02% T	Entrada sabor chocolate, ligero residual amargo propio del producto.
		0.03% T	Entrada sabor chocolate, ligero residual amargo, desaparece rápidamente.
CREMAS DE NARANJA	3	Testigo S/T	Entrada sabor naranja, residual amargo propio del producto, no pica.
		0.03% S/T	Entrada amarga y salida con ligero residual amargo.
		Testigo T	Entrada sabor a chocolate, ligero residual amargo característico del producto.
		0.03% T	Entrada sabor a chocolate, ligero residual amargo característico del producto.

T= Producto trampado

S/T= Producto sin trampar.

7.2 Resultados segunda etapa.

7.2.1 Malvavisco.

Cuadro 4. Resultados de la evaluación microbiológica del malvavisco al día uno de la aplicación del ND-100, prueba por triplicado.

No. de prueba	Producto analizado	Análisis microbiológico al día uno	Observaciones
Primera prueba	Malvavisco	H: VE 290 UFC/g	Malvavisco con aplicación de 5 ml de cepa de hongos.
	Malvavisco	H: VE 90 UFC/g	Malvavisco con aplicación de 5ml de cepa de hongos y 0.03 % de ND-100.
Segunda prueba	Malvavisco	H: 450 UFC/g	Malvavisco con aplicación de 5 ml de cepa de hongos.
	Malvavisco	H: VE 200 UFC/g	Malvavisco con aplicación de 5ml de cepa de hongos y 0.03 % de ND-100.
Tercera prueba	Malvavisco	H: 290 UFC/g	Malvavisco con aplicación de 5 ml de cepa de hongos.
	Malvavisco	H: VE 110UFC/g	Malvavisco con aplicación de 5ml de cepa de hongos y 0.03 % de ND-100.

H = Hongos

VE = Valor Estimado

UFC/g = Unidades Formadoras de Colonias

7.2.2 Mentas

Cuadro 5. Resultados de la evaluación microbiológica de la menta al día uno de la aplicación del ND-100, prueba por triplicado.

No. de prueba	Producto analizado	Análisis microbiológico al día uno	Observaciones
Primera prueba	Mentas	H: Incontable 24 hrs. UFC/g	Menta con aplicación de 5 ml de cepa de hongos.
	Mentas	H: 170 UFC/g	Menta con aplicación de 5ml de cepa de hongos y 0.03 % de ND-100.
Segunda prueba	Mentas	H: 180 UFC/g	Menta con aplicación de 5 ml de cepa de hongos.
	Mentas	H: VE 60 UFC/g	Menta con aplicación de 5ml de cepa de hongos y 0.03 % de ND-100.
Tercera prueba	Menta	H: VE 90 UFC/g	Menta con aplicación de 5 ml de cepa de hongos.
	Mentas	H: VE 20 UFC/g	Menta con aplicación de 5ml de cepa de hongos y 0.03 % de ND-100.

H = Hongos

VE = Valor Estimado

UFC/g= Unidades Formadoras de colonias

7.3 Resultados de la tercera etapa.

7.3.1 Malvavisco.

Cuadro 6. Resultados de la evaluación microbiológica del malvavisco a los 15 y 30 días de la aplicación del ND-100, prueba por triplicado.

No. de prueba	Producto analizado	Análisis microbiológico a los 15 días	Análisis microbiológico a los 30 días	Observaciones
Primera prueba	Malvavisco	H: VE 670 UFC/g	H: VE 630 UFC/g	Malvavisco con aplicación de 5 ml de cepa de hongos.
	Malvavisco	H: VE 40 UFC/g	H: VE 20 UFC/g	Malvavisco con aplicación de 5 ml de cepa de hongos y 0.03% de ND-100.
Segunda prueba	Malvavisco	H: Incontable	H: VE 330 UFC/g	Malvavisco con aplicación de 5 ml de cepa de hongos.
	Malvavisco	H: VE 140 UFC/g	H: VE 85 UFC/g	Malvavisco con aplicación de 5 ml de cepa de hongos y 0.03% de ND-100.
Tercera prueba	Malvavisco	H: VE 530 UFC/g	H: VE 600 UFC/g	Malvavisco con aplicación de 5 ml de cepa de hongos.
	Malvavisco	H: VE 100 UFC/g	H: <10 UFC/g	Malvavisco con aplicación de 5 ml de cepa de hongos y 0.03% de ND-100.

H = Hongos

VE = Valor Estimado

UFC/g= Unidades Formadoras de Colonias

7.3.2 Mentas.

Cuadro 7. Resultados de la evaluación microbiológica de las mentas a los 15 y 30 días de la aplicación del ND-100, prueba por triplicado.

No. de prueba	Producto analizado	Análisis microbiológico a los 15 días	Análisis microbiológico a los 30 días	Observaciones
Primera prueba	Mentas	H: VE 460 UFC/g	H: VE 290 UFC/g	Mentas con aplicación de 5 ml de cepa de hongos.
	Mentas	H: VE 80 UFC/g	H: VE 140 UFC/g	Mentas con aplicación de 5 ml de cepa de hongos y 0.03% de ND-100.
Segunda prueba	Mentas	H: VE 260 UFC/g	H: VE 360 UFC/g	Mentas con aplicación de 5 ml de cepa de hongos.
	Mentas	H: VE 10 UFC/g	H: <10 UFC/g	Mentas con aplicación de 5 ml de cepa de hongos y 0.03% de ND-100.
Tercera prueba	Mentas	H: VE 60 UFC/g	H: VE 40 UFC/g	Mentas con aplicación de 5 ml de cepa de hongos.
	Mentas	H: <10 UFC/g	H: <10 UFC/g	Mentas con aplicación de 5 ml de cepa de hongos y 0.03% de ND-100.

H = Hongos

VE = Valor Estimado

UFC/g= Unidades Formadoras de Colonias

8. ANALISIS DE RESULTADOS

8.1 Primera etapa.

8.1.1 Malvavisco.

En la primer prueba, en el caso del malvavisco sin trampar el residual amargo del ND-100 se percibe en todas las dosis aplicadas, con una variación dependiendo de la concentración utilizada a mayor concentración el residual es más intenso.

En el caso del malvavisco trampado el residual amargo sólo se percibe en las dosis de 0.1 y 0.05%, en la dosis de 0.01% no se percibe residual amargo. Como la presentación comercial del malvavisco es trampado conviene que el sabor amargo no se detecte en él, por lo tanto se rechazo la dosis de 0.1 y 0.05%. La dosis de 0.01% no se rechazo pero se decidió probar antes con otras dosis más altas. Se propuso evaluar en la segunda prueba las dosis de 0.04 y 0.03%.

En la segunda prueba, en el caso del malvavisco sin trampar el residual amargo del ND-100 se percibe en las dos dosis aplicadas 0.4 y 0.03%. En el caso del malvavisco trampado el residual amargo sólo se percibe en las dosis de 0.04% y no en la de 0.03%.

De las dosis evaluadas únicamente en 0.03 y 0.01% no se percibe residual amargo, pero esto aplica únicamente a los malvaviscos trampados. De entre éstas dos dosis se selecciono la de 0.03% para realizar una tercera prueba sensorial y confirmar que no se detecta en los malvaviscos trampados el sabor amargo del ND-100. Se selecciono la dosis de 0.03% por considerarse mas apropiada para la evaluación microbiológica de la segunda etapa, pues al ser una concentración mayor debe tener un mayor efecto en la inhibición de microorganismos.

En la tercera prueba, con la dosis de 0.03% se percibió un residual amargo característico del ND-100 en los malvaviscos sin trampar, pero no así en los trampados, con ello se confirma que si se puede aplicar ND-100 al 0.03% sin que se vean alteradas las características físicas y sensoriales de los malvaviscos.

En la evaluación sensorial se encontró que el chocolate semiamargo ayuda a enmascarar el sabor amargo del ND-100 en las dosis de 0.01% y 0.03%.

8. 1. 2 Mentas.

En el caso de la menta sin trampar el residual amargo del ND-100 no se percibe en ninguna de las dosis aplicadas (0.01, 0.02 y 0.03%).

En el caso de las mentas trampadas el residual amargo del ND-100 tampoco se percibe en ninguna de las dosis aplicadas (0.01, 0.02 y 0.03%).

En cuanto al residual amargo del ND-100 no se percibe diferencia entre las tres dosis utilizadas.

Al igual que en el caso del malvavisco se pueden aplicar las tres dosis a la menta pues no dejan residual amargo al momento de tramparse, sin embargo la dosis mas alta (0.03%) puede tener un mayor efecto en la inhibición de microorganismos.

8.1. 3 Cremas de naranja.

En el caso de las cremas de naranja sin trampa, el residual amargo del ND-100 no se percibe en ninguna de las dosis aplicadas (0.01, 0.02 y 0.03%) y se confunde con el amargor característico de la esencia de naranja.

En el caso de las cremas de naranja trampadas el residual amargo que se percibe es el característico de la esencia de naranja y queda balanceado con el sabor del chocolate semiamargo.

Sensorialmente no se percibe diferencia entre las tres dosis utilizadas.

Al igual que en los casos anteriores se pueden aplicar las tres dosis a las cremas de naranja pues no dejan residual amargo en el producto al momento de tramparse, sin embargo al igual que en las mentas la dosis más altas pueden tener un mayor efecto en la inhibición de microorganismos.

En el caso del malvavisco, mentas y cremas de naranja trampados la dosis más adecuada para emplearse es de 0.03% debido a que con ésta dosis no se percibió ningún sabor que afecte la calidad del producto y además hay un mejor efecto en la inhibición de microorganismos que las dosis más bajas.

En el caso de las cremas de naranja por presentar resultados similares a las mentas no se consideró necesario incluirlas en la segunda etapa la investigación.

Durante la evaluación sensorial solo se utilizaron dos evaluadores debido a que no se contaba con personal capacitado para integrar un panel mas grande de evaluadores y también debido a una instrucción de la gerencia se decidió no involucrar mas gente en las pruebas. Debido a esto, aunque se utilizo la prueba de comparación apareada simple y puede ser sometida a análisis estadístico, el numero tan bajo de panelistas impidió realizar un análisis estadístico y únicamente se utilizaron las observaciones para interpretar los resultados de la evaluación sensorial.

8.2 Segunda etapa.

8.2.1 Malvavisco.

Cuadro 8. Cuadro comparativo entre la muestras de malvavisco inoculadas con 5 ml de cepa de hongos y muestras inoculadas con 5 ml de cepa de hongos y 0.03% de ND-100.

Producto Analizado	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Promedio
Muestra con 5ml de cepa de hongos	290 UFC/g	450 UFC/g	290 UFC/g	
Muestra con 5 ml de cepa de hongos y 0.03 % de ND-100	VE 90 UFC/g	200 UFC/g	110 UFC/g	
% de disminución de desarrollo de hongos	70.68 %	55.55%	62.06%	62.76%

H = Hongos

VE = Valor Estimado

UFC/g= Unidades Formadoras de Colonias

De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación del ND-100 inoculado en malvavisco a una dosis de 0.03%, se obtuvo un efecto inhibitorio en el desarrollo de los hongos de 62.76% al día uno de aplicación. Esto sin considerar el efecto residual del ND-100 que puede bajar aun más las cuentas y que se analizara mas adelante.

8.2.2 Mentas.

Cuadro 9. Cuadro comparativo entre las muestras de menta inoculadas con 5 ml de cepa de hongos y muestras inoculadas con 5 ml de cepa de hongos y 0.03% de ND-100.

Producto Analizado	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Promedio
Muestra con 5ml de cepa de hongos	Incontable a las 24 hrs.	180 UFC/g	VE 90 UFC/g	
Muestra con 5 ml de cepa de hongos y 0.03 % de desfan	170 UFC/g	VE 60UFC/g	VE 15 UFC/g	
% de disminución de desarrollo de hongos	----	66.66%	83.33%	74.99

H = Hongos

VE = Valor Estimado

UFC/g= Unidades Formadoras de Colonias

De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación del ND-100 inoculado en mentas sin trampa a una dosis de 0.03%, se obtuvo un efecto inhibitorio en el desarrollo de los hongos de 74.99% al día uno de la inoculación. Esto sin

considerar el efecto residual del ND-100 que puede bajar aun más las cuentas de mohos y qué se analizará mas adelante.

Se ha observado que en las mentas las cuentas de hongos son bajas <10 UFC/g, pero conforme pasa el tiempo 4 a 5 meses aprox. empieza a desarrollarse de forma visible el micelio de los hongos lo que afecta la calidad del producto. Caso contrario sucede con el malvavisco que inicialmente presenta cuentas altas y conforme pasa el tiempo disminuyen notablemente y sólo bajo condiciones de humedad y temperatura alta pueden llegar a manifestarse de forma visible a los cinco meses. Estas observaciones se realizaban de manera rutinaria y periódica a los productos, sin embargo los resultados de esas observaciones no se describen de forma detallada en este informe, pues no se contemplaron como un objetivo del mismo, sin embargo a partir de ellas fué que se planteo el presente trabajo.

La explicación a este problema puede deberse a lo siguiente:

Como ya se menciona anteriormente, las mentas tienen menos agua que el malvavisco pero poseen una actividad acuosa mayor, además las mentas tienden a ganar humedad del medio ambiente y sí a esto le sumamos que el producto se almacena a temperaturas de 25°C, todo ello favorece un ambiente propicio para el desarrollo de las esporas que se encuentran latentes en las mentas. El malvavisco a diferencia de las mentas tiene más agua pero una actividad acuosa menor por ello el desarrollo de los hongos es limitado, además el malvavisco tiende a perder humedad con el tiempo, sin embargo, si durante la elaboración del producto la actividad acuosa fue mayor de lo establecido, pueden llegar a activarse las esporas si la temperatura de almacenamiento ronda los 25°C lo que puede provocar el desarrollo de los mohos y la aparición del micelio.

8.3 Tercera etapa

8.3.1 Malvavisco.

Cuadro10. Resultados de los análisis de malvavisco a los 15 y 30 días, tomando como referencia las muestras inoculadas con 5 ml de cepa de hongos del día uno.

Prueba	Muestra con 5 ml de hongos (inicial) sin ND-100.	Muestra con 5 ml de hongos y 0.03% de ND-100 a los 15 días.	Muestra con 5 ml de hongos y 0.03% de ND-100 a los 30 días.	% de disminución de desarrollo de hongos a los 15 días	% de disminución de desarrollo de hongos a los 30 días
Prueba 1	290 UFC/g	VE 40 UFC/g	VE 20 UFC/g	86.21%	93.10%
Prueba 2	450 UFC/g	140 UFC/G	VE 85 UFC/g	68.88%	81.11%
Prueba 3	290 UFC/g	VE 100 UFC/g	<10 UFC/g	65.51%	100%
Promedio				75.53%	85.10%

H = Hongos

VE = Valor Estimado

UFC/g= Unidades Formadoras de Colonias

8.3.2 Menta.

Cuadro 11. . Resultados de los análisis microbiológicos de la menta a los 15 y 30 días, tomando como referencia las muestras inoculadas con 5 ml de cepa de hongos del día uno.

Prueba	Muestra con 5 ml de hongos (inicial) sin ND-100.	Muestra con 5 ml de hongos y 0.03% de ND-100 a los 15 días.	Muestra con 5 ml de hongos y 0.03% de ND-100 a los 30 días.	% de disminución en el desarrollo de hongos a los 15 días	% de disminución en el desarrollo de hongos a los 30 días
Prueba 1*	Incontable a las 24 hrs.	VE 80 UFC/g	VE 140 UFC/g		
Prueba 2	180 UFC/g	VE 10 UFC/G	<10 UFC/g	94.44%	100%
Prueba 3	VE 90 UFC/g	<10 UFC/g	<10 UFC/g	100%	100%
Promedio				97.22%	100%

H = Hongos

VE = Valor Estimado

UFC/g= Unidades Formadoras de Colonias

*Los resultados de la prueba 1 de menta no se incluyeron en los porcentajes por presentar un comportamiento irregular.

9. CONCLUSIONES

9.1 Primera etapa.

- En el caso del malvavisco, mentas y cremas de naranja trampados la dosis más adecuada para emplearse es de 0.03% debido a que con ésta dosis no se percibió ningún sabor que afecte la calidad sensorial del producto.

9.2 Segunda etapa.

- En el caso del malvavisco con una dosis de 0.03% de ND-100 se logró una disminución en el desarrollo de los mohos en un 62.76% al día uno de aplicado el ND-100.
- En el caso de la menta con una dosis de 0.03% de ND-100 se logró una disminución en el desarrollo de los mohos en un 74.99% al día uno de aplicado el ND-100.
- La dosis mas adecuada para aplicar el ND-100 en los malvaviscos y mentas es de 0.03%, debido a que con ella se logro disminuir de manera notable el desarrollo de los mohos.
- A pesar de que no se evaluó el ND-100 en las cremas de naranja se puede hacer extensivo la misma dosis a este producto, por presentar características muy similares a las de la menta.

9.3 Tercera etapa.

- En el caso del malvavisco con una dosis de 0.03% de ND-100 se obtuvo una disminución en el desarrollo de los mohos en un 75.53% a los 15 días y un 85.10% a los 30 días.
- El ND-100 tiene un efecto residual en el malvavisco que inhibe de manera importante el desarrollo de los mohos, sin embargo no los elimina.
- En el caso de la menta con una dosis de 0.03% de ND-100 se obtuvo una disminución en el desarrollo de los mohos en un 97.22% a los 15 días y un 100% a los 30 días.
- En este caso el ND-100 tiene un efecto residual en la menta que inhibió casi al 100% el desarrollo de los mohos.

10. RECOMENDACIONES.

- De acuerdo a los resultados favorables que se obtuvo con el ND-100 en los productos de menta y malvavisco, se recomienda aplicarlo a nivel planta.
- Se sugiere realizar un análisis microbiológico de los malvaviscos y mentas inoculados con 5 ml de cepa de hongos y 5 ml de cepa de hongos y 0.03% de ND-100, a los 7 y 8 meses respectivamente (tiempo que dura la vida de anaquel de ambos productos), para evaluar el efecto residual del ND-100 a este tiempo.

11. GLOSARIO

Algicida. Sustancia sintética o natural capaz de matar a las algas (Brock T.D. 1993).

Actividad acuosa o actividad de agua. Es la fracción del agua que sirve para que se lleven a cabo las reacciones químicas, enzimáticas y microbiológicas en los alimentos. A mayor actividad acuosa las reacciones biológicas, químicas y enzimáticas son más rápidas. A menor actividad acuosa las reacciones son más lentas. El valor de la actividad acuosa se incrementa cuando se eleva la temperatura (Martha N. Coronado et. al.1993).

La actividad del agua, abreviadamente a_w , está relacionada con la presión de vapor del agua contenida en el aire sobre una solución o sustancia, y se calcula midiendo la humedad relativa de la fase de vapor. La humedad relativa, que es un concepto meteorológico corriente, expresa la relación de la cantidad de agua presente en el aire a una temperatura dada respecto a la cantidad que contendría el aire si estuviese saturado de agua. En términos meteorológicos, la humedad relativa se expresa normalmente como porcentaje, pero la actividad de agua se expresa como fracción. Así, a_w 0.75 es igual al 75 % de humedad relativa. Para medir la actividad del agua de una sustancia o solución se coloca esta en un espacio cerrado y se deja que alcance un estado de equilibrio con el aire. La medición de la humedad relativa del aire (medida generalmente por la diferencia de temperatura entre termómetros de bola húmeda y bola seca) da entonces la actividad de agua del material (Brock T.D. 1978).

La escala de medición de este parámetro va de cero (un producto absolutamente seco) a uno (agua pura).

a_w = Actividad acuosa
HR= Humedad relativa
 $a_w=HR/100$

También puede ser usada la siguiente expresión para calcular la a_w :

$a_w= P_w/P^{\circ}w$

Donde P_w es la presión de vapor del agua en equilibrio con el alimento y $P^{\circ}w$ es la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura (Maupoey P.F. 1998).

Agua libre. El agua libre es la porción que sí se congela a condiciones normales de congelamiento, se volatiliza rápidamente, se pierde en el calentamiento y es la principal responsable de la actividad acuosa. El agua libre es la única disponible para el crecimiento de los microorganismos para intervenir en las transformaciones biológicas, químicas, enzimáticas, etc. (Badui D. Salvador; 1990)

Agua ligada. Del total de la humedad de un producto, el agua ligada es aquella porción que no congela en las condiciones normales de congelamiento -20°C . Está unida a la superficie sólida de los alimentos y no participa en las reacciones químicas, enzimáticas y biológicas (Badui D. Salvador;1990)

Atemperado. La manteca de cacao cristaliza en formas polimórficas muy diferentes de las que sólo una de ellas es estable. Por ello es importante que la forma de los cristales en el chocolate moldeado y en el chocolate de revestimiento sea del tipo estable β o la forma polimórfica V. El procedimiento de atemperado consiste en calentar el chocolate hasta los 45°C para que desaparezcan todos los núcleos de cristalización. A continuación se enfría gradualmente hasta que comience la cristalización (a unos 29°C). Posteriormente se vuelve a calentar el chocolate hasta unos 30°C . (Ranken M.D. 1993).

Bactericida. Sustancia sintética o natural capaz de matar a las bacterias (Brock T.D. 1993).

Bacteriostático. Son agentes que no matan, sino que solamente inhiben el crecimiento (Brock T.D. 1993).

Cocoa. Es el producto obtenido de la pulverización de la torta prensada de cacao.

Clasificación:

<i>No alcalinizada (pH 5.0 – 6.5.)</i>	→	<i>de contenido alto de grasa (Min. 20%)</i>
<i>Alcalinizada (Min. PH 6.5.)</i>		<i>de contenido medio de grasa(14 – 20%)</i>
		<i>de contenido bajo de grasa(9 – 14%)</i>

Conchado. Es un proceso de homogenización de la pasta. Consta de dos fases:

- Conchado en seco:** Consiste en eliminar ácidos y humedad. El producto polvoriento aglomerado se deja trabajar durante 6 – 8 h. Durante este proceso se forman grumos porosos los cuales se presionan unos a otros, formándose nuevamente; además se absorbe y expulsa aire de manera continua, con lo cual se logra una rápida evaporación de los aromas indeseables.
- Conchado líquido:** Consiste en una inversión de fases. Con la adición de una parte de la manteca de cacao se produce un cambio de fase sólida a fase líquida, las partículas se cubren de una pequeña capa de grasa (manteca de cacao). El tiempo de esta fase es en general de 24 hr. La temperatura para el conchado de chocolate oscuro está entre 60 y 71°C y para el chocolate con leche está entre 46 y 55°C .

Efectos del Conchado:

- Remoción de la humedad de la pasta (del 2.0% al 0.5%)
- Remoción de compuestos volátiles que proporcionan sabores indeseables.
- Reducción de la viscosidad.
- Dispersión completa de sólidos en la fase líquida.
- Desarrollo del sabor debido al contacto con el aire durante el mezclado prolongado a temperatura elevada.
- Eliminación de asperezas de las partículas.

Desinfectante. Son agentes antimicrobianos que matan a los microorganismos y se usan sobre objetos inanimados (Brock T.D. 1993).

Espuma. Es la dispersión de un gas (normalmente aire) en un alimento o en un producto semifabricado de consistencia líquida, cremosa o pastosa, esto se logra mediante el batido o agitación (Tsheuschner H.T. 2001).

Fondant. El fondant es una suspensión de cristales finos de azúcar en un jarabe saturado. Normalmente el tamaño de los cristales es alrededor de 10 μm y los sólidos del jarabe deben estar al 75% o más alto para impedir el desarrollo de mohos. La composición típica del fondant base es alrededor del 75% de azúcar, 15 % de sólidos de glucosa y 10% de agua, si bien todas estas cantidades pueden variarse en alguna medida. Aunque es posible elaborar fondant manualmente, la mayoría de los procesos son de trabajo continuo y consisten en la ebullición de un jarabe hasta unos 120°C, seguido por un enfriamiento rápido hasta unos 50°C mientras esta siendo sometido a agitación violenta para dar lugar a la rápida nucleación y cristalización. Una vez que el proceso de cristalización ha comenzado, la planta se llena de granos de cristal y cuando sale de la misma el fondant esta casi totalmente cristalizado. El tamaño de los cristales se reduce mediante batido a temperaturas más bajas (Ranken M.D. 1993).

Fungicida. Sustancia sintética o natural capaz de matar a las hongos o mohos (Brock T.D. 1993).

Humedad relativa. La humedad relativa se define como la cantidad de vapor de agua de una atmósfera dividida por la cantidad de vapor de agua de una atmósfera saturada de humedad, a la misma temperatura y presión, y multiplicado por 100. Los instrumentos para medir la humedad relativa incluyen higrómetros de papel y de cabello, termómetros de bulbo seco y bulbo húmedo e instrumentos electrónicos (Ranken M.D. 1993).

Humedad relativa de equilibrio (HRE). En una atmósfera completamente seca todos los productos de repostería perderán agua. A medida que la humedad relativa de esa atmósfera aumenta llegará un momento en el que los productos dejen de perder humedad y si se sigue aumentando la humedad relativa entonces los alimentos absorberán humedad de la atmósfera. A la humedad relativa de una atmósfera en la que un alimento (o un producto de repostería) ni gana ni pierde humedad se denomina Humedad relativa de equilibrio de dicho producto y es una función de la presión de vapor de sus moléculas (Ranken M.D. 1993).

Licor de cacao. Es el producto obtenido de la molienda del grano de cacao tostado libre de cascarilla, que puede ser alcalinizado o no.

Mezclado. Incorporación de la porción principal de las materias primas, obteniéndose una pasta de textura ligeramente gruesa y de consistencia plástica.

Moldura de almidón. Normalmente se utiliza el almidón de maíz para la formación de molduras con destino a la elaboración de productos de confitería. El uso del almidón tiene que hacerse en adecuadas condiciones (Ranken M.D. 1993).

- a) Debe proporcionar una buena impresión
- b) El almidón necesita aireación
- c) Debe controlarse el contenido de humedad
- d) Debe eliminarse los residuos y fragmentos de los productos depositados.

Osmófilos. Son los organismos capaces de crecer en medios con elevadas concentraciones de solutos, por ejemplo, ambientes muy ricos en azúcar o muy salinos, a estos últimos también se les conoce como halófilos. El citoplasma tiene por lo general una concentración de solutos mayor que el medio, de manera que el agua tiende a penetrar en la célula. Si la concentración externa de solutos se eleva hasta un valor mayor que el de la interna el agua tenderá a salir de la célula, y en estas condiciones un organismo sólo puede obtener agua y crecer aumentando su concentración interna de solutos. Algunos microorganismos pueden hacer esto mejor que otros y, por lo tanto, son llamados osmófilos (Brock T.D. 1993).

Ósmosis. La Mayor parte de los habitats bacterianos tienen concentraciones de solutos considerablemente inferiores a los que hay dentro de la célula. El agua pasa de bajas regiones de concentración de solutos a regiones de concentraciones de solutos elevadas según un proceso denominado ósmosis. Así, a lo largo de la vida de la célula, el agua tiende constantemente a entrar y la célula se hincharía y llegaría a reventar si no fuera por la resistencia de la pared celular. Si la concentración de solutos es superior en el medio que en la célula, el agua fluye hacia fuera, y la célula se deshidrata; este proceso se llama plasmolisis (Brock T.D. 1993).

Refinado. Determina la tersura y fineza del chocolate. Para esto se utiliza generalmente un refinador de 5 rodillos. Así, se reduce el tamaño de partícula de la pasta hasta 25 – 35 micras.

Trampar. Cubrir o bañar con chocolate

12. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Anzaldúa M. A. 1990. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica. Ed. Acribia. Zaragoza España. P.c.78-79
- 2) Badui S. D. 1990. Química de los alimentos. Alambra Mexicana. Méx. D.F. P.c 15-40.
- 3) Banwart, J. G. 1982. Microbiología Básica de los Alimentos. Ed. Bellaterra. España. P.c. 48-58
- 4) Beckett S.T. 1998. Fabricación y utilización industrial del chocolate. Ed Acribia. Zaragoza España. 432 Pág.
- 5) Brock T.D y Madigan M.T. 1993. Microbiología. Prentice Hall Hispanoamericana. México. P.c.121-157.
- 6) Brock T.D. 1978. Biología de los microorganismos. Edit. Omega, 2da ed. Barcelona, España.
- 7) Burgeois C.M. Mesclé J.F. Zucca J.1994. Microbiología Alimentaria. Vol. I. Ed. Acribia. Zaragoza, España. P.c. 167-192
- 8) Cartaya R. O., Reynaldo E.I. y Nogueiras L. C. Caracterización química del complejo de bioflavonoides del limón (CBL). Temas de ciencia y tecnología. V. 6 (18): 11-14.
- 9) Lehninger A.L.1976. Curso de bioquímica. Ed. Omega. Barcelona España. P.c. 71-87.
- 10) Lehninger A.L.2000. Principios de Bioquímica. Ed. Omega. Barcelona España. P.c. 306-307.
- 11) Frazier W.C. y Westhoff.1993. Microbiología de los alimentos. 4ª ed. Ed. Acribia, Zaragoza España. P.c.247-257.
- 12) Janssen. 1988. Clinacox: technical manual. Janssen Pharmaceutica. Animal Health. P.c. 48.
- 13) Rodney y Boyer.1999. Conceptos en bioquímica. Thomson Editores. México.
- 14) Silliker J.H. Y Elliot R.P. 1985. Ecología microbiana de los alimentos. Vol. II. Ed. Acribia. España.

- 15) Mossel, D.A. A. Y M. Ingram. 1955. The physiology of de microbial spoilage of foods. J. Appl. Bacteriol.18:232-268.
- 16) Maupoey P.F. 1998. Termodinámica y cinética de sistemas alimento entorno. Editorial U.P.U. Valencia, España
- 17) Rodza S.A de C.V.2003. Especificaciones y descripción de producto. Mex. D.F.
- 18) Ranken M.D. 1993. Manual de industria de los alimentos. Ed. Acribia, Zaragoza, España. P.c. 404, 421, 427,428
- 19) Scot W. J. 1957. Water relations of food spoilage microorganisms. Advan. Food. Res. 7:83-127.
- 20) Secretaria de salud. NOM-092-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- 21) Secretaria de salud. NOM-110-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- 22) Secretaria de salud. NOM-111-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- 23) Tamasaukas, R., Ruiz, H., Theis, W., De Basilio, V., Herrera, J., Aguirre A. Y Roa N. 1997. Arch. Latinoam. Prod. Anim. V. 5(Supl. 1):612-615
- 24) Tsheuschner H.T. 2001. Fundamentos de tecnología de los alimentos. Ed. Acribia. España.
- 25) Wong's S.A. de C.V. 2002. Manual de Procedimientos de Producción. Mex. D.F.